

Der Einfluss von Mikrofluidik auf das Wachstum retinaler Ganglienzellen *in vitro*

V. Deppe¹, C. Tater¹, M. Strake¹, K. Bemme¹, F. Rehfeldt², C. van Oterendorp¹

¹Klinik für Augenheilkunde, Universitätsmedizin Göttingen; ²Institut für Experimentalphysik I, Universität Bayreuth

Fragestellung

- *Mikrofluidik* = sehr geringe extrazelluläre Flüssigkeitsströme
- Auswirkungen auf RGC kaum erforscht: Beeinflussung der Wachstumsrichtung von Neuriten [1]; evtl. auch neurodegenerativ [2]
- *Relevanz*: Mikrofluidische Ströme im N. opticus vorhanden [3]; Mögliche Rolle für Integration und Differenzierung therapeutischer neuronaler Stammzellen?
- *Zielstellung*: Entwicklung Mikrofluidiksystem für RGC-Primärkulturen; Untersuchung morphologischer Veränderungen

Methodik

- Primäre retinale Zellkultur postnataler *Wistar*-Ratten (P0-6)
- 24 h Mikrofluidik-Exposition (Flussraten 10^{-7} bis 10^{-3} ml/min; entsprechen Wandschubspannungen von 10^{-7} bis 10^{-3} dyn/cm²)
- Identifikation von RGC mittels β -III-Tubulin-Immunfärbung
- Zellmorphologische Analyse mittels ImageJ-Software
- Zielparameter: RGC-Dichte, Neuritenlänge, Anzahl Neuriten pro Zelle

Ergebnisse

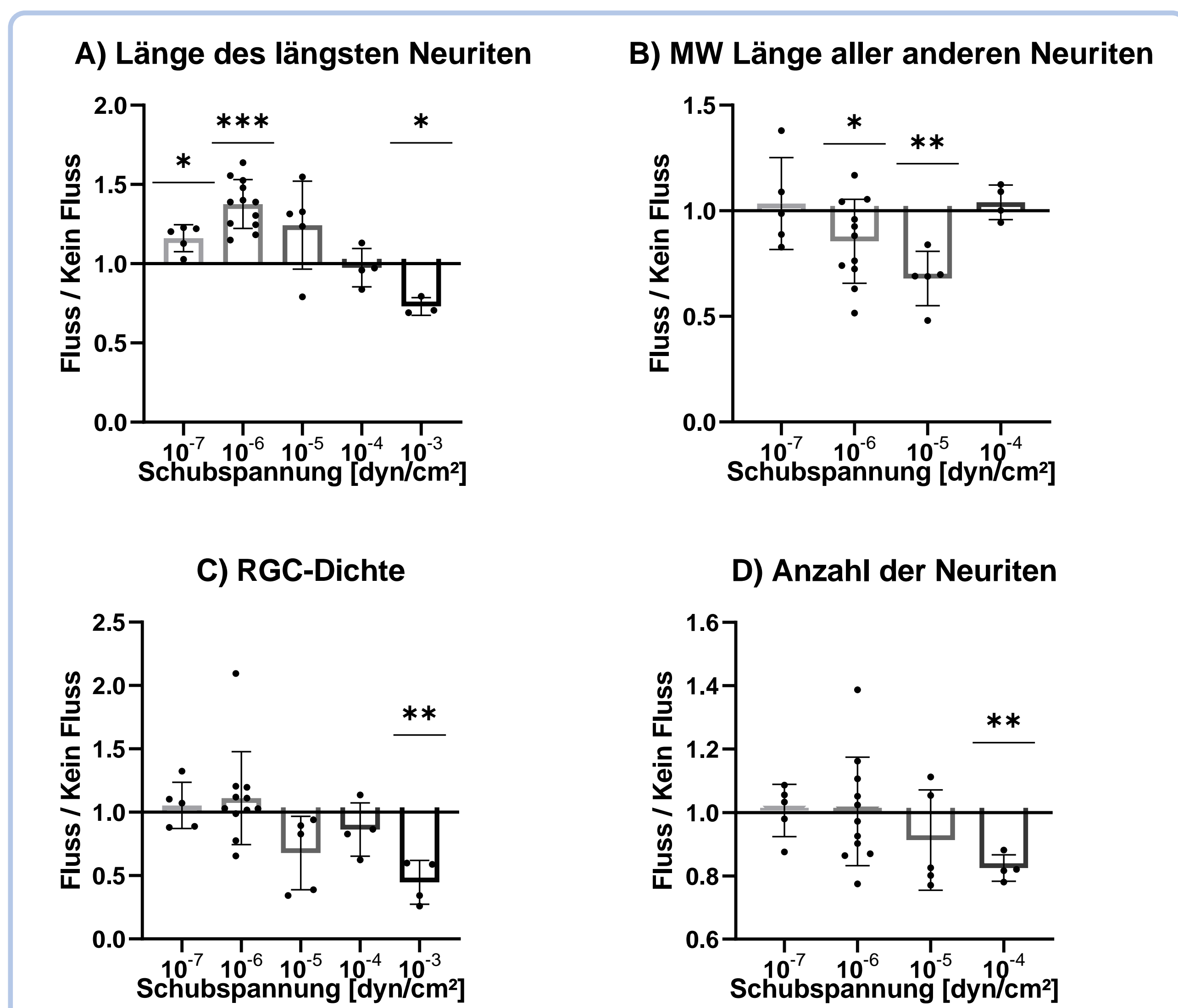


Abb. 1: Zellmorphologische Parameter. Gezeigt wird jeweils der Quotient aus Fluss und Kontrolle (Kein Fluss). Höhere Schubspannungen (10^{-3} dyn/cm²) wirken neurodegenerativ mit Reduktion von RGC-Dichte, Länge des längsten Neuriten und Neuritenanzahl. Schubspannungen unterhalb ca. 10^{-5} dyn/cm² fördern das Wachstum des längsten Neuriten und hemmen das Wachstum aller anderen Neuriten. (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Einstichproben-t-Tests)

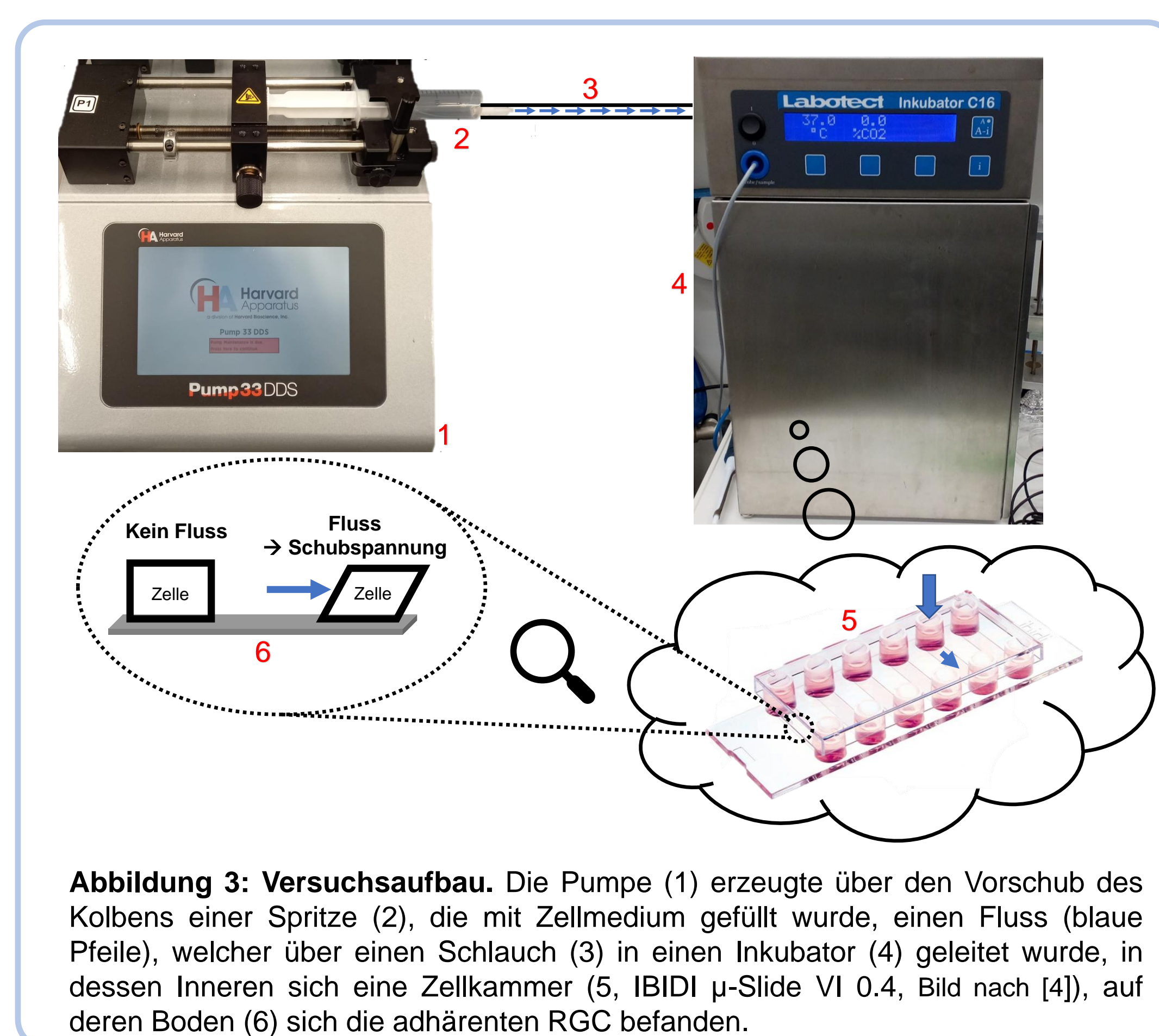


Abbildung 3: Versuchsaufbau. Die Pumpe (1) erzeugt über den Vorschub des Kolbens einer Spritze (2), die mit Zellmedium gefüllt wurde, einen Fluss (blaue Pfeile), welcher über einen Schlauch (3) in einen Inkubator (4) geleitet wurde, in dessen Inneren sich eine Zellkammer (5, IBIDI μ -Slide VI 0.4, Bild nach [4]), auf deren Boden (6) sich die adhärennten RGC befanden.

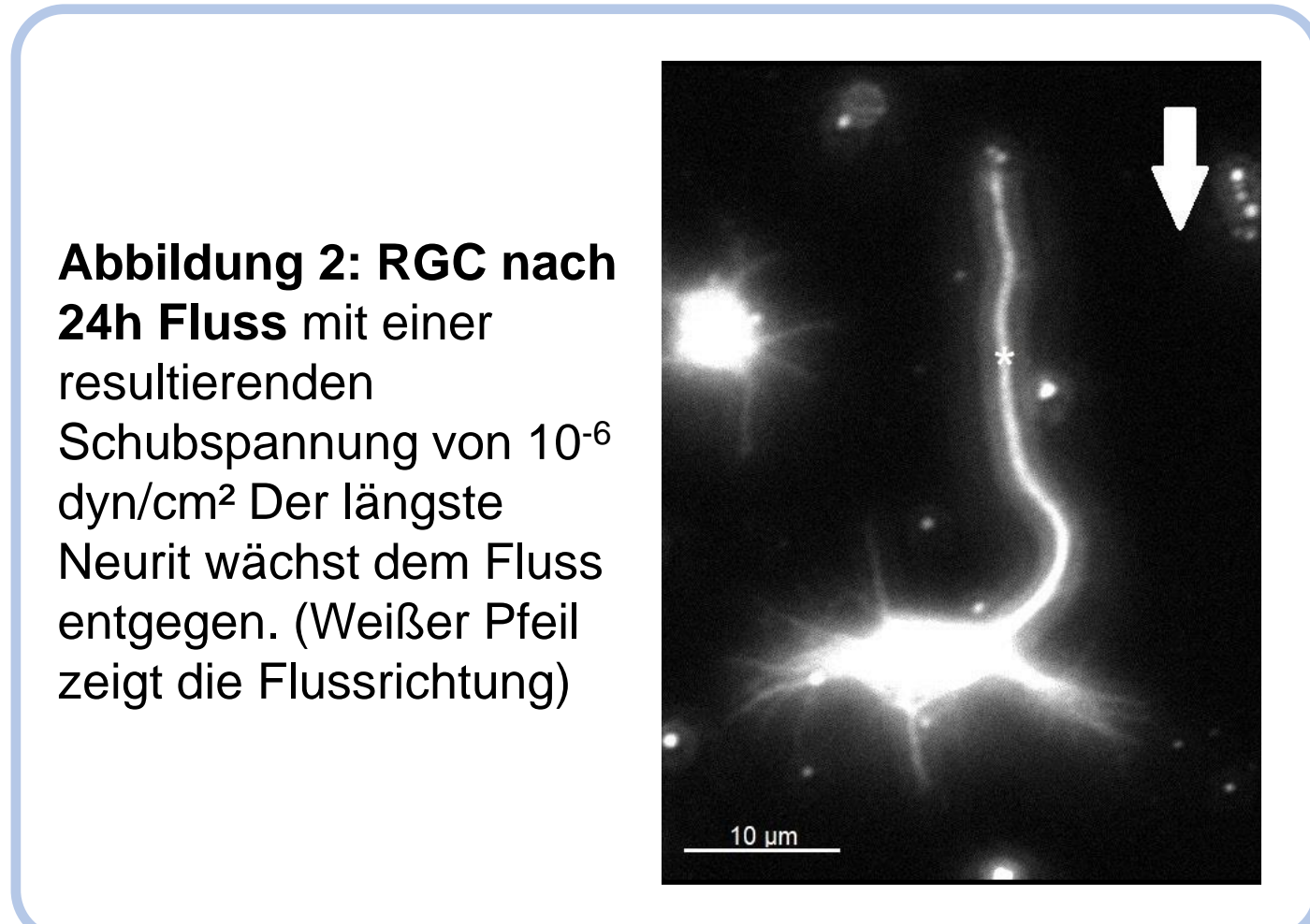


Abbildung 2: RGC nach 24h Fluss mit einer resultierenden Schubspannung von 10^{-6} dyn/cm². Der längste Neurit wächst dem Fluss entgegen. (Weißer Pfeil zeigt die Flussrichtung)

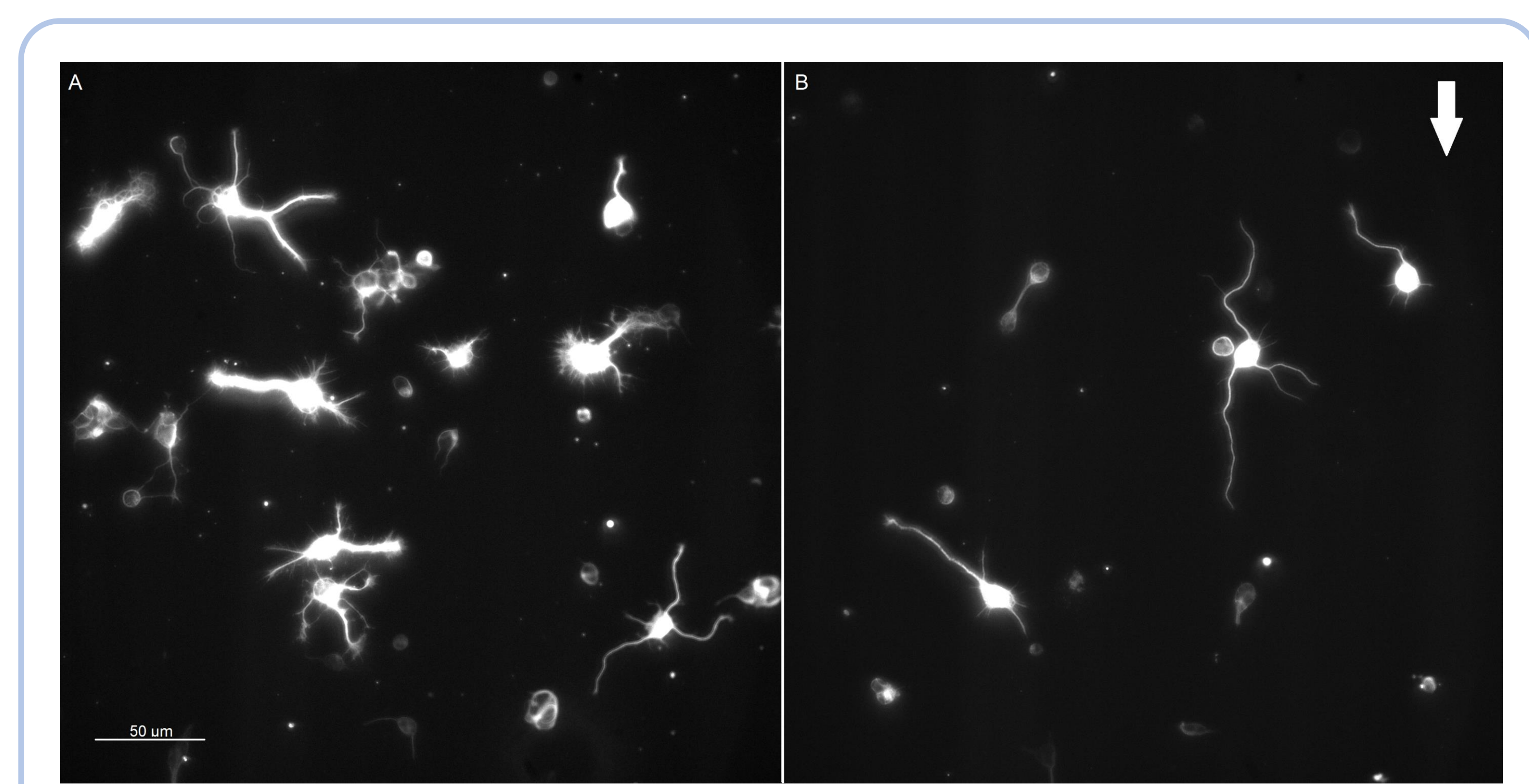


Abbildung 4: RGC in statischem Medium („Kein Fluss“) (A) und nach 24h Inkubation unter einer Fluss-induzierten Schubspannung in den Zellen von 10^{-5} dyn/cm² (B), wobei der Pfeil die Flussrichtung markiert. Die Strömung führt zu einem vermehrten Längenwachstum und teilweise einer Änderung der Wachstumsrichtung des längsten Neuriten, aus welchem sich in der Regel das Axon differenziert.

Schlussfolgerung

- Eine flussinduzierte Schubspannung von ca. 10^{-5} dyn/cm² markiert *in vitro* den **Umschlagpunkt**, ab dem neurodegenerative in differenzierungsfördernde Effekte auf RGC wechseln.
- Bei 10^{-6} dyn/cm² zeigt sich ein **differenzieller Effekt**: Während das Axon länger auswächst, werden die Dendriten in ihrem Wachstum gehemmt.
- Laufende Forschung: Die Effekte sind vermutlich **RGC-spezifisch** und werden nicht an kortikalen Neuronen beobachtet; **mechanosensitive Calciumkanäle** übertragen die Schubspannung nach intrazellulär; Änderungen der Wachstumsrichtung des längsten Neuriten auch bei kleinsten Flussraten

Deklaration
 1, 2, 3, 5: Keine Interessenskonflikte
 4 Förderung: Hr. Deppe: Studienstiftung des deutschen Volkes; Fr. Tater: Göttinger Promotionskolleg für Medizinstudierende

Kontakt
 vincent.deppe@stud.uni-goettingen.de
 christian.oterendorp@med.uni-goettingen.de

Quellen
 1. Gu L, Black B, Ordóñez S, Mondal A, Jain A, Mohanty S (2014): Microfluidic control of axonal guidance. *Sci Rep* 4, 6457
 2. Strake M, Rehfeldt F, Stanischka C, Lauermann P, Hoerauf H, van Oterendorp C: The effect of laminar flow on cultured retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth (2019).
 3. Key A, Retzius G (1873): Studien in der Anatomie des Nervensystemes. *Archiv f mikrosk Anatomie* 9, 308–386
 4. https://ibidi.com/channel-slides/57--slide-vi-04.html#/25-surface_modification-ibitreat_15_plymer_coverslip_tissue_culture_treated_sterilized/33-pcs_box-15_individually_packed