

Etablierung einer 3D Organkultur der Meibomdrüsen aus der Maus mittels Vibratom

I. Zahn¹, F. Garreis¹, V. Rötzer², J. Waschke², Y. Liu¹, F. Paulsen¹, J. Dietrich¹

¹Funktionelle und Klinische Anatomie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen;

²Anatomische Anstalt, Ludwig-Maximilians-Universität München, München;

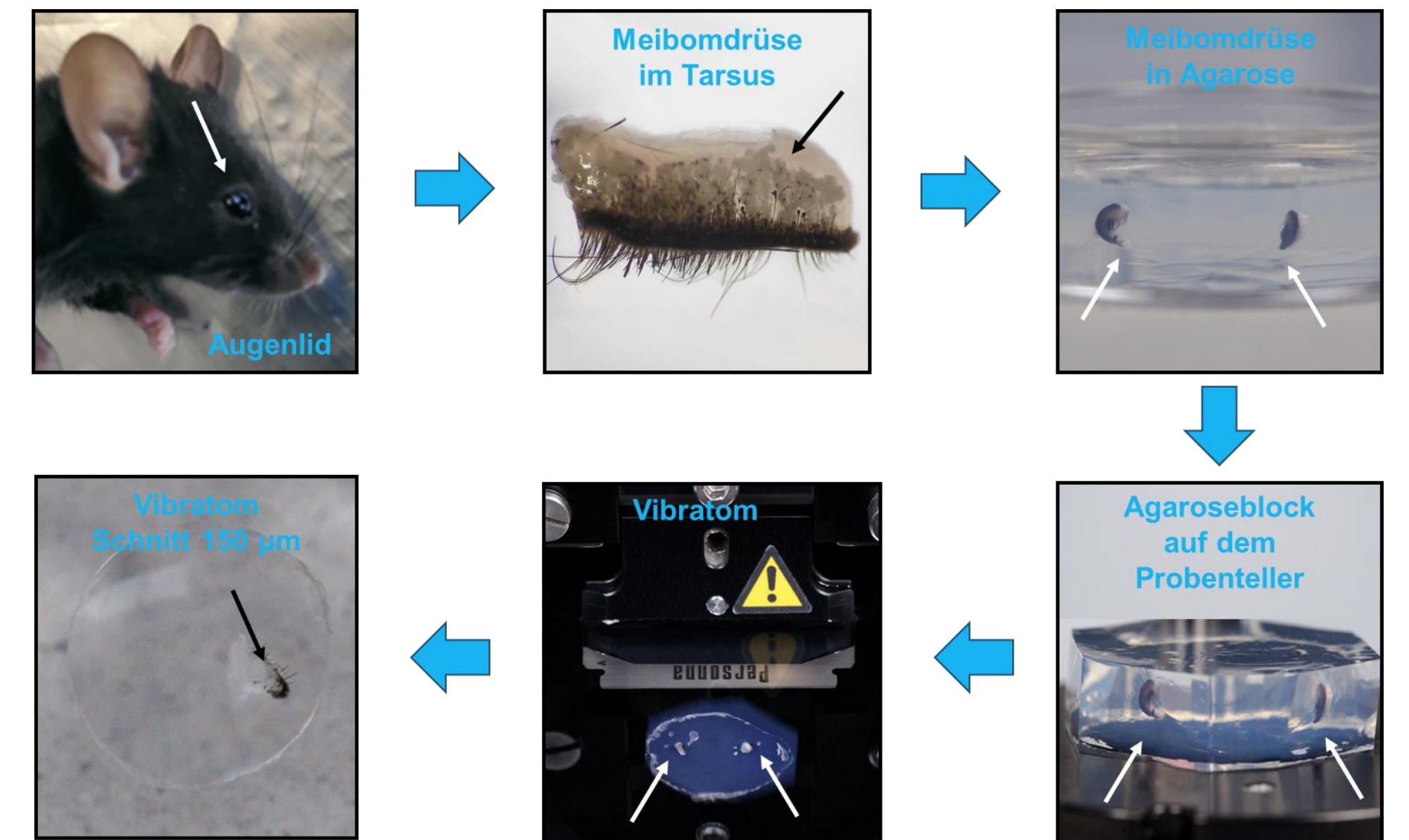
✉ jana1.dietrich@fau.de; friedrich.paulsen@fau.de

Einleitung

Die Meibomdrüsendifunktion ist die Hauptursache für die Entwicklung eines evaporativ Trockenen Auges. Die Pathomechanismen sind bisher nur in Ansätzen verstanden. Mechanistische Analysen beruhen hauptsächlich auf Untersuchungen an einer immortalisierten Zelllinie (ihMGEC), welche die *in vivo* Situation jedoch nur unzureichend repräsentiert. Deshalb war es das Ziel dieses Projektes ein physiologisches 3D Modell der Meibomdrüsen zu etablieren, um zukünftige experimentelle Forschungen zu optimieren. Dazu wurden 3D organtypische Schnittkulturen muriner Meibomdrüsen angefertigt und eine Langzeitkultivierung evaluiert.

Methoden

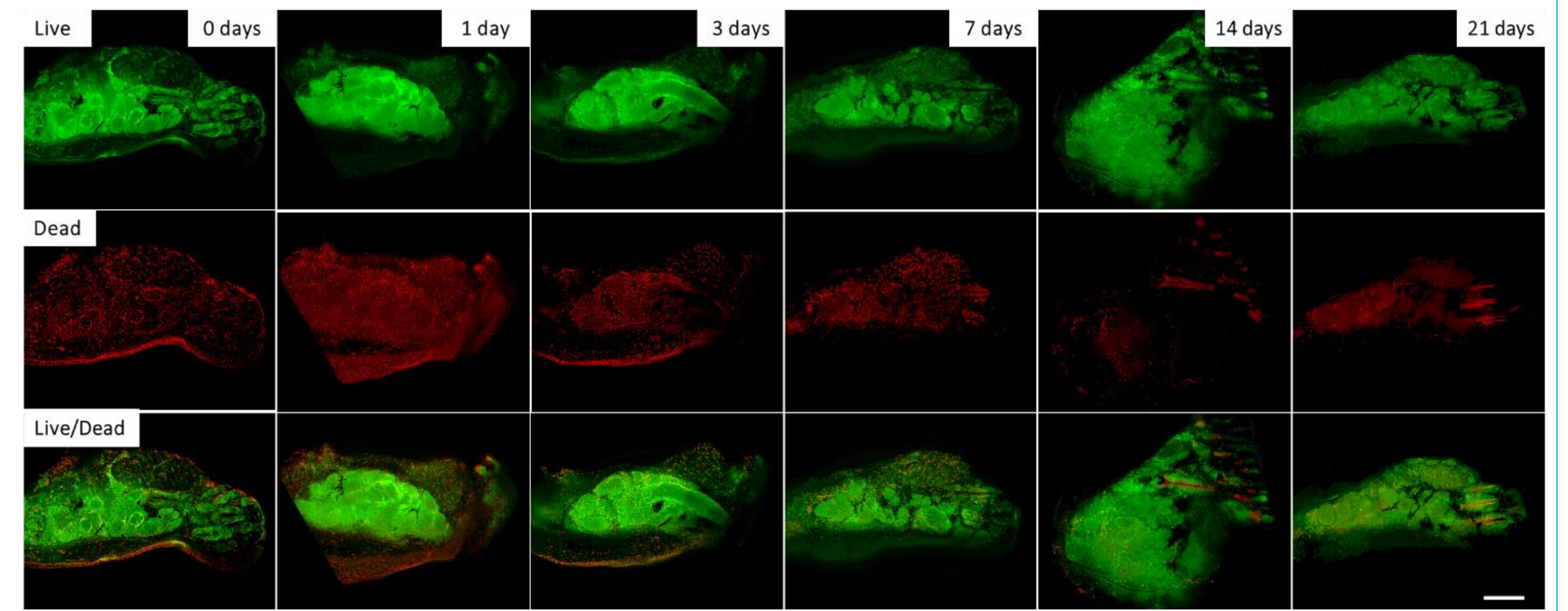
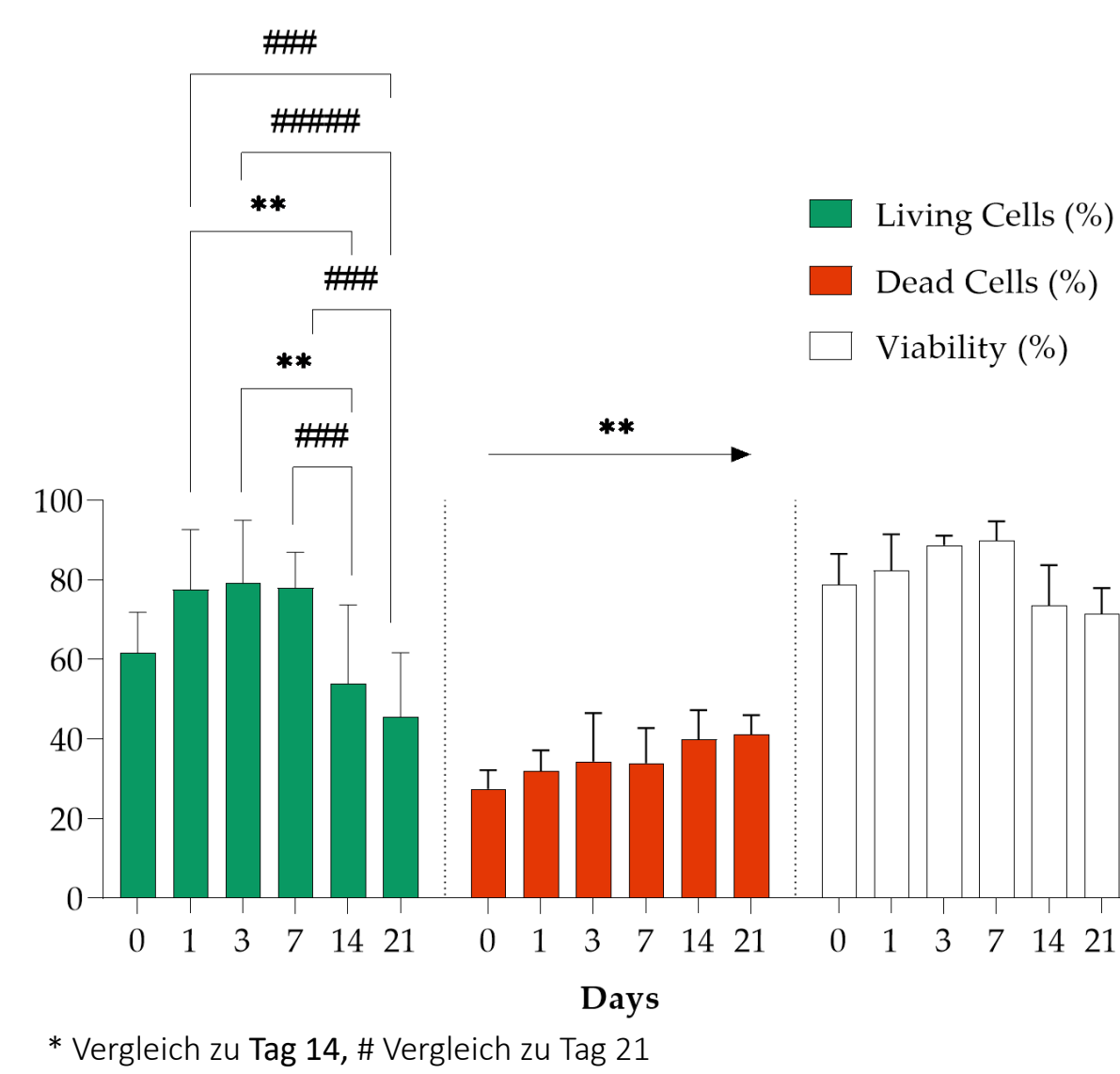
Meibomdrüsen wurden zusammen mit dem Tarsus aus den Oberlidern von Mäusen (BL/6J, 10 - 16 Wo, n=4) isoliert. Eingebettet in Agarose wurden mittels Vibratom sagittale Schnitte (150 µm) als 3D Schnittkulturen angefertigt. Die Schnittkulturen wurden für 21 Tage kultiviert. Dabei wurde die Viabilität mittels Viabilitätsassay und Lebend-Tod-Färbung bestimmt. Die Morphologie der Meibozyten wurde anhand (immun-)histologischer Färbungen und Transmissions-Elektronenmikroskopie beurteilt. Die Funktionalität der Meibozyten in den Schnittkulturen wurden über die Lipidproduktion mittels Lipid-Färbung ausgewertet.



Ergebnisse

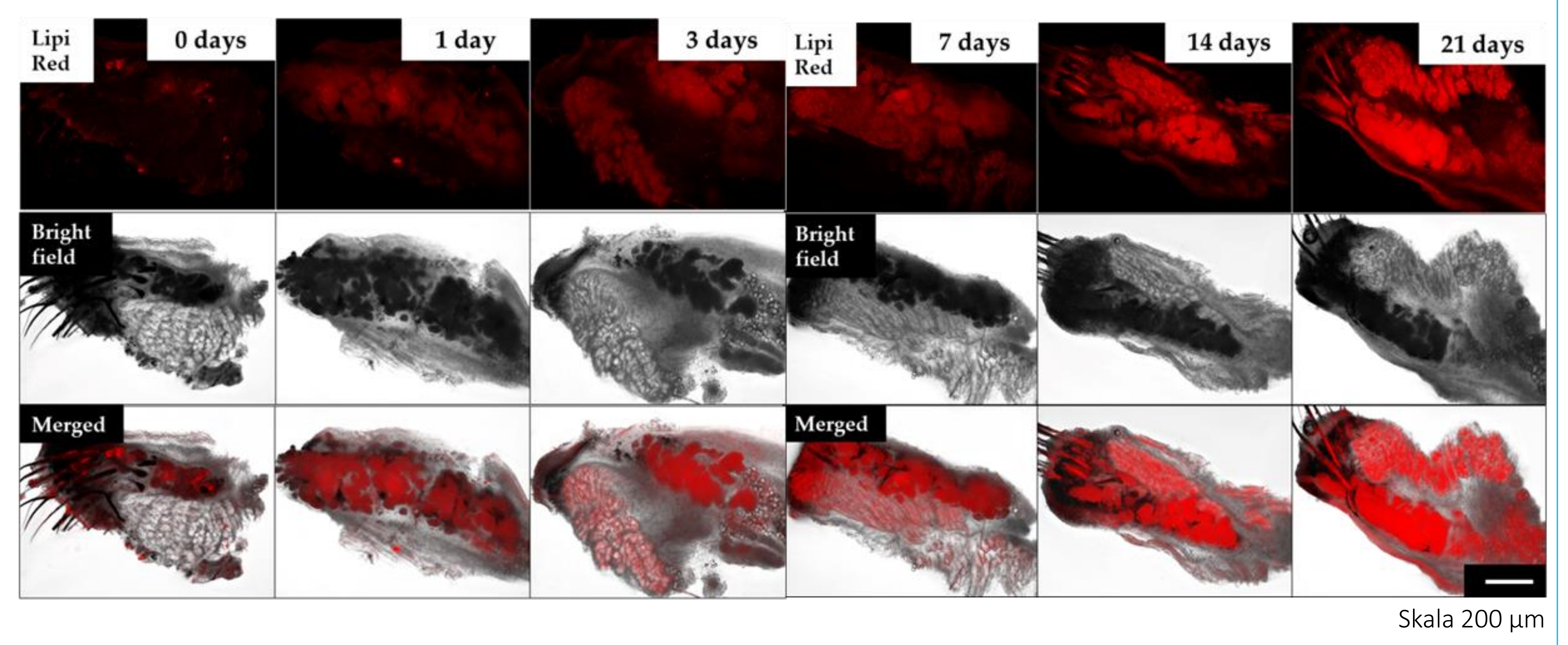
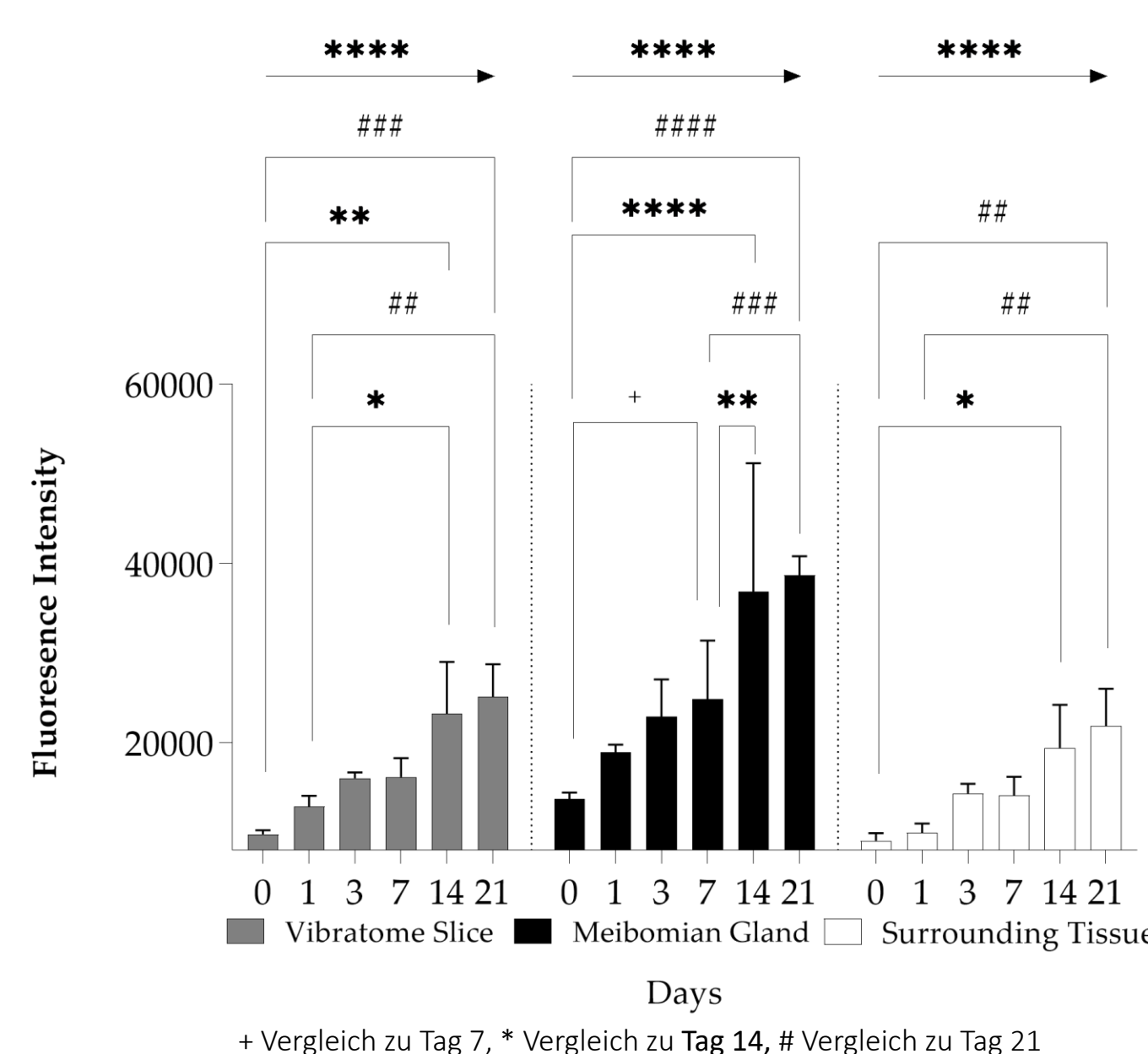
Viabilität

Die 3D organtypischen Schnittkulturen bestehen aus den Meibomdrüsen (19,1±5,0%), die in das umliegende Gewebe des Tarsus eingebettet sind. Durch eine Lebend-Tod-Färbung können lebende Zellen (grün) und tote Zellen (rot) visualisiert und als Zellen der Meibomdrüsen lokalisiert werden. Der Anteil lebender Zellen innerhalb der Meibomdrüsen stieg von 61,7±8,8% an Tag 0 auf 77,9±7,8% an Tag 7 und sank anschließend signifikant auf 45,6±14,0% an Tag 21 (p=0,0001, n=4 Mäuse).



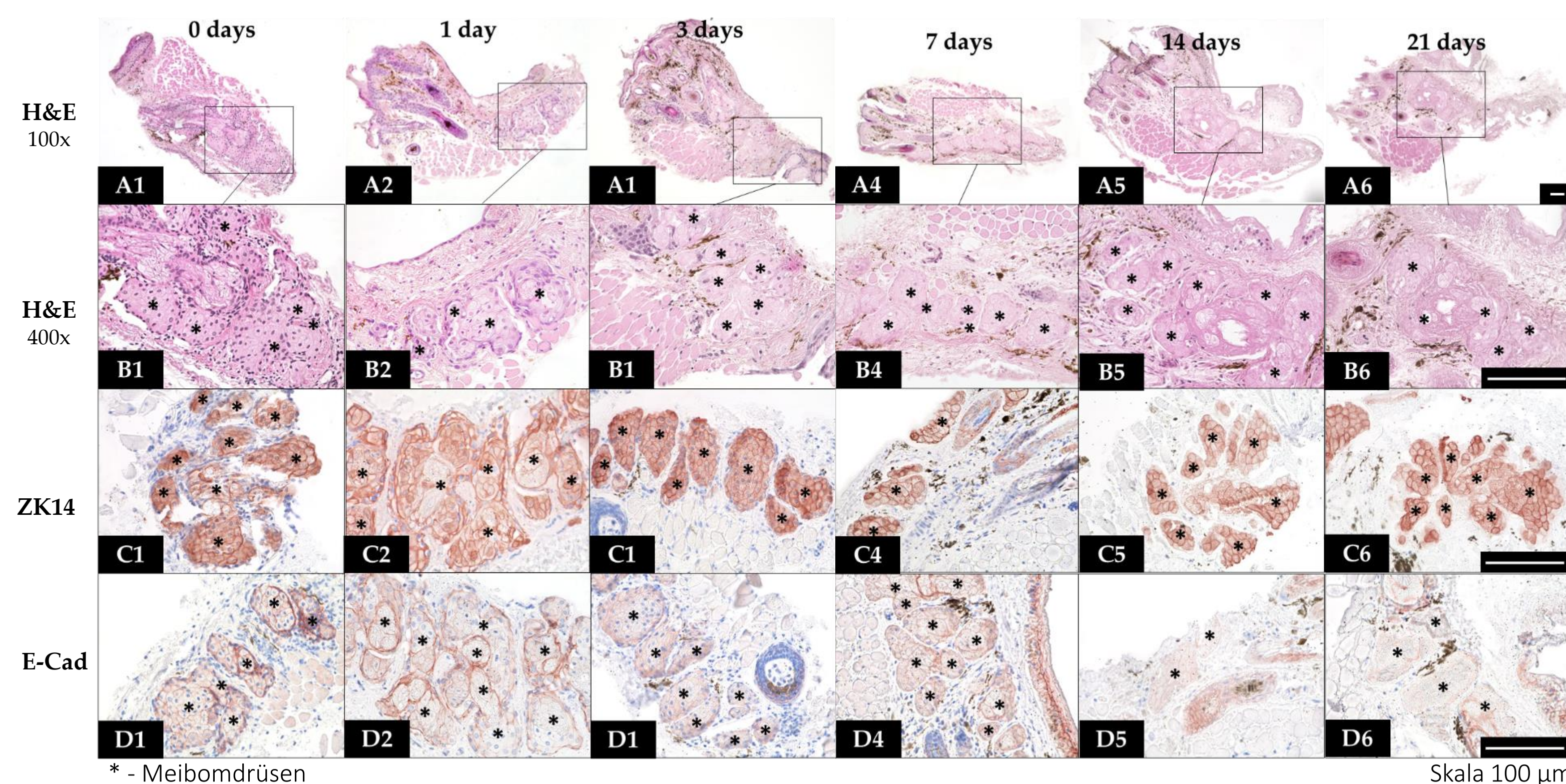
Lipidproduktion

Die Lipide wurden innerhalb der 3D organtypischen Schnittkulturen über Lipi-Red, ein fluoreszierender und lipophiler Farbstoff angefärbt. Im betrachteten Zeitraum von 21 Tagen kam es zu einer signifikanten und linearen Akkumulation von Lipiden. Dabei konnte der Großteil der Lipid-Tröpfchen in den Meibomdrüsen lokalisiert werden. In den Meibomdrüsen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Lipide ab Tag 7 (p=0,0123), die bis Tag 21 weiter anstieg.



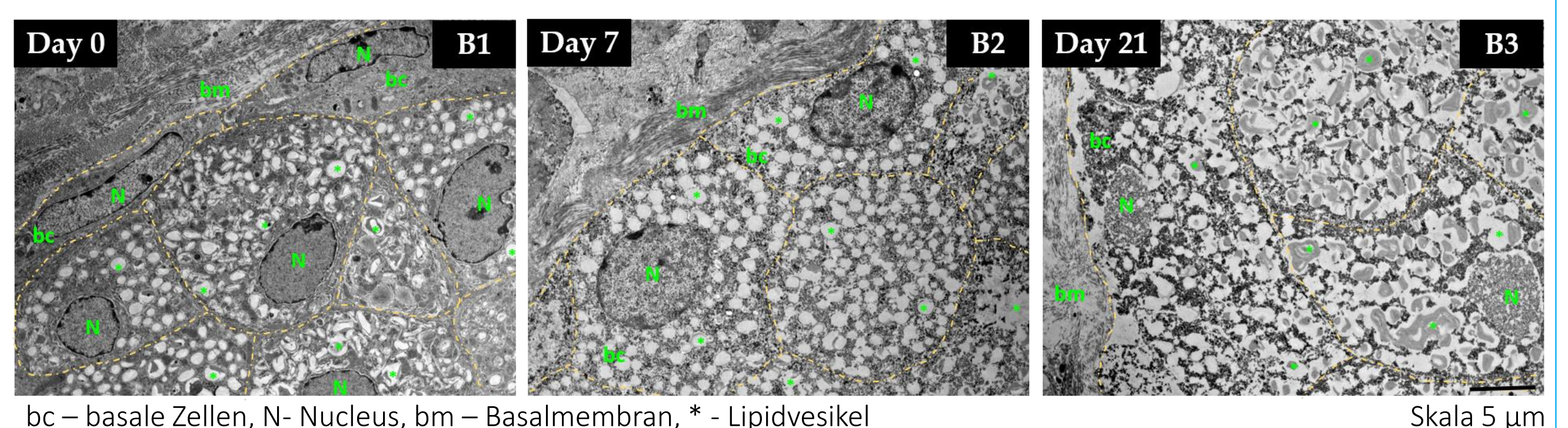
Morphologie

Histologisch zeigten sich bis Tag 7 keine Veränderungen. Ab Tag 14 kam es zur sichtbaren Gewebedegeneration und zu Zellkern-Veränderungen, die mit einer Abnahme der Anfärbbarkeit einherging. Die Expression des Zell-Adhäsionsproteins E-Cadherin (E-Cad) zeigte ab Tag 14 eine deutliche Abnahme. Im Gegensatz dazu blieb die Expression des epithelialen Markers Zytokeratin ZK14 über die 21 Tage hinweg unverändert.



TEM

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass mit zunehmender Kultivierungsdauer eine Differenzierung der basalen Meibozyten stattfand, ohne dass neue basale Meibozyten detektiert werden konnten.



Schlussfolgerung

Die Untersuchungen der 3D organtypischen Schnittkultur der Meibomdrüsen aus der Maus ergab, dass eine Langzeitkultivierung bis zu 7 Tage ohne Beeinträchtigung möglich ist. Damit kann die *ex vivo* Schnittkultur als physiologisches 3D Modell der Meibomdrüse verwendet werden und einen neuen experimentellen Ansatz im Rahmen der Erforschung der Meibomdrüsen sowie der Meibomdrüsendifunktion bei Trockenem Auge spielen.