

Protektion und Regeneration retinaler Ganglienzellen nach intravitrealer Kohlenmonoxid-Applikation im retinalen Ischämiemodell

Stifter J¹, Ulbrich F², Göbel U², Brockhaus K³, Lagrèze W¹, Biermann J¹

¹ Klinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Freiburg, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

² Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

³ Universitätsklinikum Münster, Institut für Experimentelle Ophthalmologie, Münster

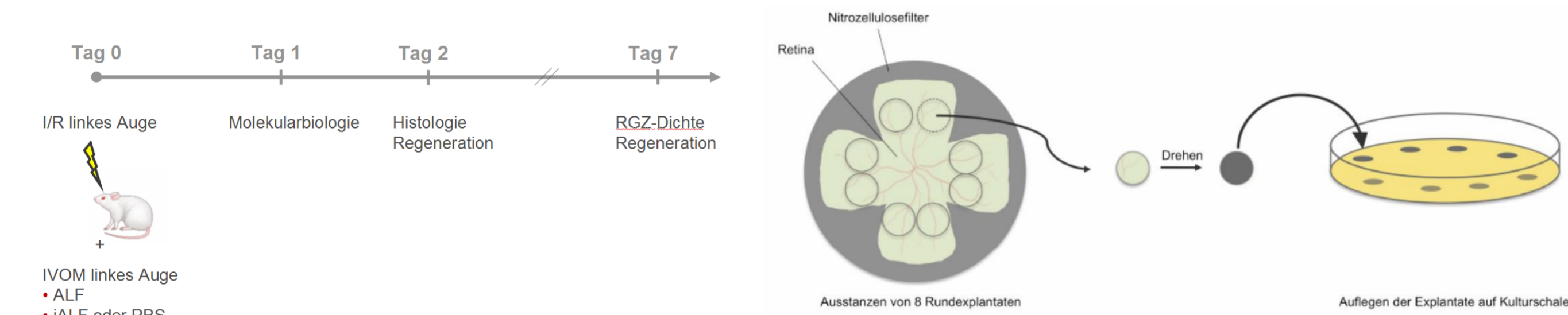


Fragestellung

Neuronale Ischämie induziert Apoptose und führt zu Gewebeschaden. Der Gasotransmitter Kohlenmonoxid (CO) zeigte neuroprotektive und antiinflammatorische Effekte im retinalen Ischämiemodell der Ratte. Dies konnte auch nach intravenöser Anwendung des CO-freisetzenden Moleküls (CORM) ALF-186 beobachtet werden. Hier wurden erstmals die intravitreale Applikation sowie zugrunde liegende Wirkmechanismen auf molekularer Ebene untersucht. Wir postulieren, dass das unmittelbar nach Ischämie-Reperfusionsschaden (IR) applizierte ALF-186 antiapoptotisch und antiinflammatorisch wirkt sowie die Regeneration fördert.

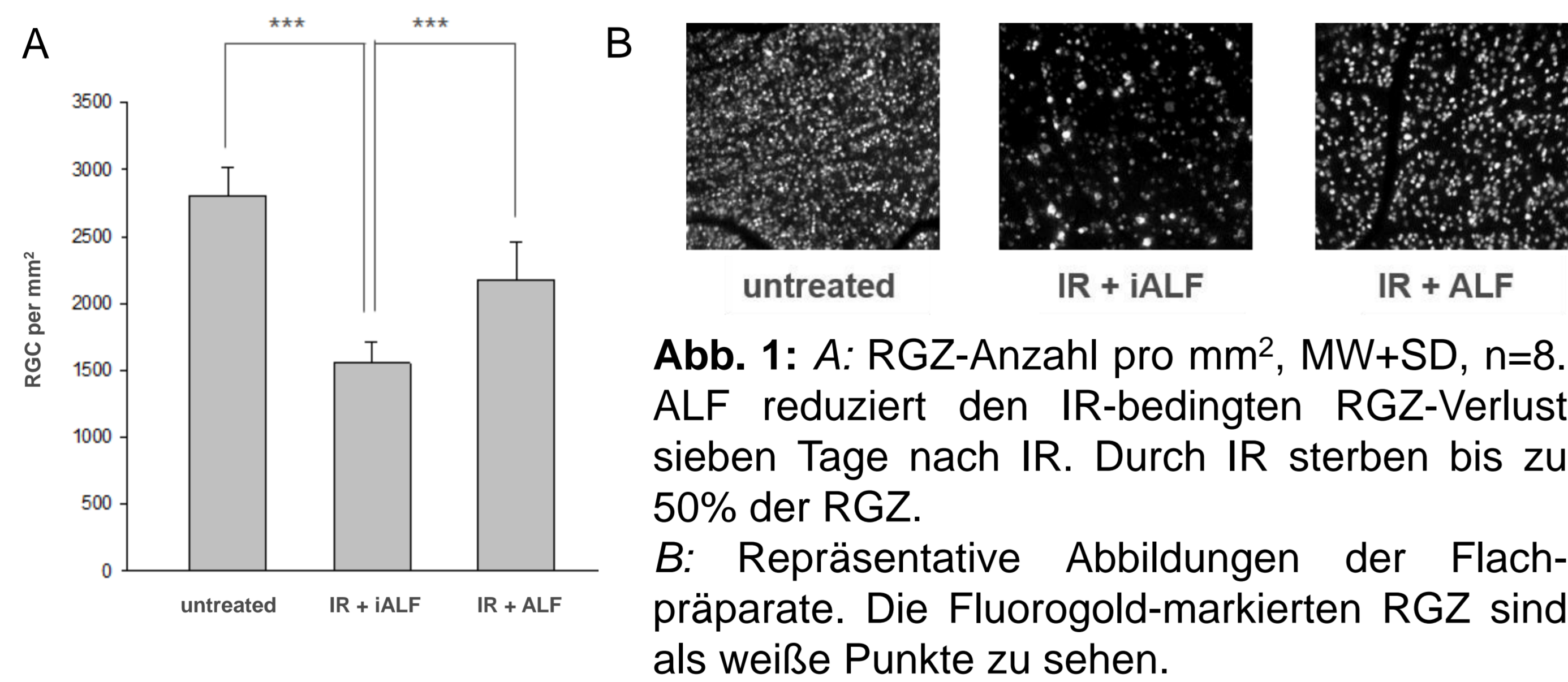
Methoden

Nach einstündiger retinaler Ischämie an Rattenäugen wurde direkt nach der Reperfusion ALF-186 intravitreal (5mg/ml), PBS bzw. inaktiviertes ALF-186 (iALF) appliziert. Das rechte Auge blieb unversehrt und diente als Kontrollauge. Entnahme der Retinae nach 24 Stunden zur Analyse der mRNA oder Proteinexpression von Caspase-3, ERK1/2, p38, HSP70/90, NF-κB, Iba-1, TNF-α und GAP-43. Die Dichte Fluorogold-markierter retinaler Ganglienzellen (RGZ) wurde sieben Tage nach IR in Flachpräparaten bestimmt (drei Exzentritäten in vier Quadranten).

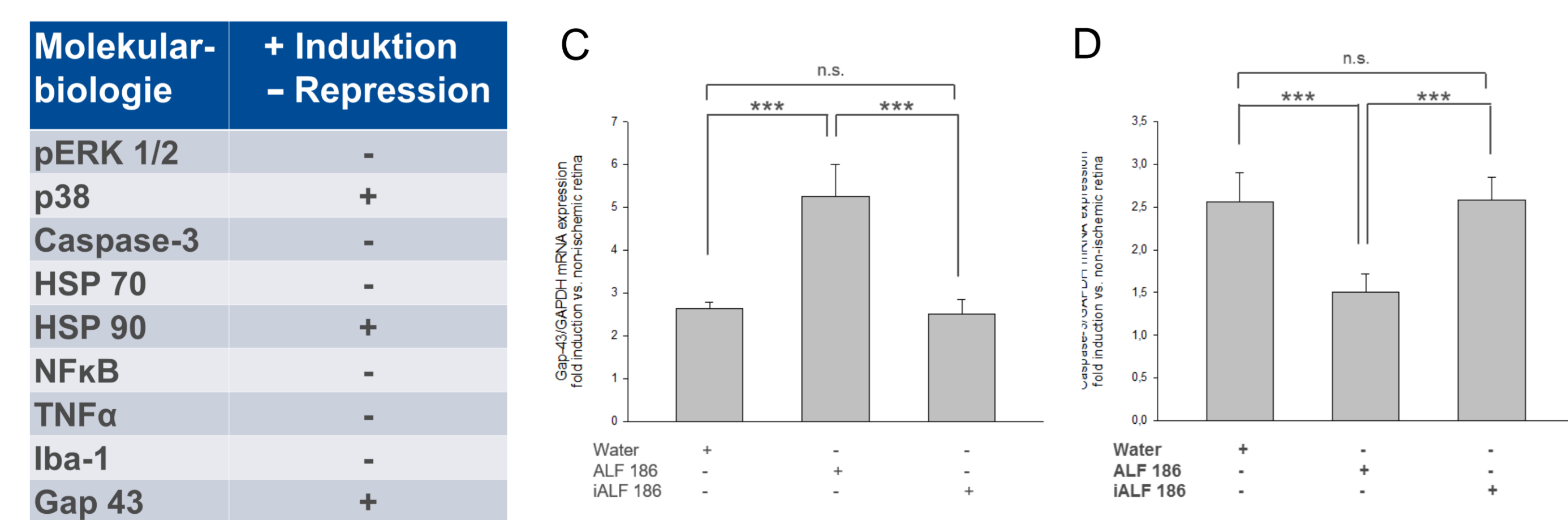


Die Regenerationsfähigkeit der Axone wurde im Zellkulturmodell zwei (**Gruppe 1**) bzw. sieben Tage (**Gruppe 2**) nach IR untersucht. Dabei wurde die Anzahl der aussprossenden RGZ-Axone pro Explantat und die Gliazellaktivierung 6 Tage nach Kulturanlage erfasst durch Immunhistochemie mit Antikörpern gegen β-3-Tubulin und GFAP (glial fibrillary acidic protein).

1. Intravitreales ALF-186 wirkt neuroprotektiv, antiapoptotisch und antiinflammatorisch



Tab. 1, Abb. 2: Molekularbiologische Untersuchungen (Western Blot, mRNA-Expression). MAP-Kinasen (pERK, p38) und Hitzeschockproteine (HSP) werden signifikant differentiell exprimiert. Das wachstums-assoziierte Protein Gap-43 (C) ist signifikant erhöht. Entzündungsmarker (TNFα, NFκB) und der Apoptosemarker Caspase3 (D) sind signifikant erniedrigt.



Schlussfolgerung

Intravitreal appliziertes ALF-186 schützt retinale Ganglienzellen nach Ischämie über antiapoptotische und antiinflammatorische Signalwege. In ALF-behandelten ischämischen Netzhäuten wird das intrinsische Regenerationspotential ähnlich stark re-induziert wie in iALF-behandelten Ischämie-Augen, obwohl die Anzahl geschädigter RGZ in beiden Gruppen signifikant unterschiedlich ist. Dies könnte

2. Axonregeneration und gliale Reaktion in vitro

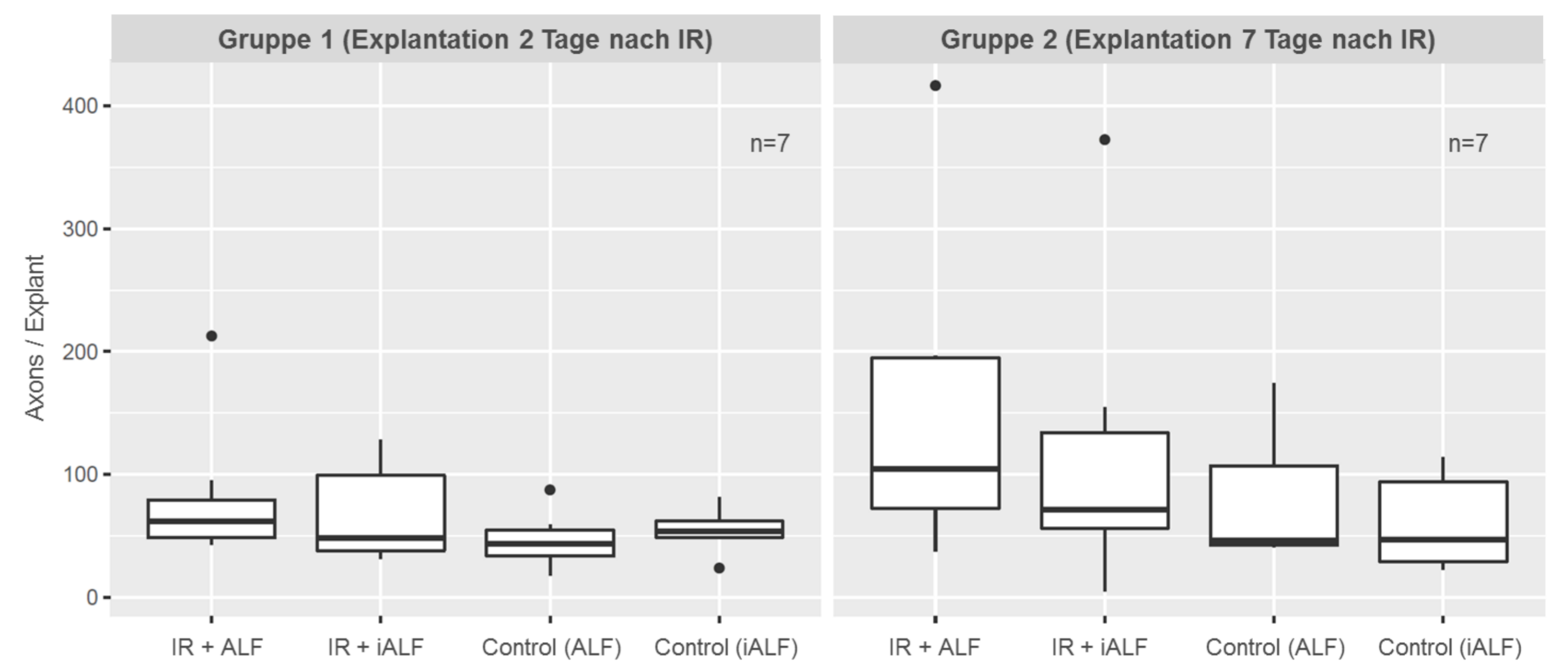


Abb. 3: RGZ-Axone pro Explantat (gemittelt pro Netzhaut) 6 Tage nach Kulturanlage. Auszählung am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss ApoTome) nach Immunhistochemie. Die retinale Schädigung durch IR re-induziert in vitro das intrinsische Regenerationspotential der RGZ. In den mit ALF-186 behandelten IR-Augen wuchsen im Schnitt die meisten Axone aus, die Unterschiede zu IR+iALF sind nicht statistisch signifikant. In Gruppe 2 wuchsen signifikant mehr Axone aus als in Gruppe 1.

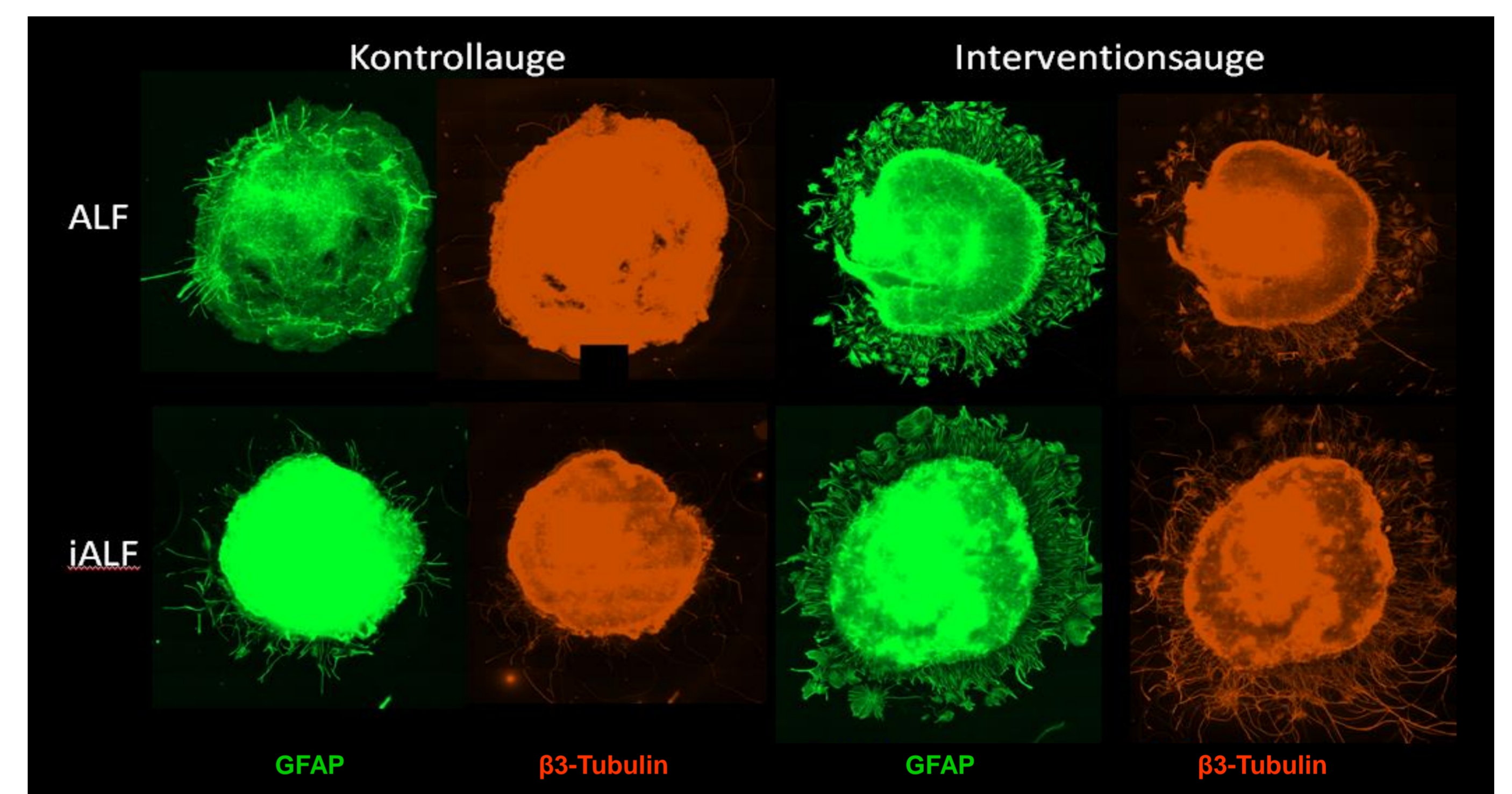


Abb. 4: Explantate (repräsentativ Gruppe 2).

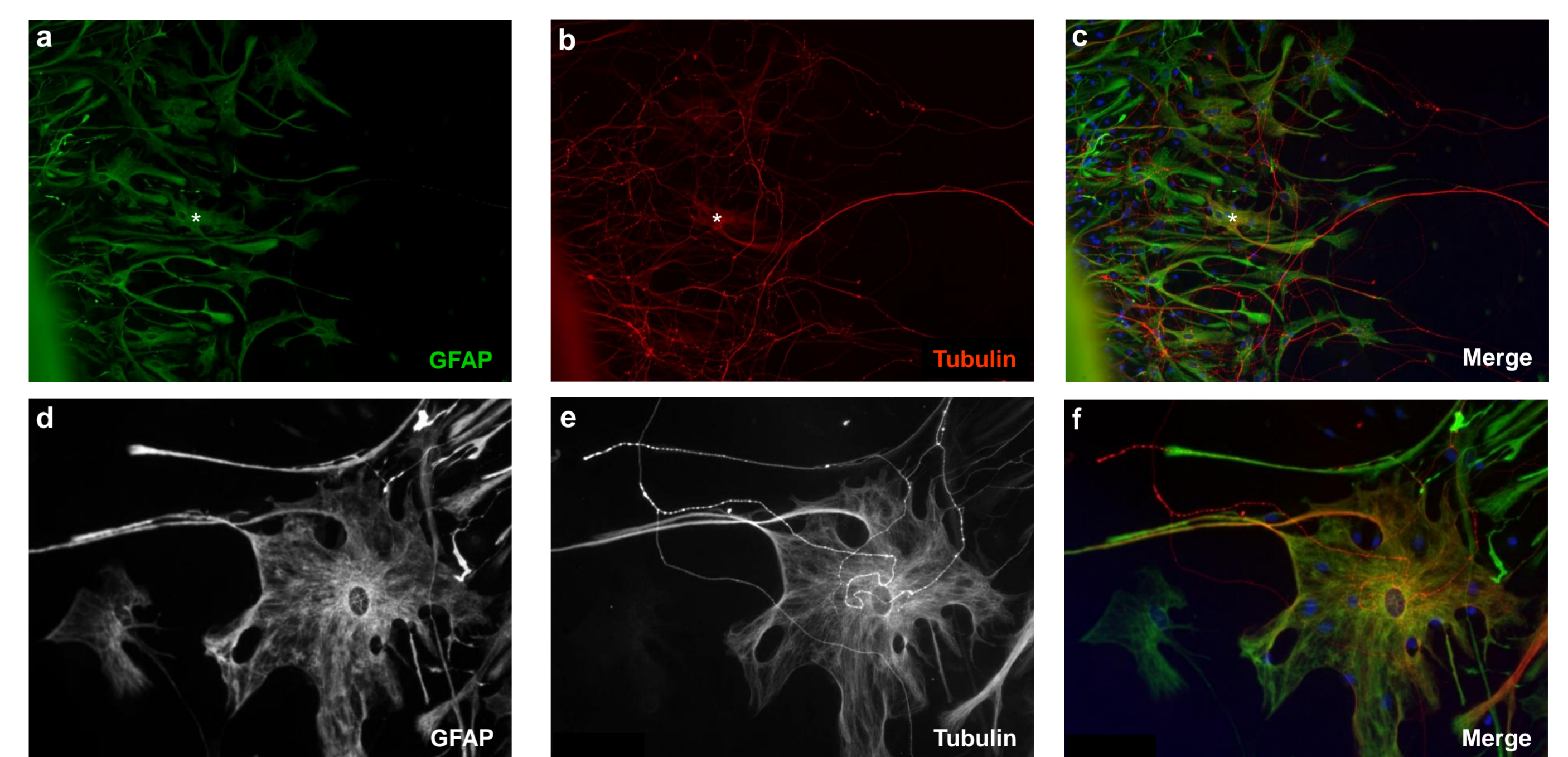


Abb. 5: Detailansicht Explantate nach IR+ALF. a+d: GFAP färbt Astrozyten und Müller-Zellen. b+e: β3-Tubulin färbt Axone und einzelne GFAP-positive Zellen (*). c+f: Merge; DAPI färbt Zellkerne. d-f: Verteilung Intermediärfilamente (GFAP) und Mikrotubuli (β3-Tubulin), 20x.

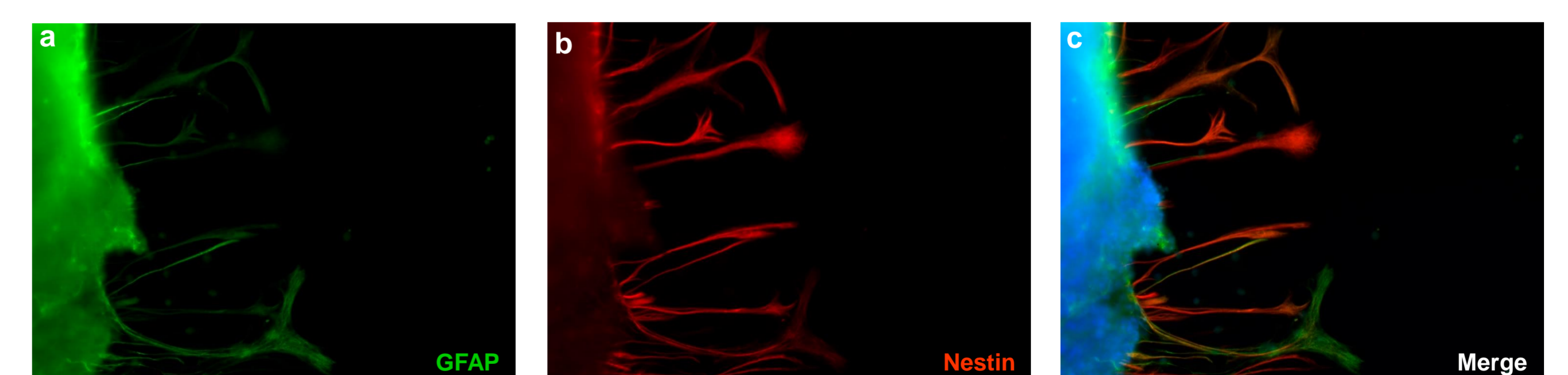


Abb. 6: GFAP⁺-Zellen koexprimieren ebenfalls Nestin. a: GFAP färbt Astrozyten und Müller-Zellen. b: Nestin färbt neuroepitheliale Stammzellen und Wachstumskegel differenzierender Neuronen. c: Merge; DAPI färbt Zellkerne.

möglicherweise auf die vermehrte Expression des wachstums-assoziierten Proteins 43 nach ALF-Behandlung zurückgeführt werden. Die Ischämie induziert die Migration GFAP-positiver Zellen aus dem Explantat. Ein hemmender Einfluss von ALF zeigt sich nicht. Die Bedeutung der Koexpression von GFAP und neuronalen Markern in vitro ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.