

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
- Direktorin: Univ.-Prof. Dr. N. Eter -
Institut für experimentelle Ophthalmologie
- Leiter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos -

**Vergleichende immunhistochemische Untersuchung zwischen
normaler und diabetischer menschlicher Retina in Hinblick auf
neuronale und nicht-neuronale Antigene**

INAUGURAL–DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms–Universität Münster

vorgelegt von
Lunatschek, Amra
geb. Drljevic
aus Sarajevo/Bosnien-Herzegowina

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan:

Univ.- Prof. Dr. W. Schmitz

1. Berichterstatter:

Univ.- Prof. Dr. Dr. S. Thanos

2. Berichterstatter:

Priv.- Doz. Dr. C. E. Uhlig

Tag der mündlichen Prüfung:

22.12.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
Institut für experimentelle Ophthalmologie
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. C. E. Uhlig

Zusammenfassung

Vergleichende immunhistochemische Untersuchung zwischen normaler und diabetischer menschlicher Retina in Hinblick auf neuronale und nicht-neuronale Antigene

Amra Lunatschek

Der Diabetes mellitus führt von allen Systemerkrankungen am häufigsten zur Erblindung und die diabetische Retinopathie ist die häufigste mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes. Der genaue Pathomechanismus der Retinopathia diabetica ist noch nicht vollständig geklärt.

Ziel dieser Studie war es mit Hilfe von neuronalen, nichtneuronalen, glialen und vaskulären Antikörpern und Verfahren der Fluoreszenzfärbung verschiedene Antigene und Zellen in der normalen und diabetischen Retina darzustellen und diese miteinander zu vergleichen. So konnte die vorliegende Arbeit zu einer besseren Analyse von pathologischen Faktoren, die bei der Entstehung diabetischer Retinopathie beteiligt sind, beitragen.

Als Untersuchungsgut dienten vier humane Retinae; drei normale und eine diabetische Retina. Die Netzhäute wurden innerhalb von 12 bis 48 Stunden post mortem entnommen, und in dreiprozentiger Saccharose Lösung auf vier Grad Celsius aufbewahrt. In Saccharose aufbewahrte Retina wurde am Kryostat eingebettet und eingefroren. Anschließend wurden die Präparate zur Identifizierung und Lokalisation von Antigenen mit folgenden Antikörpern behandelt: Anti-von-Willebrand Faktor, GFAP, ED1, Mac2, OX42, Anti-Neurofilament, Anti-Rhodopsin, Anti-Human CD45. Nach der Färbung mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop.

Die diabetische Netzhaut zeigte vaskuläre, gliale und neuronale Abweichungen im Vergleich zu normalen Netzhäuten. Die vorliegenden Befunde deuten auf gliale Proliferation, Invasion und Reaktivierung von Mikroglia und Makrophagen bei der Entwicklung der diabetischen Retinopathie hin. Ebenfalls bestehen Hinweise auf eine vermehrte Neurodegeneration, insbesondere Ganglienzelldegeneration. In Zusammenhang mit dem Ganglienzelluntergang ist auch eine Degeneration der Photorezeptoren und anderen Neuronen anzunehmen.

Das hier untersuchte menschliche Material ist aufgrund seiner limitierten Anzahl begrenzt aussagefähig. Mehraufkommen des geeigneten Spendermaterials ist auch in der Zukunft nicht zu erwarten. Die Befunde passen zur der Annahme, dass die diabetische Retinopathie eine komplizierte Erkrankung ist, die sowohl das kapilläre als auch das gliale und neuronale Gewebe beteiligt.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2010

Für meine Familie

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGEs	Advanced glycation end products
APCs	Antigen-präsentierenden Zellen
BSA	0,1 % Albuminlösung
CD45	Antikörper zum Nachweis von Leukozyten
CGL	Corpus geniculatum laterale
DAG	1,2-Diacylglycerin
DR	Diabetische Retinopathie
ED1	Antikörper zum Nachweis von Gewebemakrophagen
EPCs	Endothelial progenitor cells
GCL	Ganglienzellschicht
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
IF	Intermediärfilamente
IRMA	Intraretinale Retinale Mikrovaskuläre Abnormalitäten
INL	Innere Körnerschicht
IPL	Innere plexiforme Schicht
Mac2	Anti- Makrophagen Antikörper
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
OFL	Äußere Faserschicht, Nervenfaserschicht
ONL	Äußere Körnerschicht
OPL	Äußere plexiforme Schicht
OX42	Antikörper zum Nachweis von aktivierten Mikroglia
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDR	proliferative DR
PKC	Proteinkinase C
VEGF	Vaskuloendothelialer Wachstumsfaktor
vWF	Von- Willebrand- Faktor

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Aufbau der Retina	2
1.2	Informationsweiterleitung des visuellen Systems	4
1.3	Retinales Gefäßsystem	5
1.4	Retinopathia diabetica	8
1.5	Intermediärfilamente	11
1.6	Antikörper und Zellen	12
1.6.1	Anti- von- Willebrand Faktor	12
1.6.2	GFAP	13
1.6.3	ED1	17
1.6.4	Mac2	18
1.6.5	OX42	18
1.6.6	Anti-Neurofilament	19
1.6.7	Anti- Rhodopsin	19
1.6.8	Anti- Human CD45	20
1.7	Ziel der Arbeit	20
2	MATERIAL UND METHODE	21
2.1	Methode	21
2.1.1	Gewebebegewinnung und Präparation der Netzhäute	21
2.1.2	Einbetten und Einfrieren	22
2.1.3	Immunfluoreszenz	23
2.1.4	Antikörper	23
2.1.5	Immunhistologische Färbemethode	25
2.1.6	Fluoreszenzmikroskopie	26
2.1.7	Auswertung	28
2.2	Material	28
2.2.1	Untersuchungsmaterial	28
2.2.2	Geräte	28
2.2.3	Verbrauchsmaterial	29
2.2.4	Chemikalien und Lösungen	29
2.2.5	Antikörper	30
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Antikörperfärbung und Fluoreszenzmikroskopie	33
3.2	Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie	33
3.2.1	Normale Retina	34
3.2.2	Diabetische Retina	37

3.3	Bildgebende Darstellung der Ergebnisse	40
3.3.1	Färbung mit Anti-Neurofilament.....	40
3.3.2	Färbung mit Anti-Rhodopsin	41
3.3.3	Färbung mit Anti-von Willebrand Faktor	42
3.3.4	Färbung mit Anti-human CD45	44
3.3.5	Färbung mit GFAP	45
3.3.6	Färbung mit ED1	46
3.3.7	Färbung mit Anti-Mac2.....	47
3.3.8	Färbung mit OX42	48
4	DISKUSSION.....	49
4.1	Vergleich der normalen und diabetischen Retina im Hinblick auf gliale Antigene.....	49
4.1.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	49
4.1.2	Proliferation des glialen Gewebes.....	50
4.1.3	Funktion der Mikroglia und Makrophagen in der Pathophysiologie der diabetischen Retinopathie	51
4.2	Vergleich der normalen und der diabetischen Retina im Hinblick auf nicht-neuronale Zellen in der Retina.....	54
4.2.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	54
4.2.2	Rolle der Leukozyten in der Pathogenese der diabetischen Retinopathie.....	54
4.3	Vergleich der normalen und der diabetischen Retina im Hinblick auf neuronale Antigene.....	56
4.3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse (Anti- Neurofilament)	56
4.3.2	Neuronale Degeneration	56
4.3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse (Anti- Rhodopsin).....	58
4.3.4	Photorezeptorendegeneration.....	59
4.4	Vergleich der normalen und der diabetischen Retina im Hinblick auf vaskuläre Antigene.....	60
4.4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
4.4.2	Mikroangiopathie und Angiogenese bei der diabetischen Retinopathie.....	61
4.5	Schlussfolgerung und methodologische Aspekte.....	63
5	LITERATURVERZEICHNIS	65

1 Einleitung

Der Diabetes mellitus führt von allen Systemerkrankungen am häufigsten zur Erblindung. Die diabetische Stoffwechsellage bewirkt auf drei Wegen, nämlich über ständige Hyperglukosämie, die sekundäre (symptomatische) Hyperlipoproteinämie und die Folgen der Mikroangiopathie charakteristische Augenveränderungen. Diejenigen an Retina, Linse und Iris stehen im Vordergrund.

Die Retinopathie ist die häufigste mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes. Sie zählt zum diabetischen Spätsyndrom, zeigt aber in der Regel schon früh während der Erkrankung Veränderungen im Augenhintergrund. Studien zeigen, dass nach 5-jähriger Diabetesdauer 67 % aller Patienten mit Typ 1-Diabetes [Malone et al. 2001] und ca. 36 % der Patienten mit Typ 2-Diabetes eine Retinopathie haben [UKPDS 1998]. Nach 15-20 Jahren kommt sie bei ca. 95 % aller Typ 1-Diabetiker und 50-80 % der Typ 2-Diabetiker vor [Klein 1984].

Die menschliche Retina ist ein komplex verschaltetes neuronales Netzwerk mit einem charakteristischen Aufbau. In ihr geschehen bereits wesentliche Teile der Bildverarbeitung, bevor die visuelle Information an das Gehirn weitergeleitet und in definierten kortikalen Bereichen zur bewussten Wahrnehmung aufbereitet wird [Moses und Hart 1987, Peichl 1989]. Die Komplexität des visuellen Systems spiegelt sich in der Organisation der Netzhautstrukturen wider. Die Netzhaut beinhaltet hierfür mehrere Ganglienzellklassen mit verschiedenen anatomischen und physiologischen Eigenschaften [Rodieck 1988, Kaplan et al. 1990].

1.1 Aufbau der Retina

Der komplexe Aufbau der Netzhaut (s. Abb. 1) weist folgende zehn Schichten auf:

1. Pigmentepithel
2. Schicht der Stäbchen und Zapfen (Außenglieder und Innenglieder der Sehzellen)
3. Stratum limitans externum
4. äußere Körnerschicht (Perikaryen der Sehzellen)
5. äußere plexiforme Schicht
6. innere Körnerschicht (bipolare Nervenzellen)
7. innere plexiforme Schicht
8. Ganglienzellschicht (multipolare Ganglienzellen)
9. Nervenfaserschicht
10. Stratum limitans internum

Typischerweise sind die verschiedenen Neuronentypen in mehreren Schichten angeordnet (s. Abb. 1). Sie bestehen aus Ganglienzellen, Amakrinzellen, Bipolarzellen, Horizontalzellen und Photorezeptoren [Schmidt & Thews 1997]

Die innere nukleäre Schicht entspricht dabei der Schicht der Bipolarzellen, während die äußere nukleäre Schicht den Zellkernen der Photorezeptoren entspricht. Funktionelle Verknüpfungen zwischen diesen Schichten und den Ganglienzellen finden sich in Form synaptischer Verbindungen in der inneren bzw. der äußeren plexiformen Schicht. Zusätzliche Verknüpfungen erfolgen durch Horizontalzellen und Amakrinzellen [Peichl 1989]. Die Photorezeptoren lassen sich (bei allen Primaten) in Stäbchen und Zapfen unterscheiden. Die Außensegmente der Photorezeptoren sind aus Zellmembranduplikaturen aufgebaut, in denen das Sehpigment (Rhodopsin) lokalisiert ist und in denen die eigentliche photochemische Reaktion stattfindet. Die photochemische

Reaktion führt zu einer Umwandlung des Lichtreizes in eine Membranpotentialschwankung, die wiederum in einen nervalen Impuls umgewandelt werden [Axenfeld & Pau 1992].

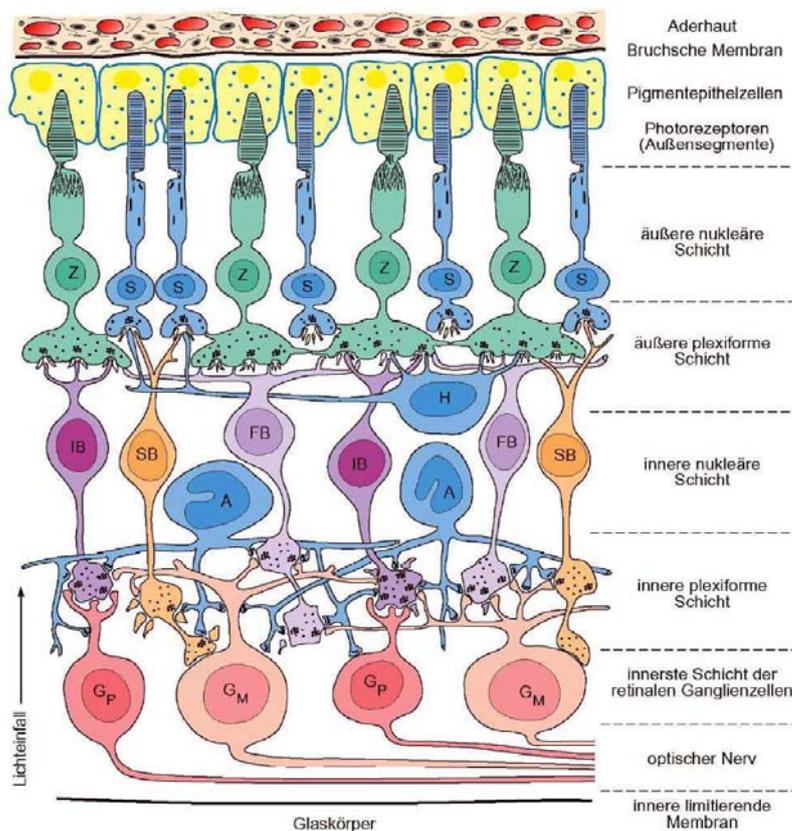


Abb. 1: Deetjen und Speckmann 1994

Bei beiden Zellarten weisen die Rezeptorfortsätze ein Außen- und ein Innenglied auf, die außerhalb des Stratum limitans externum (Gliagrenzmembran) liegen. Die kernhaltigen Zytoplasmagebiete der Rezeptorzellen liegen in der Gesamtheit der äußeren nukleären Schicht. Die Axone der Rezeptorzellen ziehen in die äußere plexiforme Schicht. Die Membrana limitans externa kommt durch Zellverbindungen zwischen Ausläufern der Müller-Zellen und den Zelleibern von Stäbchen- und Zapfenzellen zustande.

Die innere nukleäre Schicht enthält die Perikarya bipolarer Ganglienzellen (2. Neuron der Sehbahn), deren Dendriten in der äußeren plexiformen Schicht synaptischen Kontakt mit den Neuriten der Sinnesepithelzellen haben.

Die Bipolarzellen leiten über ihr Axon die Erregung in die innere plexiforme Schicht weiter, wo die Umschaltung auf das 3. Neuron der Sehbahn, die Nervenzelle der Ganglienzellschicht, erfolgt.

Außer bipolaren Zellen sind in der inneren nukleären Schicht Horizontalzellen, amakrine Zellen und die Zellkörper der Müller-Stützzellen vorhanden. Die Horizontalzellen und amakrinen Zellen können als Interneurone der Retina aufgefasst werden.

Die Ganglienzellschicht enthält großkernige multipolare Ganglienzellen. Ihre Dendriten liegen in der inneren plexiformen Schicht, ihre zunächst marklosen Axone ziehen in der Nervenfaserschicht zum Discus n. optici [Schiebler, Schmidt, Zilles 1999].

1.2 Informationsweiterleitung des visuellen Systems

Die Informationsverarbeitung des visuellen Systems beginnt in den Zapfen und Stäbchen. Sie stehen durch Horizontalzellen miteinander in Verbindung und sind synaptisch mit den Bipolarzellen verbunden. Bei den Bipolarzellen unterscheidet man die ON-Zellen, die mit einer Depolarisation Aktionspotentiale in den nachgeschalteten Ganglienzellen lösen und die OFF-Zellen, welche mit einer Hyperpolarisation die nachgeschalteten Ganglienzellen hemmen [Werblin, Dowling 1969, Werblin 1991].

Synaptische Querverbindungen zwischen den Bipolarzellen werden durch Amakrine-Zellen hergestellt.

Die Axone der Ganglienzellen laufen am Sehnervenkopf zusammen und bilden die Sehnerven. In der Sehbahn-Kreuzung kreuzen sich die nasalen Axone. Dagegen verlaufen die temporalen Axone beider Augen ungekreuzt. Jede Hirnhälfte erhält Informationen der entsprechenden Augenhälften und damit

aus dem gegenüberliegenden Gesichtsfeldbereich. Nach der Sehbahn-Kreuzung projizieren die meisten Axone der Ganglienzellen zum Corpus geniculatum laterale (CGL) [Perry et al. 1984, Lennie et al. 1990]. Das CGL besteht aus sechs Schichten.

Die Schichten 1,4 und 6 bekommen ihre Informationen aus dem kontralateralen Auge, die Schichten 2,3 und 5 aus dem ipsilateralen Auge.

Innerhalb der Schichten erhalten die benachbarten Neurone des CGL ihre Informationen von benachbarten Ganglienzellen der Netzhaut (Retinotopie). Die Axone der Zellen des CGL leiten schließlich die Sehinformation in die entsprechenden Schichten des primären Sehkortex [Kolb, Wishaw 1997, Dudel et al. 1996].

1.3 Retinales Gefäßsystem

Die Retina ist spärlich vaskularisiert. Außer A. centralis retinae und ihren Ästen sind nur wenige Kapillaren in der Schicht der Gangliazellen und bipolaren Zellen vorhanden. In der lichtempfindlichen Zellschicht fehlen Kapillaren meist. Diese relativ geringe Vaskularisation steht zur hohen glykolytischen Aktivität der Netzhaut in Beziehung. Zur Veränderungen der Retinagefäße bzw. zur stärkeren Vaskularisation und Angiogenese kommt es bei pathologischen Befunden z.B. bei Diabetes mellitus [Naumann et al. 1997].

Der arterielle Zufluss zum Auge kommt aus der Arteria ophtalmica, die sich in zwei Gefäßsysteme aufteilt:

1. Arteria centralis retinae versorgt hauptsächlich die inneren Schichten der Netzhaut
2. Das ziliare System versorgt hauptsächlich die Uvea sowie die äußeren Schichten der Retina

1. Arteria centralis retinae:

Die Arteria centralis retinae hat eine muskuläre Wand und ist eine echte Arterie. Sekundären und tertiären Aufzweigungen jenseits des Sehnervs stellen Arteriolen dar. Gelegentlich kommt eine zillioretinale Arterie vor. Sie stammt aus den hinteren kurzen Zillargefäßen und tritt am Papillenrand in die oberflächliche Retina ein.

Retinale Arteriolen sind Endarterien. Die Zweige der Arteria centralis retinae liegen in der Nervenfaserschicht. Die Arteriolen tauchen fast senkrecht in die Netzhautschichten ein und bilden mehrere Kapillarnetze. Sie reichen höchstens bis an den Außenrand der inneren Körnerschicht.

Das Kapillarnetz ist in der perifoveolaren Zone besonders dicht. Foveolarwärts sind die Kapillaren arkadenförmig angeordnet, nehmen an der Zahl ab und lassen die Fovea selbst frei. Zur Peripherie hin nimmt die Kapillardichte deutlich ab. In der Netzhaut außerhalb des Makulagebietes bilden die Kapillaren zwei Schichten, in der peripheren Netzhaut nur eine [Naumann et al. 1997].

Netzhautkapillare weisen zwei besondere Zelltypen auf, Endothelzellen und Perizyten. Die Endothelzellen kleiden das Lumen der Kapillaren aus und bilden ihre Basalmembran (s. Abb. 2). Die Endothelzellen einer retinalen Kapillare sind durch die sog. Zonula occludens fest miteinander verbunden: Nichtgefensterte Endothel-Auskleidung. Diese interzellulären Brücken verhindern den Durchfluss von Flüssigkeit aus dem Gefäßlumen und bilden einen Teil der Blut- Retina-Schranke. Neugebildete Gefäße einer Retinopathia proliferans bei der Retinopathia diabetica entwickeln qualitativ und quantitativ unvollständige oder fehlerhafte interzelluläre Zonule occludens mit entsprechenden Folgen.

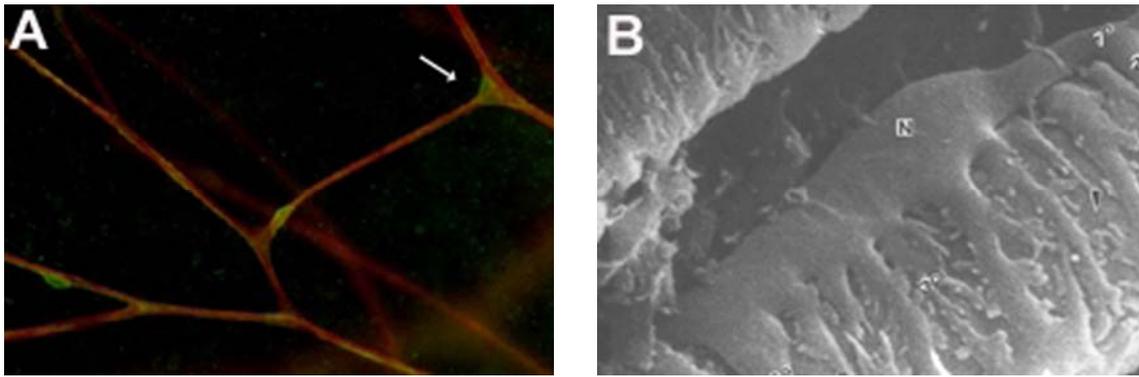


Abb. 2A-B: Auf Kapillaren sitzende Perizyten. A: Immunologische Darstellung von Perizyten, durch Fluorophor-Markierung eines perizyten-detectierenden Antigens NG-2 CSP [Ozerdem et al. 2002]. B: Elektronenmikroskopische Aufsicht: Man erkennt deutlich die pseudopodienartigen Zytoplasmaausläufer, mit denen der Perizyt die Endothelzellen umschließt, nach Kühnel, „Taschenatlas der Zytologie“, Thieme Verlag

Die Perizyten liegen der Basalmembran der Endothelzelle außen auf und bilden eine zweite Basalmembran als äußere Begrenzung der Kapillare (s. Abb. 2). Ein selektives Abfallen von Perizyten geschieht bei der Retinopathia diabetica. Perizytenabfall bewirkt eine Instabilisierung und Schwächung der Gefäßwand, es kommt zur Ausbildung von Gefäßanomalien wie Mikroaneurysmen und sog. azellulären Kapillaren, in denen die Endothelzellen abgestorben sind [Enge et al. 2002, Hammes et al. 2002, Hellström et al. 2001, Lindahl et al. 1997]. Die Gefäße werden von perivaskulärer Glia aus Astrozyten und Müllerschen Zellen umhüllt.

2. Ziliares bzw. Chorioidales Gefäßsystem

Im Aderhautgefäßsystem fehlt der allmähliche Übergang von größeren Gefäßen der Lamina vasculosa über Arteriolen zu Kapillaren. Stattdessen münden zahlreiche Arterien über eine kurze Zwischenstrecke in die Choriokapillaris ein, die in definitive anatomische und funktionelle Einheiten aufgegliedert ist. Im Gegensatz zu den Netzhautkapillaren ist die Endothel- Auskleidung der Choriocapillarisgefäße gefenstert und porös. Flüssigkeitsbewegungen zwischen der Aderhaut und den benachbarten Strukturen sind daher gut möglich. Die Blut- Retina- Schranke zwischen chorioidalen Gefäßen und Photorezeptoren

befindet sich am apikalen Teil des retinalen Pigmentepithels in der sog. Verhoeffschen Membran [Naumann et al. 1997].

1.4 Retinopathia diabetica

Die diabetische Retinopathie ist gekennzeichnet durch fortschreitende Veränderungen kleinster Gefäße innerhalb der Netzhaut [Klein et al. 1984].

Die international gebräuchlichste Nomenklatur zur Beschreibung der verschiedenen Veränderungen bei diabetischer Retinopathie unterscheidet folgende Stadien (s. Abb. 3):

1. nicht proliferative DR- mild
2. nicht proliferative DR- mäßig
3. nicht proliferative DR- schwer
4. proliferative DR (PDR)- mild (nicht papilläre Gefäßneubildungen in 1 oder mehreren Quadranten)
5. proliferative DR- mäßig (nicht papilläre Gefäßneubildungen in 1 oder mehreren Quadranten und papilläre Gefäßneubildungen)
6. proliferative DR- Hochrisiko (papilläre Gefäßneubildungen und Glaskörpereinblutung)
7. klinisch signifikantes Makulaödem und ischämische Makulopathie

[Lang et al. 2008]

Unter klinischen Gesichtspunkten erfolgt jedoch eine relativ grobe Unterteilung in das frühe nicht-proliferative und das späte proliferative Stadium.

Die erste klinische Veränderung des nicht-proliferativen Stadiums ist die Ausbildung von kapillären Mikroaneurysmen [Kohner 1982]. Auf histologischer Ebene geht der Entstehung von Mikroaneurysmen ein Verlust an Perizyten voraus, die den Endothelzellen der Kapillaren von außen aufliegen. Dieser initiale Perizytenverlust ist ein charakteristisches Merkmal der diabetischen Retinopathie [Cogan 1961]. Die Ausprägung der Erkrankung wird zu diesem

Zeitpunkt noch als "mild" beschrieben. Die weitere Zunahme an Mikroaneurysmen und die Präsenz perlschnurartiger Venen sowie einzelner intraretinaler Blutungen kennzeichnen den Übergang in das "mäßige" Stadium. Der in diesem Stadium beobachtete Anstieg der vaskulären Permeabilität und die damit verbundene Leckage von Plasmabestandteilen in den Extrazellularraum ist mit verantwortlich für die Ausbildung von Ödemen und die Verdickung der Basalmembran.

Die nicht-proliferative Retinopathie wird als "schwer" klassifiziert, sobald zahlreiche Mikroaneurysmen und Hämorrhagien in allen vier Quadranten der Retina, "perlschnurartige Venen" in zwei Quadranten oder intraretinale, mikrovaskuläre Anomalien (IRMA) in einem Quadranten zu finden sind. Auch die Anwesenheit von weichen, hell erscheinenden Exsudaten (Infarkte der Nervenschicht) und harten, gelblich aussehenden Exsudaten (Ablagerung von Lipiden in der äußeren Retinaschicht) weist auf eine Verschlechterung des Zustandes hin [Klein 1984].

Die Summe dieser Veränderungen führt letztlich zum Kapillarverschluss, woraufhin ganze Netzhautareale minderdurchblutet werden. In histologischen Präparaten beobachtet man eine vermehrte Anwesenheit von "azellulären Kapillaren", womit Basalmembranlayer gemeint sind, die weder Perizyten noch Endothelzellen beherbergen. Sie sind schlechter perfundiert, wodurch das umgebende Gewebe unzureichend mit Sauerstoff versorgt wird [Bresnick 1976]. Die dort vorherrschende Hypoxie ist die treibende Kraft für die Neubildung von Gefäßen [Patz 1982, Manschot, Lee 1985], was das Stadium der proliferativen Retinopathie kennzeichnet. Zunächst findet diese Neubildung von Gefäßen innerhalb der Netzhaut statt, später jedoch durchbrechen die Gefäße auch die innere Grenzmembran und breiten sich präretinal aus.

Die Glaskörpergrenzschicht liegt normalerweise dicht an der Retina an, daher wächst ein Teil der neu gebildeten Gefäße auch in den Glaskörper hinein. Aus noch ungeklärter Ursache kann es zu einer Schrumpfung des Glaskörpers kommen. Die eingewachsenen Gefäße üben einen Zug auf die Retina aus, wodurch diese an einigen Stellen abgehoben wird. Teilweise reißen die labilen

Gefäße und es kommt zu Blutungen in den Glaskörper. Einsprossende Bindegewebszellen können durch Matrixsynthese Membranen bilden, die durch Traktion ebenfalls zur Netzhautablösung beitragen.

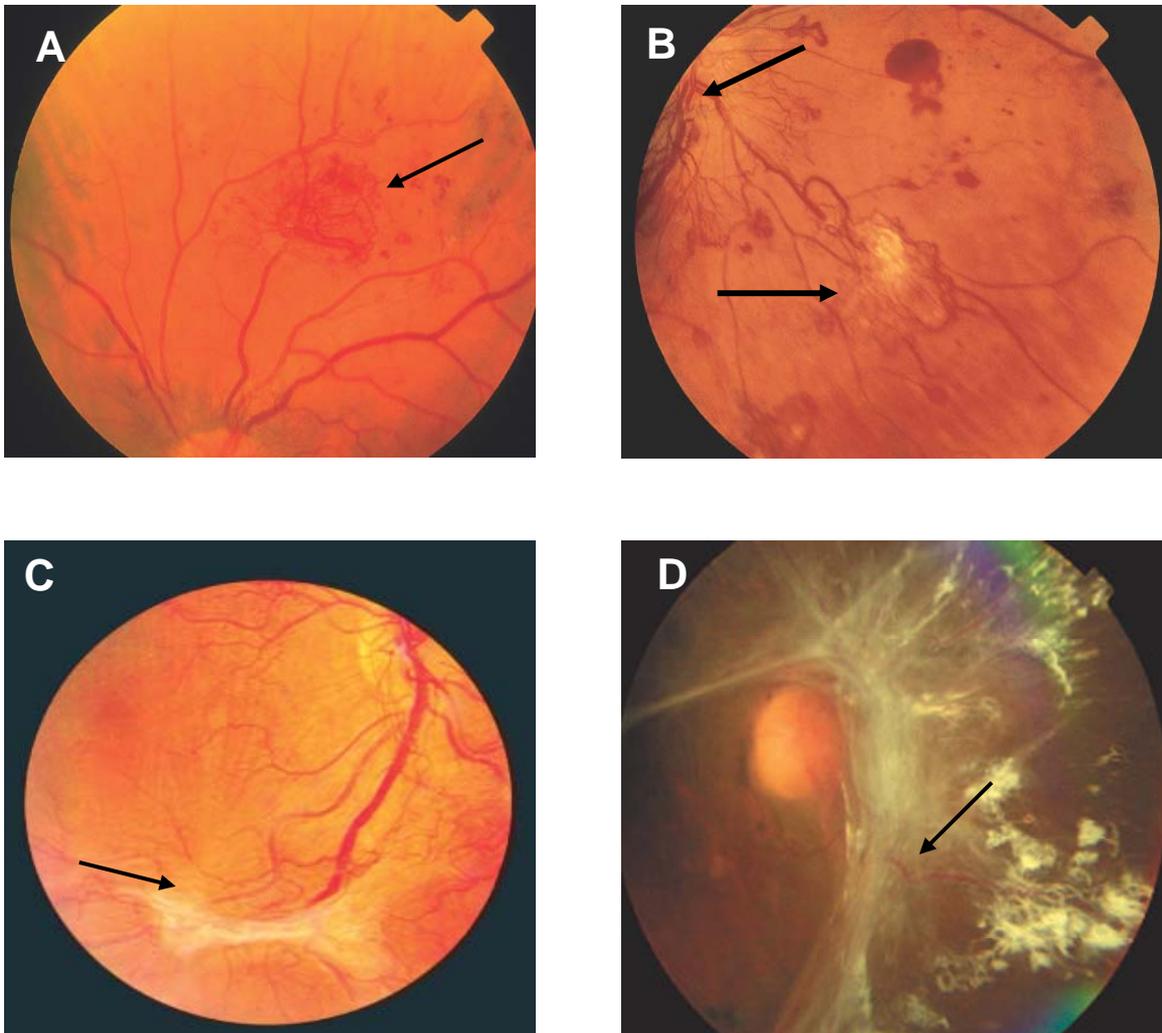


Abb. 3A-D: Proliferative diabetische Retinopathie. A: Neovaskularisationen vom nicht-papillärem Typ. B: Neovaskularisationen vom nicht-papillärem Typ (Pfeil unten), Neovaskularisationen vom papillären Typ (Pfeil oben). C: Vitreomakuläre Stränge mit retinaler Traktion. D: Traktionen mit Amotio retinae [Abbildungen entnommen aus Datenbank der Universitätsklinik Ulm – Augenklinik]

Diese Vorgänge erklären, warum das Risiko einer Erblindung bei Diabetikern im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung fünfmal höher liegt [Standl, Maurer 1997, Trautner 1997]. In den Industrieländern ist die DR eine der Hauptursachen für neu auftretende Erblindungen im Alter von 30- 60 Jahren [Lang et al. 2008].

1.5 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente sind intrazelluläre Bestandteile des Zellskeletts. Sie kommen in allen Zellen vor, jedoch unterscheidet sich die Ausstattung der Zelle damit erheblich. Intermediärfilamente (Filamenta intermedialia) sind im Zytoplasma einer Zelle gelegene Strukturen aus Proteinen, die der Erhöhung der mechanischen Stabilität der Zelle dienen. Sie strahlen auch in Zellverbindungen (Desmosomen, Hemidesmosomen) ein.

In erster Linie dienen Intermediärfilamente der Strukturierung und mechanischen Stabilisierung der Zelle. Wegen ihrer Struktur sind sie stabil und halten mehr aus als andere Bestandteile des Cytoskeletts, weswegen sie zahlreich in Zellen vorhanden sind, die mechanisch besonders beansprucht werden. Die Intermediärfilamente bilden in den meisten Zellen ein Netzwerk im Cytoplasma, treten in Kontakt zu Proteinen der Plasmamembran und sind im Bereich um den Kern angereichert [Reski 2002, Kiessling et al. 2000].

Der Durchmesser der IF beträgt meist um 10 nm. Man gliedert sie in verschiedene Typen:

1. Saure Keratine: Protein ist ein saures Keratin, kommen in Epithelien vor
2. Basische Keratine: Protein ist ein basisches Keratin, kommen in Epithelien vor
3. Desmin- Typ: Proteine sind GFAP in Gliazellen und Astrozyten vorkommend, Desmin in Muskelzellen vorkommend, Vimentin in Zellen mesenchymaler Herkunft vorkommend, Peripherin in zentralen und peripheren Neuronen vorkommend
4. Neurofilamente: Typ: Proteine sind NF-L in reifen peripheren und zentralen Neuronen vorkommend, Internexin in heranreifendem ZNS vorkommend, NF-M und NF-A in reifen peripheren und zentralen Neuronen vorkommend, Nestin in neuroepithelialen Stammzellen vorkommend

5. Lamin- Typ: Proteine sind Lamin A,B,C, kommen in allen Zellen (Zellkernen) vor [Reski 2002, Kiessling et al. 2000]

1.6 Antikörper und Zellen

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine vergleichende immunhistochemische Untersuchung zwischen normaler und diabetischer Retina in Hinblick auf verschiedene Antigene.

Um verschiedene Zelltypen in der Retina nachzuweisen fanden folgende Antikörper Verwendung:

1. Anti-von-Willebrand Faktor
2. GFAP
3. ED1
4. Mac2
5. OX42
6. Anti-Neurofilament 200 kD
7. Anti-Rhodopsin
8. Anti-Human CD45

1.6.1 Anti- von- Willebrand Faktor

Anti- von- Willebrand Faktor ist ein Plasmaglykoprotein, der von Endothelzellen synthetisiert wird. Er vermittelt die Thrombozytenadhaesion an das Subendothelium [Löffler, Petrides 1997].

Endotheliale Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPCs) sind im Blutstrom zirkulierende Zellen, die aus dem Knochenmark stammen. Sie haben die Fähigkeit, zu Endothelzellen zu differenzieren, welche dann Blutgefäße an

der Innenseite auskleiden. Dieser Vorgang, die Vaskulogenese läuft zum überwiegenden Teil während der Embryonalentwicklung ab. Diejenigen endothelialen Vorläuferzellen, die in Erwachsenen zirkulieren, sind demnach mit Angioblasten verwandt, die die Stammzellen sind, aus denen während der Embryogenese Blutgefäße hervorgehen. EPCs sind vermutlich Teil der pathologischen Angiogenese. Sie kommen in Fällen von Retinopathie und Tumorwachstum gehäuft vor [Alexander 1993, Geneser, Schwerdtfeger 1990].

1.6.2 GFAP

GFAP (Glial fibrillary acidic protein, „Saurer Gliafaserprotein“) ist ein Protein, welches als Intermediärfilament im Cytoplasma von Gliazellen (vor allem Astrozyten) im Zentralnervensystem vorkommt. Die Funktion ist bislang nicht vollständig geklärt, vermutlich kontrolliert es die Zellform und ermöglicht die Beweglichkeit der Astrozyten. Innerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) kommt GFAP überwiegend in Astrozyten vor, außerdem in bestimmten Stammzellen des ZNS, Müllerzellen, Bergman- Gliazellen und anderen Tumor-Gliazellen. GFAP kann mit gewisser Sicherheit als Marker für Astrozyten verwendet werden. GFAP wird aber auch in einigen Zelltypen außerhalb des ZNS exprimiert (z. B. Schwann-Zellen der peripheren Nerven). Wegen seines Vorkommens in Astrozyten spielt GFAP als Marker eine wesentliche Rolle bei der Diagnostik von Hirntumoren. Es wird typischerweise in glialen Tumoren (z. B. Astrozytome, Glioblastom, Ependymome und eine Reihe anderer glialer Tumore) exprimiert [Lassmann et al. 1991].

Gliazellen

Im Gehirn kommen neben Nervenzellen weitere Zelltypen vor, die unter dem Begriff Neuroglia zusammengefasst werden. Nach bisheriger Erkenntnis bilden die Gliazellen ein Stützgerüst für die Nervenzellen und sorgen für die gegenseitige elektrische Isolation der Nervenzellen. Zusätzlich sind sie am Stoff-

und Flüssigkeitstransport sowie an der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn beteiligt. Sie sind auch direkt am Prozess der Informationsverarbeitung, -speicherung und -weiterleitung im Nervensystem beteiligt.

Gliazellen können in Astrocyten, Oligodendroglia, Ependymzellen und Microglia eingeteilt werden. Bis auf die Microglia sind diese Zellen wie auch die Nervenzellen ektodermalen Ursprungs. Die Microglia leitet sich von fetalen Macrophagen ab und entstammt somit dem Mesoderm [Ling und Wong, 1993, Kaur et al. 2001].

Astrozyten

Astrocyten sind große sternförmige Zellen mit vielen Zellfortsätzen, die ein Drittel des menschlichen Gehirnvolumens einnehmen [Leonhardt 1985]. Sie besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose. Der Raum zwischen den Nervenzellfortsätzen in der Grauen Substanz wird nahezu vollständig von Astrocyten ausgefüllt. Mit ihren Fortsätzen trennen sie die synaptischen Endungen voneinander und sorgen für das Entfernen der Neurotransmitter. Außerdem bilden sie die so genannte Gliagrenzmembran (Membrana limitans gliae), die das Hirngewebe gegen Hirnhäute und Blutgefäße abgrenzt. Astrocyten sind für den Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn zuständig und versorgen die Neuronen mit Energiemetaboliten. Zusätzlich regulieren sie die Konzentration extrazellulärer Ionen und sind in der Lage Neurotransmitter sowohl aufzunehmen als auch auszuschütten, dadurch interagieren sie direkt mit den umliegenden Neuronen und modulieren deren Aktivität. [Kuffler, Nicholls 1966, Somjen 1979, Barres 1991, Hansson, Rönnbäck 2003]. In der Retina kommen sie in der Umgebung der marklosen Axonen der multipolaren Gangliazellen in der Nervenfaserschicht vor.

In Astrozyten kommt als Marker das Intermediärfilament GFAP (glial fibrillary acidic protein, „saures Gliafaserprotein“) vor. Die Bildung des Proteins wird durch krankhafte Veränderungen verstärkt [Lassmann et al. 1991].

Oligodendrocyten

Oligodendrocyten kommen vorwiegend in der weißen Substanz vor und bilden dort mit ihren lamellenartigen Fortsätzen die Myelinscheiden um die Axone der Nervenzellen. In der Grauen Substanz kommen sie als kleine Zellen mit wenigen, kaum verzweigten Fortsätzen vor, die den Nervenzellen unmittelbar anliegen und deren Funktion noch unbekannt ist [Baumann, Pham-Dinh 2001].

Ependymzellen

Ependymzellen bilden den einschichtigen Zellverband, der die Liquorräume des ZNS auskleidet. Apikal besitzen diese Zellen Kinocilien, die zur Liquorzirkulation beitragen [Reichenbach, Robinson 1995].

Microgliazellen

Microgliazellen machen bis zu 20 % der nicht-neuronalen Zellen des ZNS aus. Mikrogliazellen, auch als Hortega-Zellen oder Mesoglia bezeichnet, wandern aus dem Mesenchym über Blutgefäße in das Gehirn ein. Sie entstehen im Gegensatz zu allen anderen Gliazellen nicht während der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste und dem Neuralrohr, sondern aus Vorläuferzellen des blutbildenden Systems. Sie haben im zentralen Nervensystem eine ähnliche Funktion wie Makrophagen in anderen Geweben. Eine Voraussetzung für diese Funktion der Phagozytose ist jedoch eine spezielle molekulare Aktivierung. Sie befinden sich im gesunden Gehirn in einem Ruhezustand und erscheinen dann als kleine Zellen mit fein verzweigten Zellfortsätzen. Nach ihrer Aktivierung, zum Beispiel durch Verletzung oder Infektion, verwandeln sie sich zu den gewebetypischen Macrophagen des ZNS. Sie runden sich ab und gewinnen so die Fähigkeit zu amöboider Fortbewegung und Phagocytose [Santambrogio et al. 2001, Kalla et al. 2003]. Als Zellen des unspezifischen Immunsystems produzieren Microgliazellen Cytokine und cytotoxische Agentien wie Superoxid und NO [Aloisi 2001]. Außerdem können sie Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse II exprimieren, die der Antigenpräsentation dienen [Barron 1995, 2003].

Man unterscheidet also ruhende und aktive Mikroglia, was ein Hinweis auf deren die Zugehörigkeit zum monozytären Phagozytensystem darstellt. Dieses Verhalten wird bei Makrophagen ebenfalls beobachtet.

- Die Zellform der ruhenden Mikroglia ist geprägt durch feines, unregelmäßiges Fortsatzreichtum.
- Aktive Mikroglia reagieren auf Verletzungen des ZNS mit Hypertrophie und Proliferation. Sie unterscheiden sich von den inaktiven Formen durch stärker entwickelte Fortsätze.

Reaktive Mikroglia weisen charakteristische Verhaltensweisen auf. Nach ihrer Aktivierung kommt es zur Ansammlung der Zellen am Ort der Läsion, was durch die Fähigkeit zur amöboiden Fortbewegung ermöglicht wird. Anschließend werden durch Phagozytose bzw. Exozytose zytotoxischer Stoffe wie Wasserstoffperoxid oder Stickstoffmonoxid abgestorbenen Zellsubstanzen und Fremdkörper beseitigt. Nach Abbau von defektem körpereigenem und fremden Bestandteilen geben sie spezifische Zytokine (Interleukin-1, Tumor-Nekrose-Faktor α , Interferon- γ) in den Extrazellularraum ab was die Astrozytenproliferation und die Bildung von Gliazellen initiiert und weitere Immunreaktionen inhibiert.

Müller-Zellen, Gliocyts radialis

Eine spezielle Form der Gliazellen sind als die Bergmannglia im Kleinhirn und in der Retina als Müllerglia vorhanden.

Müller-Zellen sind große pyramidenförmige Zellen, deren Höhe annähernd der Dicke der Pars nervosa der Retina entspricht. Basal sind sie breit und bilden das Stratum limitans internum. Nach apikal verjüngen sie sich und gehen Zellverbindungen mit basalen Abschnitten von Photorezeptoren ein (Stratum limitans externum). Die äußerste Spitze der Müller-Zellen bilden einige Mikrowilli, die zwischen den Innengliedern der Photorezeptoren liegen. Der kerntragende Bereich der Müller-Zellen befindet sich im Stratum nucleare internum und setlich haben die zahlreiche Protrusionen, mit denen sie die

Neurone der Umgebung umgreifen und isolieren. Sie umschließen und stützen die Nervenzellen und Nervenzellfortsätze der Retina. Es wird angenommen, dass Müller-Zellen eine hohe Stoffwechselrate haben, mit den Nervenzellen der Retina in Stoffaustausch stehen und Stützfunktion ausüben. Ihre Bedeutung für die Netzhaut entspricht wohl der der Astrozyten für das ZNS [Naumann et al. 1997].

1.6.3 ED1

ED1 zeigt Glykoproteineinzellketten, die vorwiegend in lysosomalen Membranen von Myelozyten vorkommen. Das Antigen wird bevorzugt von Gewebemakrophagen und Mikroglia in nicht entzündlichem Zustand und schwach von peripheren Granulozyten exprimiert.

Makrophagen

Makrophagen gehören zu den Fresszellen (Phagozyten) und sind als Leukozyten Zellen des Immunsystems. Sie dienen der Beseitigung von Mikroorganismen durch Phagozytose und stellen stammesgeschichtlich die vermutlich ältesten Vermittler der angeborenen Immunabwehr dar.

Monozyten entwickeln sich im Knochenmark und wandern in die Blutgefäße, in denen sie im Blutstrom durch den Körper zirkulieren. Kommen sie währenddessen in Kontakt mit Infektionen, sind sie wie neutrophile Granulozyten in der Lage, verstärkt in das betroffene Gewebe einzuwandern. Dort differenzieren sie sich unter Einfluss von Cytokinen und Erreger-Substanzen in Makrophagen.

Nach Stimulierung können sie verschiedene Formen annehmen: Einige vergrößern stark ihr Cytoplasma und werden dann Epitheloidzellen genannt, wegen ihrer Ähnlichkeit zu epithelialen Zellen. Aktivierte Makrophagen können auch fusionieren und mehrkernige Riesenzellen bilden, um größere Fremdkörper zwecks Phagozytose zu umschließen [Hof 2005]. Um ihre

Lokalisierung in verschiedenen Geweben zu beschreiben wurden ihnen spezielle Bezeichnungen gegeben. Im zentralen Nervensystem heißen sie Mikrogliazellen.

1.6.4 Mac2

Das Mac2 Antigen wird bevorzugt von nicht entzündlichen Makrophagen exprimiert und diente zu deren Nachweis.

1.6.5 OX42

Der OX42 Antikörper markiert aktivierte Makrophagen bzw. reaktive Mikroglia, dendritische Zellen, Granulozyten und Zellen mit der Mikroglia-morphologie.

Aktivierte Makrophagen

Körperfremde Proteine oder Glycoproteine, wie etwa auf der Oberfläche von Viren und Bakterien, werden im Gewebe von Makrophagen erkannt. In dem Phagozytose Prozess werden die Mikroorganismen aufgenommen oder aktiv „umflossen“ und teilweise intrazellulär zerkleinert. Gleichzeitig werden durch auf diese Art „aktivierte“ Makrophagen und neutrophile Granulozyten chemische Lockstoffe (Chemokine) freigesetzt, die weitere Zellen ihrer Art aus dem Blutstrom rekrutieren. Freigesetzte Cytokine sorgen zusätzlich für eine lokale Entzündung. Die Bestandteile des zuvor aufgenommenen Erregers werden anschließend an die Zelloberfläche des Makrophagen transportiert und mit ihr durch ein MHC-II-Molekül verbunden. Neben dieser Aktivierung der Immunabwehr beseitigen Makrophagen auch gealterte, zerstörte körpereigene Zellen. Nach einer erfolgreich bekämpften Infektion sind Makrophagen an Heilungsprozessen beteiligt, indem sie die Narbenbildung und die Angiogenese fördern [Hof 2005, Chitu, Stanley 2006, Gordon et al. 1992].

1.6.6 Anti-Neurofilament

Neurofilamente sind fadenförmige Proteinmoleküle in der Zytoplasma von Gangliazellen. Sie sind Bestandteile des Zytoskeletts und gehören zu Intermediärfilamenten. Sie stabilisieren die komplexe Struktur der Nervenzelle und unterstützen den axonalen Transport. In der Retina zeigen sich die Neurofilamente in der Nervenfaserschicht, die aus gebündelten marklosen Axonen der multipolaren Gangliazellen besteht [Naumann et al. 1997].

1.6.7 Anti- Rhodopsin

Rhodopsin auch Sehpigment genannt ist ein aus Opsin und Retinal zusammengesetztes, in der Photorezeptorenschicht der Retina vorkommendes Protein. Photorezeptoren kommen als Stäbchenzellen und Zapfenzellen vor. Die beiden Zellarten unterscheiden sich morphologisch im Aussehen und Aufbau ihrer lichtempfindlichen Abschnitte. Eines sind zylindrisch bzw. stäbchenförmig, die anderen sind nach apikal hin verschmälert und dadurch zapfenförmig. Funktionell sind die Stäbchenzellen für das Schwarzweißsehen bei schwacher Beleuchtung, die Zapfenzellen für das Farbsehen bei heller Beleuchtung verantwortlich

Die Membranen der abgeflachten Bläschen der Stäbchenzellen enthalten Rhodopsin, der etwa 30 % des einfallenden Lichtes absorbiert. Den Rest nehmen die Pigmentzellen der Pigmentschicht der Retina und Chorioidea auf. Rhodopsin zerfällt bei Belichtung und wird farblos. Dieser photochemische Prozess löst eine Reaktionskaskade aus. Diese bewirkt über mehrere Zwischenstufen eine Hyperpolarisation der Zellmembran, die passiv auf die Synapsen an den Endkolben der Stäbchenzellen übertragen wird [Naumann et al. 1997].

1.6.8 Anti- Human CD45

CD45 Antigen ist ein Protein, das an allen humanen Leukozyten und deren Vorlaufzellen aus dem Knochenmark präsentiert wird. CD45 dient zum Nachweis von Leukozyten im peripheren Blut und deren Infiltration ins Gewebe.

Leukozyten sind Blutzellen, die als Abwehrzellen (Immunzellen) wichtige Aufgaben bei der unspezifischen und spezifischen Abwehr im Immunsystem übernehmen [Löffler, Petrides 1997].

1.7 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden normale und diabetische humane Retina unter Fluoreszenzmikroskop analysiert und miteinander verglichen. Um verschiedene Zelltypen bzw. Antigene (im Kapitel 1.6 beschrieben) in der Netzhaut nachzuweisen wurden 8 Antikörper benutzt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die normale und die diabetische Retina im Hinblick auf neuronale, nichtneuronale, vaskuläre und gliale Antigene zu vergleichen. Dieser Vergleich und das Vorkommen von bestimmten Antigenen und Zellen könnten dem besseren Verständnis über Pathologie der diabetischen Retinopathie beitragen. Ebenfalls könnten sie einer besseren Analyse von pathophysiologischen Mechanismen der diabetischen Retinopathie und zellulären Antworten auf Änderungen im Auge und in der Retina, die durch Diabetes mellitus hervorgerufen werden, beitragen.

2 Material und Methode

2.1 Methode

2.1.1 Gewebegewinnung und Präparation der Netzhäute

Zur Durchführung dieser Studie galt es zunächst das Untersuchungsmaterial zu gewinnen in dem die Netzhäute aus den humanen Bulbi explantiert wurden. Als Untersuchungsgut dienten vier humane Retinae. Die drei normalen und eine diabetische Retina, die in dieser Studie Verwendung fanden, stammten aus postmortalen Präparaten der Hornhautbank der Universitätsklinik Münster. Die Hornhaut wurde in der Hornhautbank entfernt und die restlichen Augenteile wurden dem Labor der Experimentellen Ophthalmologie zur Verfügung gestellt.

Die explantierten Bulbi wurden in eine Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4) eingetaucht und mit Hilfe des binokularen Präparationsmikroskops präpariert. Nach einer Stichinzision am Limbus wurde die Cornea an ihrer Zirkumferenz herausgeschnitten und entfernt. Es folgen die Explantation der Linse und Abheben der Netzhaut entlang der Ora Serrata von der Lederhaut. Die verbliebene Haftstelle an der Papille zwischen Retina und Sklera wurde durchtrennt, so dass die Retina nur noch mit Glaskörper behaftet in PBS schwamm. Die Retina wurde anschließend in vier Quadranten eingeteilt und auf einen Zellulosenitratfilter flächig ausgebreitet. Der Filter wurde dann samt Netzhaut auf einem Tupfer gebettet bis ein Grossteil der Flüssigkeit abgesaugt war. Dieses führte zur Teilaustrocknung von gelatinartigem Glaskörper und erleichterte auf dieser Art seine Trennung von der Netzhaut. Schließlich wurde

die Retina in einer Petrischale mit dreiprozentiger Saccharose Lösung auf vier Grad Celsius aufbewahrt.

2.1.2 Einbetten und Einfrieren

In Saccharose aufbewahrte Retina wurde am Kryostat eingebettet und eingefroren. Die Netzhaut wurde in vier Quadranten eingeteilt, die in übereinander liegenden Schichten in einem Gewebblock eingebettet wurden.

Herstellen von Gewebblöcken

Zunächst galt es die Retina plan auf Tissue-tek Block zu bringen. Die Netzhaut wurde in eine Petrischale mit Flüssigkeit (PBS) gelegt. Danach wurde der Petriperm unter der Retina gebracht und anschließend die Flüssigkeit vorsichtig von allen Seiten abgesaugt bis Retina locker in der Mitte des Petriperm-Bodenstückes lag. Der Petriperm-Boden wurde anschließend an den gegenüberliegenden Enden mit Pinzetten angefasst, umgedreht und dabei andersherum durchgebogen. Mit der am meisten durchgebogenen Mitte wurde er auf gefrorenes, planes Tissue-Tek gebracht und vorsichtig zu Seite abgerollt. Danach konnte die nächste Tissue-Tek Schicht auf plan ausgebreitete Netzhaut gefroren werden. Die weiteren Retinastücke wurden in gleicher Art und Weise eingebettet bis ein Gewebblock mit vier Retinaschichten hergestellt war.

Herstellen von Gefrierschnitten

Die Gewebblöcke wurden um 90 Grad gedreht und quer geschnitten. Von jedem Präparat wurden Serienschnitte gefertigt. Am Kryostat wurden bei minus 20 Grad Celsius 10 Mikrometer dicken Gefrierschnitten hergestellt, auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und anschließend in Präparatekästen einsortiert. Die Präparate wurden bis zur Anfärbung im Gefrierschrank auf minus 20 Grad Celsius aufbewahrt.

Für Immunzytochemie liefert die Kryostatpräparation gut erhaltene Antigene, wobei morphologische Details bei Gefrierschnitten eher zerstört werden.

2.1.3 Immunfluoreszenz

Zur Identifizierung und Lokalisation von Antigenen wurde die „zwei-schritt-indirekte“ Färbemethode angewandt. Bei dieser Technik bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Er wird durch einen sekundären, gegen sein Fc-Fragment gerichteten und fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen. Danach kann die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

Diese Arbeitstechnik erlaubt mehr Flexibilität als die direkte Methode, da eine Vielzahl von Primärantikörpern aus einer Spezies mit den gleichen markierten Zweitantikörpern kombiniert werden können. Die indirekte „Zwei-Schritt-Methode“ ist zudem auch um ein Vielfaches empfindlicher, da mehrere Zweitantikörper mit den verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren können. Unerwünschte Nebenreaktionen können auftreten, wenn der Sekundärantikörper mit endogenen Immunoglobulinen der Probe kreuzreagiert. Um Nebenreaktionen zu vermeiden und um eine starke spezifische Anfärbung in Kombination mit minimalem Hintergrund zu erhalten, wurde vor Verwendung des jeweiligen Antikörpers das optimale Verdünnungsverhältnis ermittelt.

2.1.4 Antikörper

In dieser Studie wurden normale und diabetische Retina mit den gleichen Antikörpern und nach dem gleichen Verfahren angefärbt und anschließend verglichen. Zum Nachweis von vaskulären, glialen, neuronalen und nicht neuronalen Antigenen in der Netzhaut fanden acht verschiedene Primärantikörper Anwendung.

1. Anti-von-Willebrand Faktor:

Von Willebrand Faktor ist ein Plasmaglykoprotein und Untereinheit des Faktors VIII der Blutgerinnung. Er vermittelt die Thrombozytenadhäsion an das Subendothelium. Anti-von Willebrand Faktor diente zum Nachweis und zur Darstellung von Endothelzellen.

2. GFAP (Antikörper gegen Glial Fibrillary Acidic Protein):

GFAP ist ein Protein, das von Gliazellen, Astrozyten und Muellerzellen exprimiert wird und zu deren Nachweis diente.

3. ED1:

ED1 zeigt die Glykoproteineinzelketten mit einem Gewicht von 90 bis 100 kD an, die vorwiegend in lysosomalen Membranen von Myelozyten vorkommen. Das Antigen wird bevorzugt von Gewebemakrophagen und Mikroglia in nicht entzündlichem Zustand und schwach von peripheren Granulozyten exprimiert. ED1 diente zum Nachweis von Gewebemakrophagen und von Mikroglia in nicht entzündlichem Zustand.

4. Mac2 (Anti-Makrophagen Antikörper):

Das Mac2 Antigen wird bevorzugt von nicht entzündlichen Makrophagen exprimiert und diente zu deren Nachweis. Anti-Makrophagen Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper gegen Makrophagen aktivierte Monozyten aus Maus-maus-hybrid Zellen.

5. OX42:

Der OX42 Antikörper markiert aktivierte Makrophagen, ortständige peritoneale Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und Zellen mit der Mikrogliamorphologie. Der Antikörper diente zum Nachweis und zur Darstellung von aktivierten Makrophagen bzw. Mikroglia und Granulozyten.

6. Anti-Neurofilament 200 kD:

Anti-Neurofilament wurde zum Nachweis und zur Darstellung von Neurofilamenten verwendet. Bei diesen Neurofilamenten handelte sich um die fadenförmige Proteinmoleküle in der Zytoplasma von Gangliazellen. Sie sind Bestandteile des Zytoskeletts.

7. Anti-Rhodopsin (Opsin):

Rhodopsin auch Sehpigment genannt ist ein aus Opsin und Retinal zusammengesetztes und in der Photorezeptorenschicht der Retina vorkommendes Protein. Anti-Rhodopsin diente zum Nachweis von Rhodopsin in der Photorezeptorenschicht der Netzhaut.

8. Anti-Human CD45:

CD45 Antigen ist ein Protein, das an allen humanen Leukozyten und deren Vorläufern aus dem Knochenmark präsentiert wird. CD45 diente zum Nachweis von Leukozyten im peripheren Blut und deren Infiltration ins Gewebe.

9. Anti-Maus-Ig FITC:

Anti-Maus-Ig FITC wurde als sekundärer, fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet.

2.1.5 Immunhistologische Färbemethode

Die Antikörperfärbungen wurden nach standardisiertem Schema und festgelegten Protokollen zum Fixieren und Einbetten durchgeführt. Zunächst wurden die Präparate mit eiskaltem Methanol für zehn Minuten bei Null Grad Celsius fixiert. Durch das Fixieren soll eine Konservierung von Zellen und Geweben unter Erhalt der ursprünglichen Morphologie erreicht werden. Weiterhin wird durch die Behandlung mit Methanol relativ undurchlässige

Zellmembran permeabilisiert und so die Penetration der Antikörper erleichtert. Das Methanol wurde anschließend durch dreimal je fünf Minuten Waschen mit PBS wieder entfernt. Die Präparate wurden mit wasserfestem Dako-Pen Stift auf dem Objektträger umrandet. Es folgt ein 60 Minuten langes Blockieren unspezifischer Bindungsstellen. Dieses wird mittels einer 0,1 % Albuminlösung (BSA) durchgeführt. Danach folgte die Inkubation mit monoklonalen Primärantikörpern. Die Inkubation wurde über Nacht, in einer feuchten Kammer im Kühlschrank bei vier Grad Celsius durchgeführt. Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen je fünf Minuten mit PBS-Puffer entfernt. Es folgte ein 30 Minuten langes Blockieren mit BSA. Die Inkubation mit dem sekundären, einem FITC konjugierten IgG Antikörper, dauerte eine Stunde in der feuchten Kammer bei der Raumtemperatur und unter Lichtausschluss, um ein frühzeitiges Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes durch UV-Licht zu verhindern. Schließlich entfernte das dreimalige Waschen in PBS je fünf Minuten nicht gebundene Antikörper. Die Präparate wurden in Moviol eingebettet und mit Deckgläsern abgedeckt. Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgte direkt nach der Färbung.

2.1.6 Fluoreszenzmikroskopie

Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfärbung zu vermeiden, wurden die Präparate direkt nach der Färbung am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. In dieser Studie fanden acht verschiedene Antikörper Anwendung. Jedes Präparat wurde mit nur einem Antikörper behandelt. Es wurden Serienfärbungen mit jedem Antikörper durchgeführt. Eine Serie bestand aus vier Präparaten, die mit dem gleichen Antikörper behandelt worden sind. Die Qualitätskontrolle erfolgte bei allen Serien über eine negative Kontroll-Färbung, mit der unspezifische Anfärbungen ausgeschlossen werden konnten.

Zunächst wurde die normale Retina untersucht. Die Auswertung der gesunden Netzhaut erfolgte am Fluoreszenzmikroskop „Axiofhot“. Es wurden Fluoreszenzfilter von 450-490 nm und 510-560 verwendet. Um die Spezifität der Färbemethode zu überprüfen, wurden als erstes die negativen Kontrollfärbungen ausgewertet. Unter der Übersichtsvergrößerung mit dem fünfer Objektiv wurden die gefärbten Netzhautareale aufgesucht und danach mit dem vierziger Objektiv einzelne fluoreszierende Zellen fokussiert. Die Auswertung erfolgte unter vierzigfacher und zum Teil unter sechzig- bis hundertfacher Vergrößerung. Die gefärbten Retinaareale und die fokussierten Zellen wurden mit der im „Axiofhot“ integrierten „Zeiss Kamera“ fotografiert und in Form von Schwarz-weiß Bildern zur weiteren Untersuchung und Dokumentation aufbewahrt.

Die Auswertung der diabetischen Retina am Fluoreszenzmikroskop erfolgte nach der gleichen Methode wie die Auswertung der normalen Netzhaut. Die Qualitätskontrolle erfolgte ebenfalls durch die Auswertung der negativen Kontrollfärbungen. Danach wurden unter fünffacher Übersichtsvergrößerung die gefärbten Retinaareale aufgesucht und unter vierzigfacher Vergrößerung einzelne fluoreszierende Zellen fokussiert. Die Auswertung wurde unter vierzigfacher und unter sechzig- bis hundertfacher Vergrößerung durchgeführt. Die fokussierten Zellen und Netzhautareale sind mit Hilfe des computergestütztes Bildanalyse systems „Diskus“ zur weiteren Untersuchung und Dokumentation fotografiert und digitalisiert worden. Diese wurden anschließend mit dem Belichtungsautomat „Axiofhot“ belichtet und auf ein schwarz-weiß Film überführt, um eine Standardisierung und Angleichen der Auswertungsmethode, sowie einen direkten Vergleich der normalen und diabetischen Retina zu gewährleisten.

Die Auswertung der Präparate erfolgte direkt am Fluoreszenzmikroskop. Schwarz-weiß Bilder und die digitalisierten Bilder dienten der Dokumentation und Präsentation der Ergebnisse.

2.1.7 Auswertung

Nach der Behandlung mit acht Antikörpern wurden normale und diabetische humane Retina im Hinblick auf neuronale und nichtneuronale Antikörper verglichen. Die Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop nach dem Vorkommen der markierten Antigene und Zellen, deren Lokalisation und Verteilungsmuster ausgewertet. Die Ergebnisse sind in tabellarischer und bildgebender Form im Kapitel „Ergebnisse“ dargestellt worden.

2.2 Material

2.2.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten vier humane Retinae. Die drei normalen und eine diabetische Retina, die in dieser Studie Verwendung fanden, stammten aus postmortalen Präparaten der Hornhautbank der Universitätsklinik Münster. Die Augen entstammten Organspendern, die an verschiedenen Krankheiten gestorben waren. Alle Daten sind anonym erhoben, um dem Personendatenschutzgesetz gerecht zu werden. Rückschlüsse auf die Spender sind deshalb nicht möglich. Welche Augenkrankheiten und weitere Systemerkrankungen diese Organspender gehabt hatten, ist aufgrund des Verlaufs der Studie nicht nachzuvollziehen.

2.2.2 Geräte

- Kryostat: keine Angaben
- Kamera (Zeiss, Oberkochen) in Axiophot integriert
- Fluoreszenz und Durchlichtungsmikroskop: „Axiophot“ Zeiss mit Fluoreszenzfiltern 450-490 nm und 510-560 nm

- Objektive: Neofluar 5x, 10x, 20x, 40x, 60-100x
- Okulare: Zeiss-Axiophot 10x20
- Kamera: Zeiss in Axiophot integriert
- Belichtungsautomat Axiophot: keine Angaben
- Computergestütztes Bildanalysesystem: „DISCUS“
- Videokamera: Sony, 3CCD, Color Video Camera
- Bildanalysesystem: „DISCUS“, „Image Tool“ Version 2.0., University of Texas health science center

2.2.3 Verbrauchsmaterial

- Schwarz-weiß Negativfilme: Ilford FP4 125, Ilford HP5 400
- Glas- Objektträger
- Deckgläser
- Wasserfester Dako-Pen Stift Code Nummer. 2002
- Petrischalen

2.2.4 Chemikalien und Lösungen

- PBS: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH-Wert 7,4
Zusammensetzung: Na_2HPO_4 : 1,42g, KH_2PO_4 : 0,27g, NaCl: 8-9g, 1 Liter
Aqua destilata
- BSA: 0,1 % Albuminlösung
- Hersteller „Sigma“
- Zusammensetzung: 0,1 % Albumin Bovine, 100 ml PBS
- Methanol (p.A.): eisgekühlt, Hersteller: Merck
- Moviol: Einbettmedium, Hersteller: Hoechst
- Gelatine: Objektträger Adhäsivlösung

2.2.5 Antikörper

1. Vaskuläre Antikörper

Anti-von Willebrand Faktor (Anti-vWF, Anti-F VIII-RAG):

- Monoklonaler Antikörper gegen humanen von Willebrand Faktor von der Maus
- Lyophilisiertes Immunglobulin Klasse Ig1
- Verdünnung: 1:50
- Hersteller: Boehringer Mannheim
- Dient zur Identifizierung von Endothelzellen

2. Gliale Antikörper

GFAP:

- Monoklonaler Antikörper gegen Glial Fibrillary Acidic Protein aus Maus-Maus-Hybridzellen (Klon G-A-5)
- Lyophilisiertes Immunglobulin Klasse Ig G 1
- Verdünnung: 1:100
- Hersteller: Boehringer Mannheim Biochemica
- Dient zum Nachweis von Gliazellen, Astrozyten, Muellerzellen, Bergmangliazellen

ED1:

- Mause Anti Rat ED7- Clone Nr.ED1
- Isotype IgG1 (Mouse)
- Verdünnung: 1:250
- Hersteller: Serotec Ltd

- Dient zum Nachweis von Gewebemakrophagen bzw. Mikroglia in nicht entzündlichen Zustand

Mac 2, (Anti-Makrophagen Antikörper):

- Monoklonaler Antikörper gegen Makrophagen aktivierte Monozyten aus Maus-maus-hybrid Zellen
- Lyophilisiertes Immunglobulin Klasse IgG 1, Klon 25 G 9
- Verdünnung: 1:10
- Hersteller: Boehringer Mannheim Biochemica
- Dient zum Nachweis von nicht entzündlichen Makrophagen

OX42:

- Maus Anti Rat CD11b (IgG) "OX42"
- Isotyp; IgG 2a (Maus), Clone-Nr.: MRC OX42
- Verdünnung: 1:100
- Hersteller: Serotec Ltd
- Dient zum Nachweis von aktivierten Makrophagen, Granulozyten und Zellen mit der Mikrogliamorphologie

3. Neuronale Antikörper:

Anti-Neurofilament 200 kD:

- Monoklonaler Antikörper gegen Neurofilamentpolypeptid 200 kD aus Maus-Maus Hybridzellen
- Lyophilisiertes Immunglobulin Klasse IgG 1, Klone; NE 14
- Verdünnung: 1:50
- Hersteller: Boehringer Mannheim Biochemica
- Dient zum Nachweis und Darstellung von Neurofilamenten

Anti-Rhodopsin (Opsin)

- Isotyp: Ms IgG 1, Klone: RET-P1
- Verdünnung: 1:50
- Hersteller: Leinco Technologies, Inc., 14730 Manchester
- Dient zum Nachweis von Rhodopsin in der Photorezeptorenschicht der Retina

4. Nicht neuronale Antikörper:

Anti-Human CD45:

- Isotyp: Ms IG 2b, Klon: T29/33
- Verdünnung: 1:100
- Hersteller: Leinco Technologies, Inc., 14730 Manchester
- Dient zum Nachweis von Leukozyten

5. Sekundäre Antikörper:

Anti-Maus-Ig FITC:

- fluoreszenzmarkierter Antikörper
- Verdünnung: 1:100
- Hersteller: Boehringer Mannheim Biochemica

3 Ergebnisse

3.1 Antikörperfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Nach der Behandlung der normalen und diabetischen Retina mit den acht verschiedenen Antikörpern konnten diese miteinander verglichen werden. Die Netzhäute wurden nach dem Vorkommen der markierten Antigene, deren Lokalisation und Verteilungsmuster in verschiedenen Retinaschichten ausgewertet. Schon direkt nach der Färbung mit dem zweiten Antikörper konnten die markierten Antigene unter Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Die Präparate wurden direkt nach der Färbung ausgewertet, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfärbung zu vermeiden. Mit der hier angewendeten Färbemethode konnten folgende Strukturen und Zellen dargestellt werden:

- Endothelzellen zur Darstellung der Gefäße
- Gliazellen, Astrozyten, Muellereellen
- Microglia in aktiviertem und nicht aktiviertem Zustand
- Aktivierte und nicht aktivierte Makrophagen
- Neurofilamente
- Rhodopsin in der Photorezeptorenschicht
- Leukozyten

3.2 Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie

Bei den vier zur Verfügung stehenden Präparaten handelte es sich um 3 gesunde und eine durch Diabetes mellitus geschädigte Netzhaut. Es wurden ca. über 760 Präparate ausgewertet. Jedes Präparat wurde nur mit einem Antikörper behandelt. Es wurden Serienfärbungen mit jedem Antikörper

durchgeführt. Eine Serie bestand aus vier Präparaten, die mit dem gleichen Antikörper behandelt worden sind. Die Qualitätskontrolle erfolgte bei allen Serien über eine negative Kontroll-Färbung, mit der unspezifische Anfärbungen ausgeschlossen werden konnten. Es wurden ca. 440 Präparate der gesunden und ca. 320 Präparate der durch Diabetes mellitus geschädigten Retina ausgewertet.

Obwohl keine quantifizierenden Daten erhoben wurden, beeindruckten in den diabetischen Retinae insgesamt mehr Gliazellen, Mikroglia und Zellen mit Mikroglia-morphologie, Makrophagen und Leukozyten als in den normalen Retinae. Insbesondere imponierten viele Endothelzellen bzw. kleine und größere Gefäße in der diabetischen Netzhaut. Nur vereinzelt stellten sich die Gliazellen, insbesondere GFAP immunopositive Zellen in der gesunden Retina dar.

3.2.1 Normale Retina

Antikörper	Schichten der Retina						
	Photorez. Schicht	ONL	OPL	INL	IPL	GCL	OFL
NF							+
Rhodopsin	+						
v.Will.F.				+	+	+	
CD45				+	+	+	
GFAP						+	+
ED1				+	+	+	
Mac 2				+	+	+	
OX42							

Tab. 1.: Normale Netzhaut
Darstellung der positiven Antikörperfärbungen in den verschiedenen Retinaschichten

Retina-Schichten	Angefärbte Zellen/ Antigene						
	Rhodopsin	Neuro - filamente	Endothel -zellen	Leukozyten,	Gliazellen, Astrozyten	Nicht Aktivierte Makroph., Mikroglia	Aktivier te Makrop h., Mikrogl a
Photorez. Schicht	+						
ONL							
OPL							
INL			+	+			+
IPL			+	+			+
GCL			+	+	+		+
OFL		+				+	

Tab. 2.: Normale Retina
Darstellung der angefärbten Zellen/ Antigene in den verschiedenen Retinaschichten

In der Tabelle 1. wird dargestellt in welchen Netzhautschichten der gesunden Retinae positive Antikörperfärbungen gefunden worden sind. Die Tabelle 2. stellt angefärbte Strukturen und Zellen in den verschiedenen Netzhautschichten dar.

Anti-Neurofilament zeigte eine deutlich positive Färbung in der Nervenfaserschicht. Mit dieser Färbung wurden die Neurofilamente in den Axonen der Gangliazellen sehr schön dargestellt. Die einzelnen Nervenfasern zeigen in einer großen Dichte regelmäßigen Verlauf. In der gesunden Retina scheint diese Schicht trotz den postmorten Traumata, Präparationskomplifikationen und dem Gewebeuntergang sehr gut erhalten geblieben zu sein.

Anti-Rhodopsin zeigte eine deutlich positive Färbung in der Photorezeptorenschicht. Durch Anfärbung des Sehpigments wird die

Photorezeptorenschicht, die bei den gesunden Netzhäuten zum größten Teil erhalten blieb gut dargestellt. Sie wurde aber auch stellenweise geschädigt oder gerissen. Dies könnte auf Traumata bei der Explantation der Netzhäute und postmortalen Gewebeuntergang zurückgeführt werden.

Anti- von Willebrand Faktor zeigte positive Färbungen in der Ganglienzellschicht und zum Teil in der inneren Retina. Insgesamt stellten sich wenig Endothelzellen bzw. Gefäße dar. Es lagen ganze Retinastücke vor, bei denen keine angefärbten Strukturen vorgefunden worden sind. Die meisten Gefäße stellten sich in der Ganglienzellschicht und einige Kapillaren in der inneren plexiformen und inneren Körnerschicht dar.

Anti-Human CD45 zeigte positive Färbung in der Ganglienzellschicht, inneren plexiformen und inneren Körnerschicht. In diesen Schichten aber hauptsächlich in der Ganglienzellschicht wurden vereinzelt Leukozyten vorgefunden. Einzelne Leukozyten stellten sich ebenfalls in der Gefäßwand dar. Andererseits wurden bei der Großzahl der Präparate nur wenige oder gar keine Zellen gefunden, so dass von einer invasiven Infiltration der Leukozyten nicht gesprochen werden kann.

GFAP (Glial fibrillary acidic protein, „Saures Gliafaserprotein“) zeigte positive Reaktion in der Nervenfaser- und Ganglienzellschicht. Hauptsächlich in diesen Schichten wurden Gliazellen und Astrozyten vorgefunden und nur an wenigen Stellen vereinzelte Zellen in der inneren plexiformen und inneren Körnerschicht.

ED1 positive Zellen wurden in den nicht zuckererkrankten Netzhäuten hauptsächlich in der Ganglienzellschicht aber auch in der inneren plexiformen und inneren Körnerschicht gefunden. Es handelt sich um vereinzelt vorkommende Makrophagen in nicht aktiviertem Zustand. In der Großzahl der Retinapräparate wurden keine angefärbten Strukturen gefunden.

Die Färbungen mit Anti- Mac2 stellten sich ähnlich wie die mit ED1 dar. Es wurden aber noch weniger angefärbte Zellen vorgefunden. In den meisten Retinaschnitten konnten keine Makrophagen gefunden werden.

In der normalen Retina wurden keine OX42 positive Zellen vorgefunden. Dieses deutet auf Abwesenheit von aktivierten Makrophagen und reaktiven Mikroglia hin.

3.2.2 Diabetische Retina

Antikörper	Schichten der Retina						
	Photorez. Schicht	ONL	OPL	INL	IPL	GCL	OFL
NF						+	+
Rhodopsin	+						
v.Will.F.		+	+	+	+	+	
CD45		+	+	+	+	+	
GFAP		+	+	+	+	+	+
ED1	+			+	+	+	
Mac 2		+	+	+	+	+	
OX42		+	+	+	+	+	

Tab. 3.: Diabetische Netzhaut
Darstellung der positiven Antikörperfärbungen in den verschiedenen Retinaschichten

Retina-Schichten	Angefärbte Zellen/ Antigene						
	Rhodopsin	Neuro - filamente	Endothel -zellen	Leukozyten,	Gliazellen, Astrozyten	Nicht Aktivierte Makroph.	Aktivierte Makroph., Mikroglia
Photorez. Schicht	+					+	
ONL			+	+	+	+	+
OPL			+	+	+	+	+
INL			+	+	+	+	+
IPL			+	+	+	+	+
GCL		+	+	+	+	+	+
OFL		+			+		

Tab. 4.: Diabetische Retina
Darstellung der angefärbten Zellen/ Antigene in den verschiedenen Retinaschichten

In der Tabelle 3. wird dargestellt in welchen Netzhautschichten der diabetischen Retinae positive Antikörperfärbungen gefunden worden sind. Die Tabelle 4. stellt angefärbte Strukturen und Zellen in den verschiedenen Netzhautschichten dar.

Anti- Neurofilament zeigt positive Reaktion in dem Stratum neurofibrarum. Angefärbt werden die Neurofilamente in den Axonen der Gangliazellen. Stellenweise sind die einzelnen Nervenfasern sehr gut dargestellt worden, zeigen aber häufig Unregelmässigkeiten und Risse in ihrem Verlauf. Insgesamt stellen sich viel weniger Fasern als bei der normalen Netzhaut. Die Nervenfaserschicht an sich zeigt bei dem durch Diabetes mellitus geschädigtem Auge mehrere Kontinuitätsunterbrechungen und Risse.

Anti-Rhodopsin zeigt positive Reaktion in der Photorezeptorenschicht durch Anfärbung des Sehpigmentes. Die Photorezeptorenschicht ist gut darstellbar und zeigt mehrere Risse und Kontinuitätsunterbrechungen. Ähnlich stellt sich die Photorezeptorenschicht bei den gesunden Augen dar, so dass diese Schädigungen auf postmortale Traumata und Präparationskomplikationen zurückgeführt werden können.

Anti- von Willebrand Faktor zeigte positive Reaktion in der Ganglienzellschicht, inneren plexiformen und inneren Körnerschicht, äußeren plexiformen und äußeren Körnerschicht. In der gesamten Retina ist ein Gefäßreichtum zu beobachten. Größere Gefäße längs und quer geschnitten wurden hauptsächlich in der Ganglienzellschicht angetroffen. Eine Vielzahl kleinerer Gefäße und Kapillare strecken sich durch die gesamte innere Retina.

Anti- Human CD45 zeigt positive Färbung in der Ganglienzellschicht und in der gesamten inneren Retina. Zahlreiche Leukozyten und dendritische Zellen werden in der durch Diabetes mellitus geschädigten Netzhaut beobachtet. Angefärbte Zellen wurden ebenfalls in den Gefäßwänden vorgefunden.

GFAP wird in der diabetischen Retina verstärkt in den Gliazellen exprimiert. GFAP diente als Marker für Astrozyten und Gliazellen, die in der Ganglienzellschicht und in der gesamten inneren Retina zahlreich vorkommen.

ED1 positive Zellen wurden in der Ganglienzellschicht, inneren plexiformen und inneren Körnerschicht und im Gegensatz zu gesunden Retinae auch in der Photorezeptorenschicht vorgefunden. Insgesamt treten die Makrophagen in der diabetischen Netzhaut zahlreicher auf. Es handelt sich um größere abgerundete Zellen, die in mehreren Retinaschichten vorkommen.

Die Färbungen mit Anti- Mac2 zeigt positive Reaktionen in der Ganglienzellschicht und in der gesamten inneren Retina. Im Gegensatz zu

gesunden Retinae stellten sich zahlreiche Makrophagen dar. Die angefärbten Zellen sind relativ groß, meistens abgerundet oder haben einen länglichen Zelleib.

OX42 positive Zellen traten in der zuckererkrankten Retina in der Ganglienzellschicht und in der gesamten inneren Netzhaut vor. In der gesunden Retina wurden keine OX42 positive Zellen gefunden. Im Gegensatz dazu treten die reaktiven Mikroglia und aktive Makrophagen in der diabetischen Retina sehr zahlreich und in allen Schichten vor. Die Struktur der angefärbten Zellen ist unterschiedlich; zum einen stellten sich die Zellen als große, abgerundete Strukturen und zum anderen als dendritische Zellen mit einem oder mehreren Zellfortsätzen dar.

3.3 Bildgebende Darstellung der Ergebnisse

3.3.1 Färbung mit Anti-Neurofilament

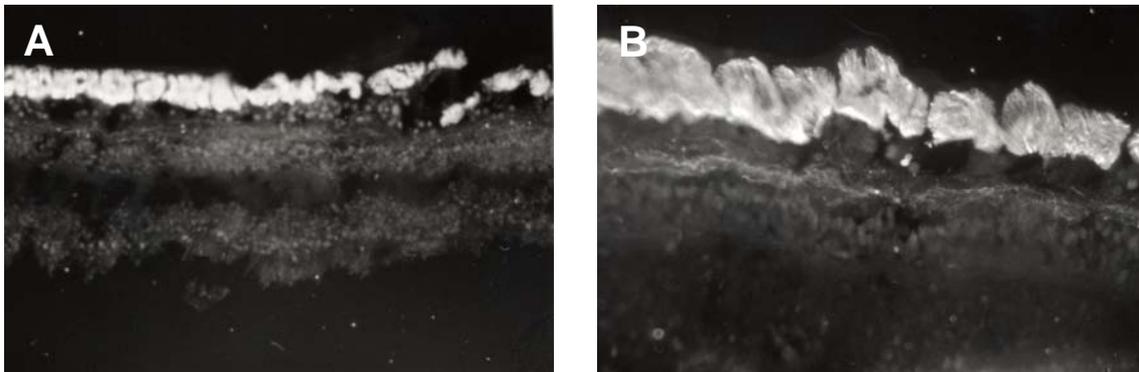


Abb. 4A-B: Gesunde Retina; Fluoreszenzaufnahmen der Nervenfaserschicht. Färbung mit Anti-Neurofilament 200 kD. A: 20facher Vergrößerung, B: 40facher Vergrößerung. Die deutliche und scharfe Darstellung der Nervenfasern deutet auf einen guten Zustand des Stratum neurofibrosum hin und Erhalt der Strukturen in dieser Schicht. Axone der Ganglienzellen sind gut erkennbar.

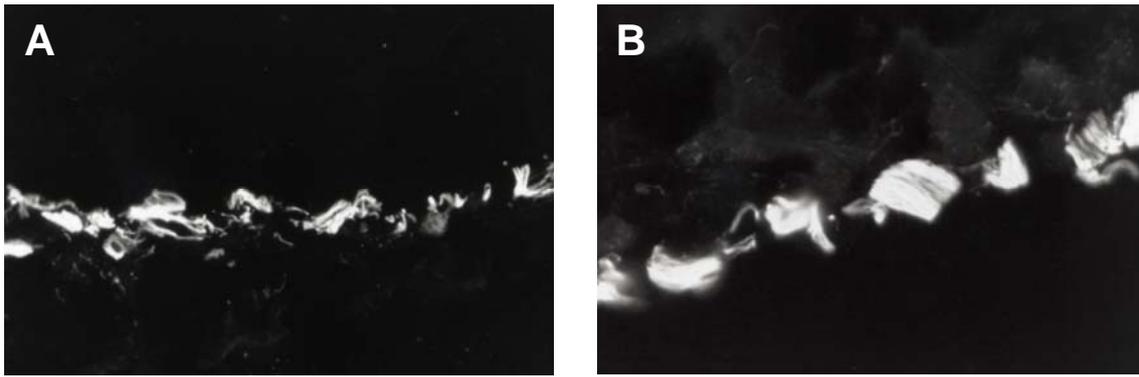


Abb. 5A-B: Diabetische Retina; Fluoreszenzaufnahmen der Nervenfaserschicht. Färbung mit Anti-Neurofilament 200 kD. A: 20facher Vergrößerung, B: 40facher Vergrößerung. Im Gegensatz zur gesunden Retinae zeigt Stratum neurofibrarum hier mehrere Kontinuitätsunterbrechungen und keinen kompletten Erhalt der Strukturen. Die einzelnen Nervenfasern zeigen Unregelmäßigkeiten und Risse in ihrem Verlauf.

3.3.2 Färbung mit Anti-Rhodopsin

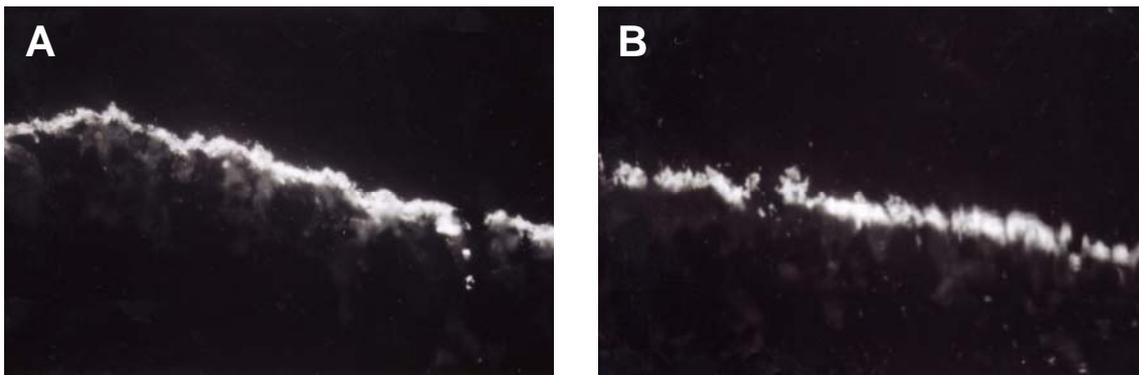


Abb. 6A-B: Gesunde Retina; Fluoreszenzaufnahmen der Photorezeptorenschicht, 20facher Vergrößerung. Färbung mit Anti-Rhodopsin. Photorezeptorenschicht wird gut dargestellt und ist weitestgehend gut erhalten.

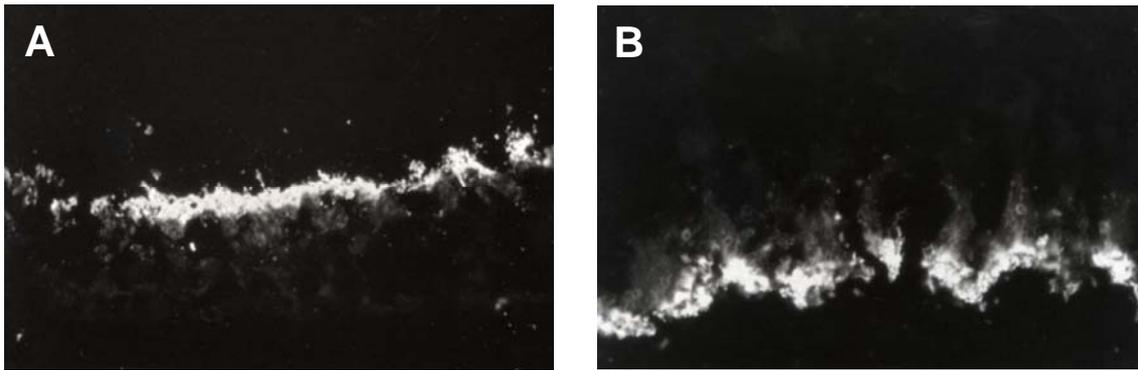


Abb. 7A-B: Diabetische Retina; Fluoreszenzaufnahmen der Photorezeptorenschicht. Färbung mit Anti-Rhodopsin. A: 20facher Vergrößerung, B: 40facher Vergrößerung. Die Photorezeptorenschicht ist gut darstellbar, es liegt eine deutlich positive Reaktion auf Anti-Rhodopsin. Die Photorezeptorenschicht zeigt mehrere Risse und Kontinuitätsunterbrechungen.

3.3.3 Färbung mit Anti-von Willebrand Faktor

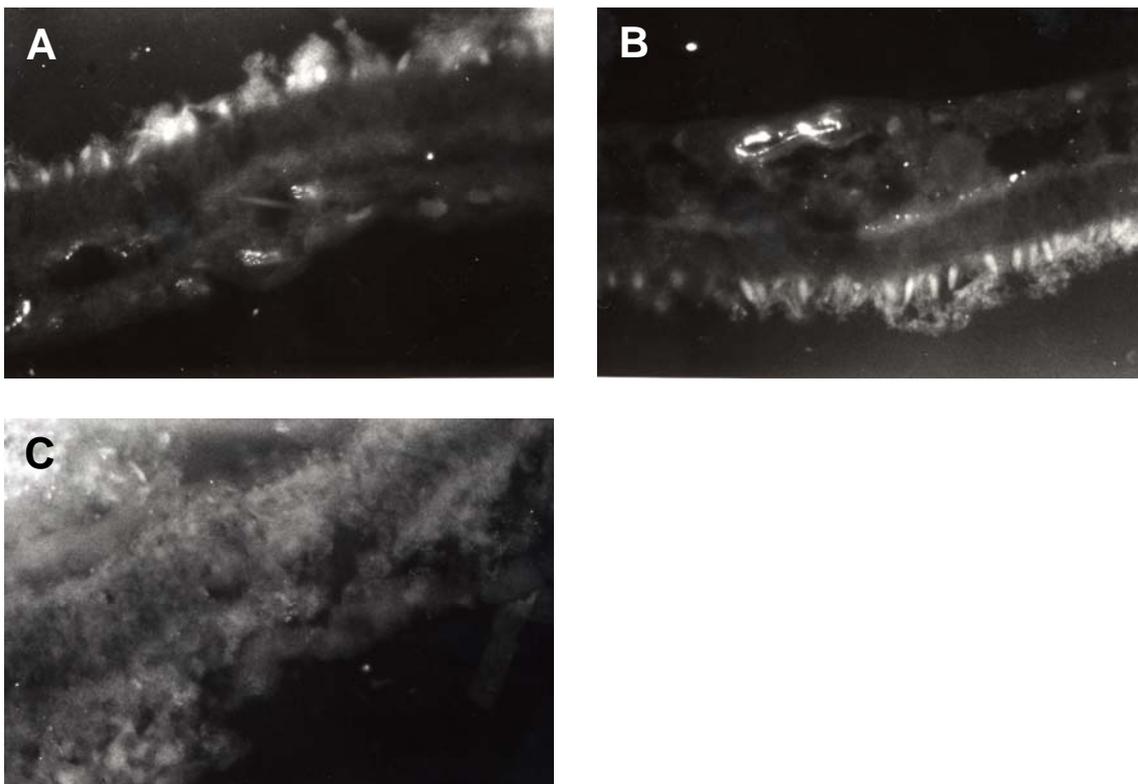


Abb. 8A-C: Normale Retina; Färbung mit Anti- von Willebrand Faktor. A-C: 40facher Vergrößerung. A: Insgesamt stellen sich wenige Gefäße dar, einige längs und quer geschnittene Kapillare hauptsächlich in der Ganglienzellschicht und stellenweise in der inneren Retina. B: Nur vereinzelt sind auch größere Gefäße in der Ganglienzellschicht angetroffen. C: Die Mehrheit der Präparate zeigte eher eine Gefäßarmut und keine angefärbten Strukturen.

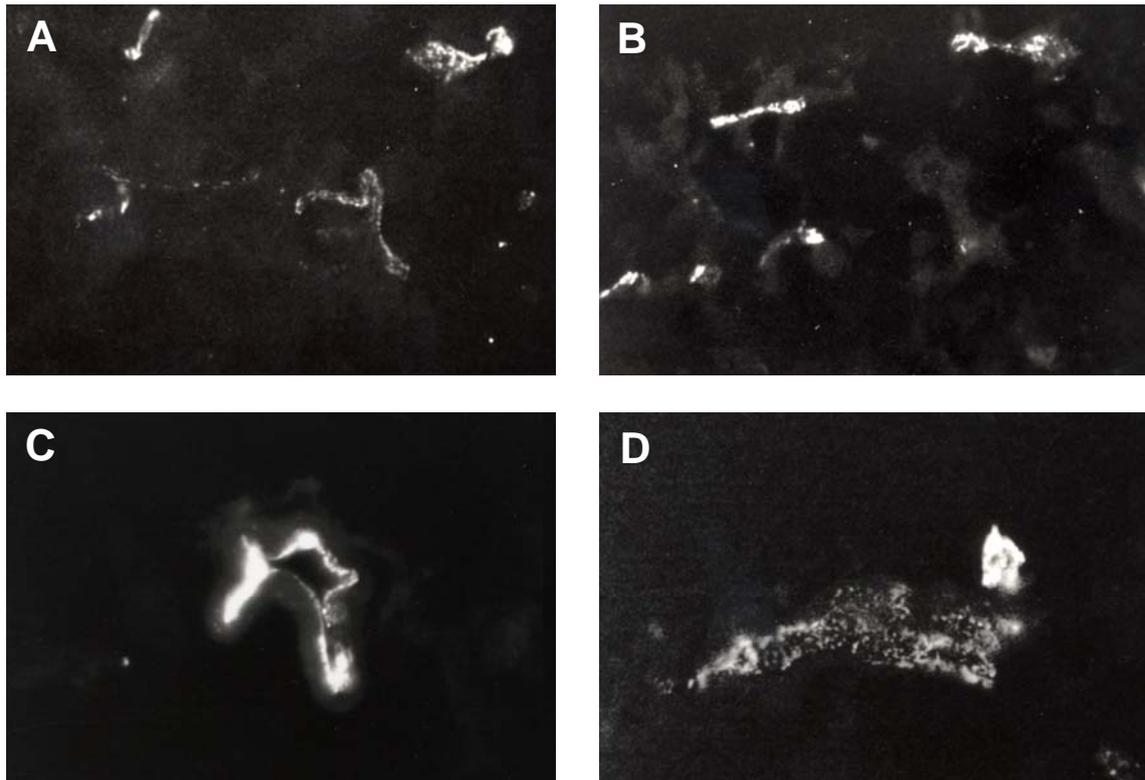


Abb. 9A-D: Diabetische Retina; Färbung mit Anti- von Willebrand Faktor. A-D: 40facher Vergrößerung. Insgesamt ist auf allen Präparaten ein Gefäßreichtum zu beobachten. A-B: Viele kleinere Gefäße und Kapillaren, längs und quer geschnitten strecken sich durch alle Netzhautschichten. C-D: Riesen Gefäße längs und quer geschnitten stellen sich in der Ganglienzellschicht und in das Innere der Netzhaut einwachsend dar.

3.3.4 Färbung mit Anti-human CD45

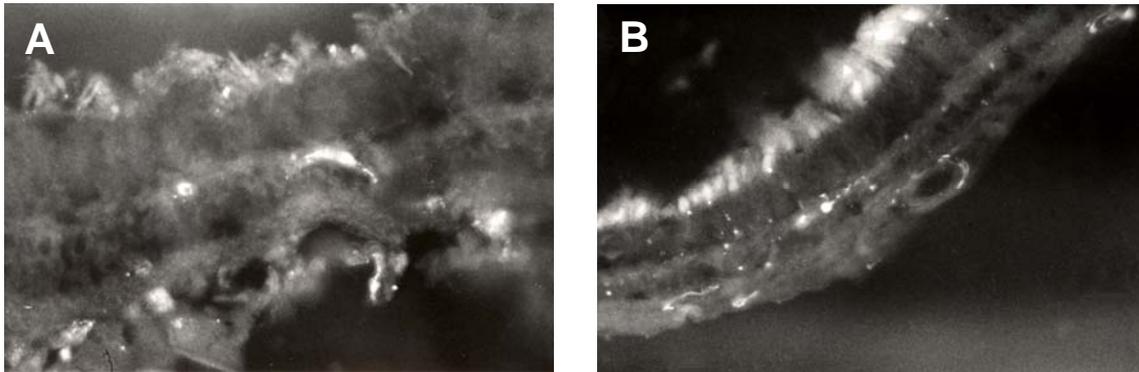


Abb. 10A-B: Normale Retina; Färbung mit Anti- human CD45. A: 40facher Vergrößerung. B: 20facher Vergrößerung. Leukozyten und Zellen mit Mikrogliamorphologie bzw. dendritische Zellen sind hauptsächlich in der Ganglienzellschicht angetroffen worden und stellenweise sind sie in der inneren Retina zu beobachten.

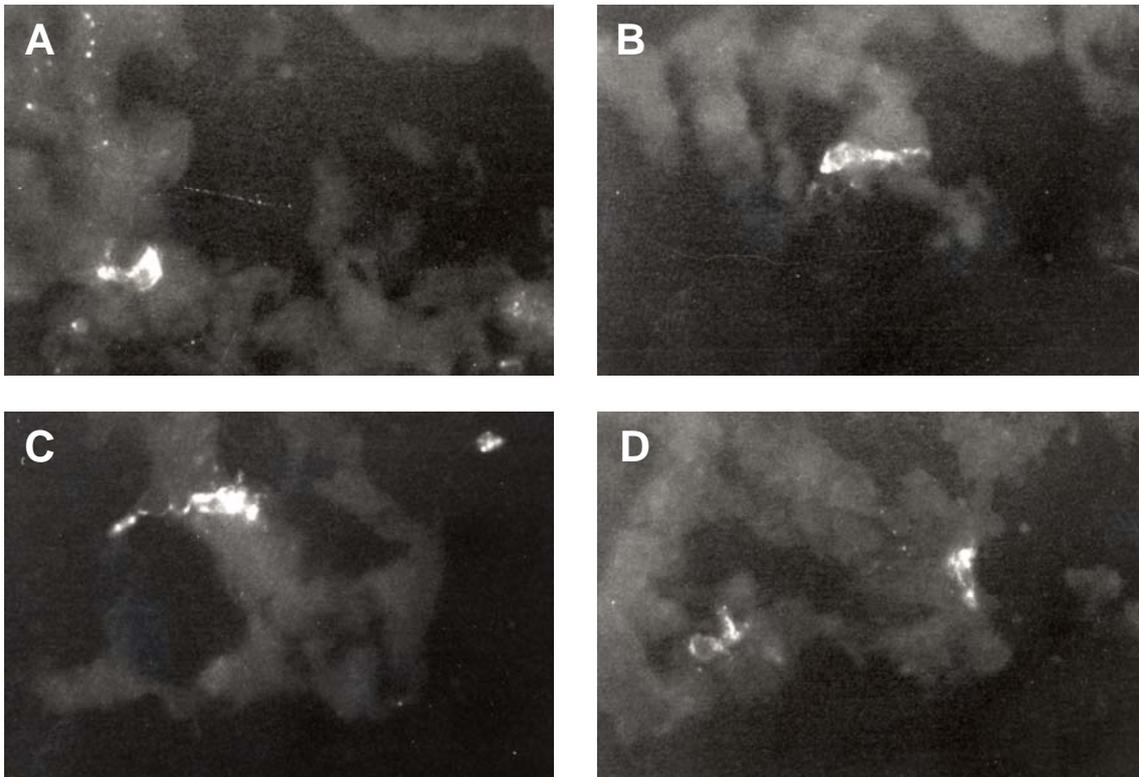


Abb. 11A-D: Diabetische Retina; Färbung mit Anti- human CD45. A-D: 40facher Vergrößerung. Positive Reaktion auf CD45 ist in allen Retinaschichten zu beobachten. Insbesondere stellen sich viele eingewanderte Leukozyten und dendritische Zellen, bzw. Zellen mit Mikrogliamorphologie in der Ganglienzellschicht und in der inneren Netzhaut dar. A-D: etailaufnahmen.

3.3.5 Färbung mit GFAP

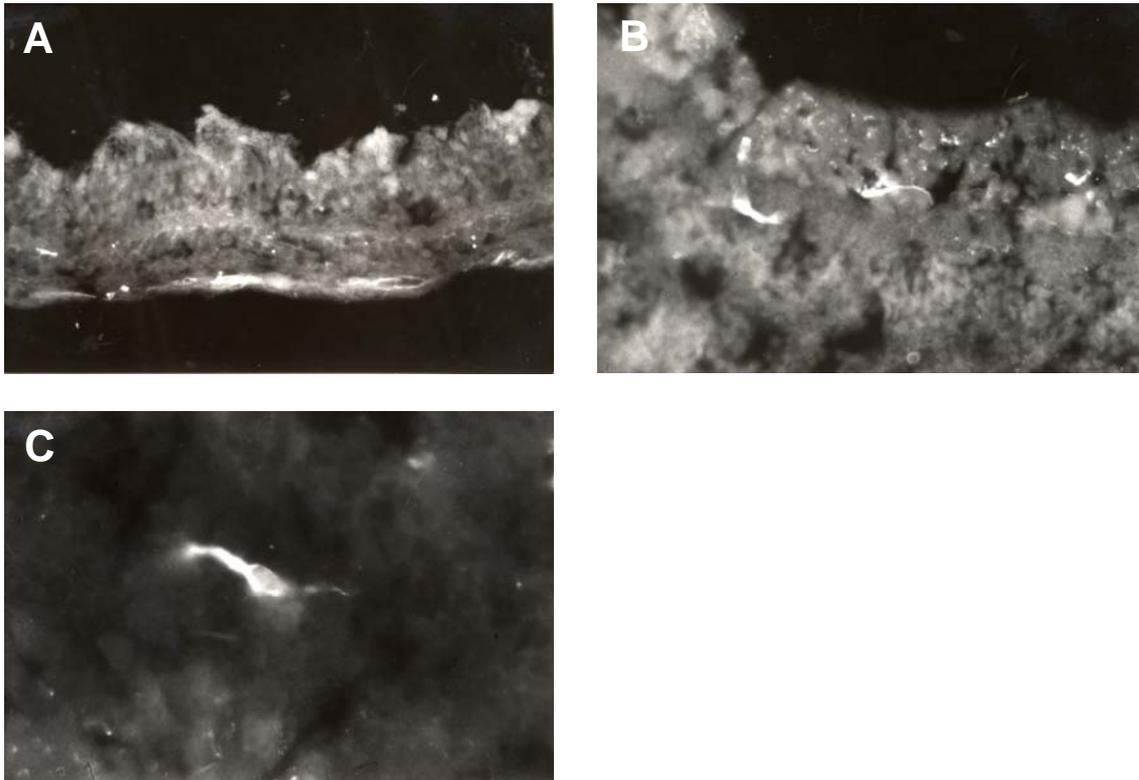


Abb. 12A-C: Normale Retina; Färbung mit GFAP. A: 20facher Vergrößerung. Wenig angefärbte Strukturen. Positive Reaktion hauptsächlich in der Ganglienzellschicht. B: 40facher Vergrößerung. Gliazellen, Astrozyten in der Ganglienzellschicht und in der inneren Retina. Gliazellen mit einem runden Zelleib und wenigen aber gut ausgeprägten Zellfortsätzen. C: 100facher Vergrößerung. Detailaufnahme, Gliazelle in der Ganglienzellschicht.

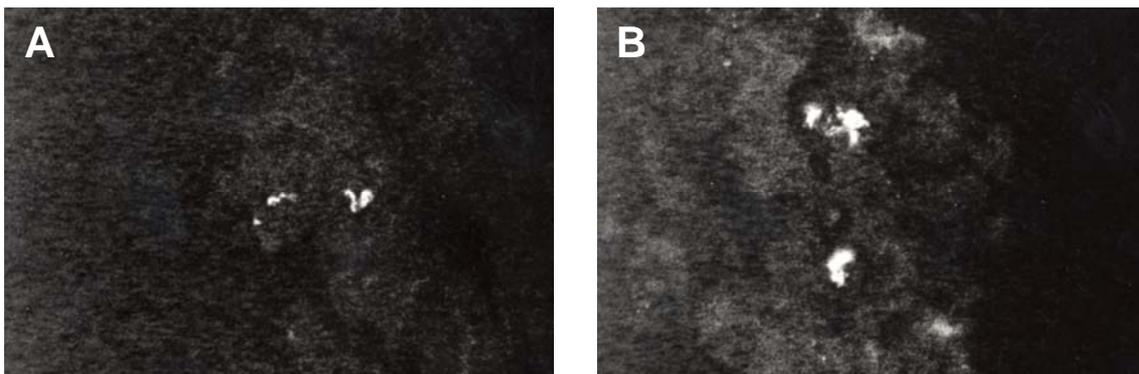


Abb. 13A-B: Diabetische Retina; Färbung mit GFAP. A-B: 40facher Vergrößerung. A: Gliazellen in der Ganglienzellschicht stellen sich als Zellen mit ovalem Zelleib und einigen Zellfortsätzen dar. B: Gliazellen, Astrozyten durch die gesamte innere Retina verteilt. Zellen mit rundem Zelleib und mehreren Zellfortsätzen.

3.3.6 Färbung mit ED1

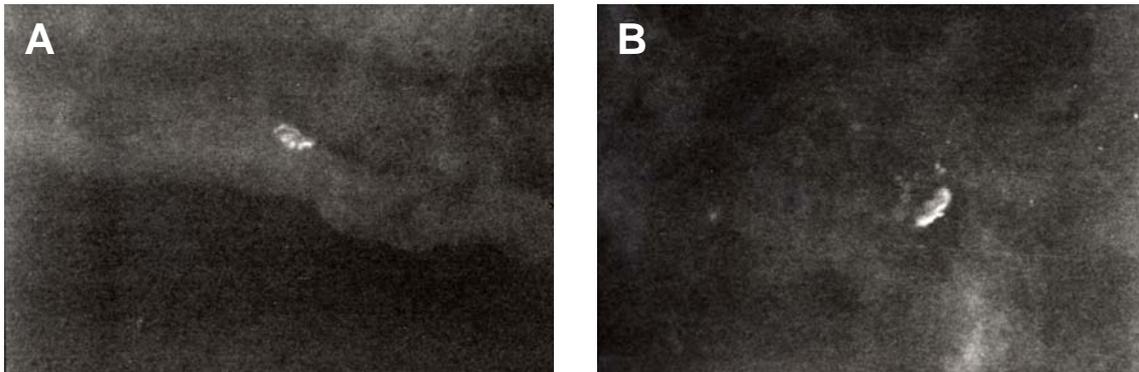


Abb. 14A-B: Normale Retina; Färbung mit ED1. A-B: 40facher Vergrößerung. Einzeln vorkommende Zellen, Makrophagen in der A: Ganglienzellschicht und B: inneren Retina. Insgesamt stellten sich wenig angefärbte Strukturen dar.

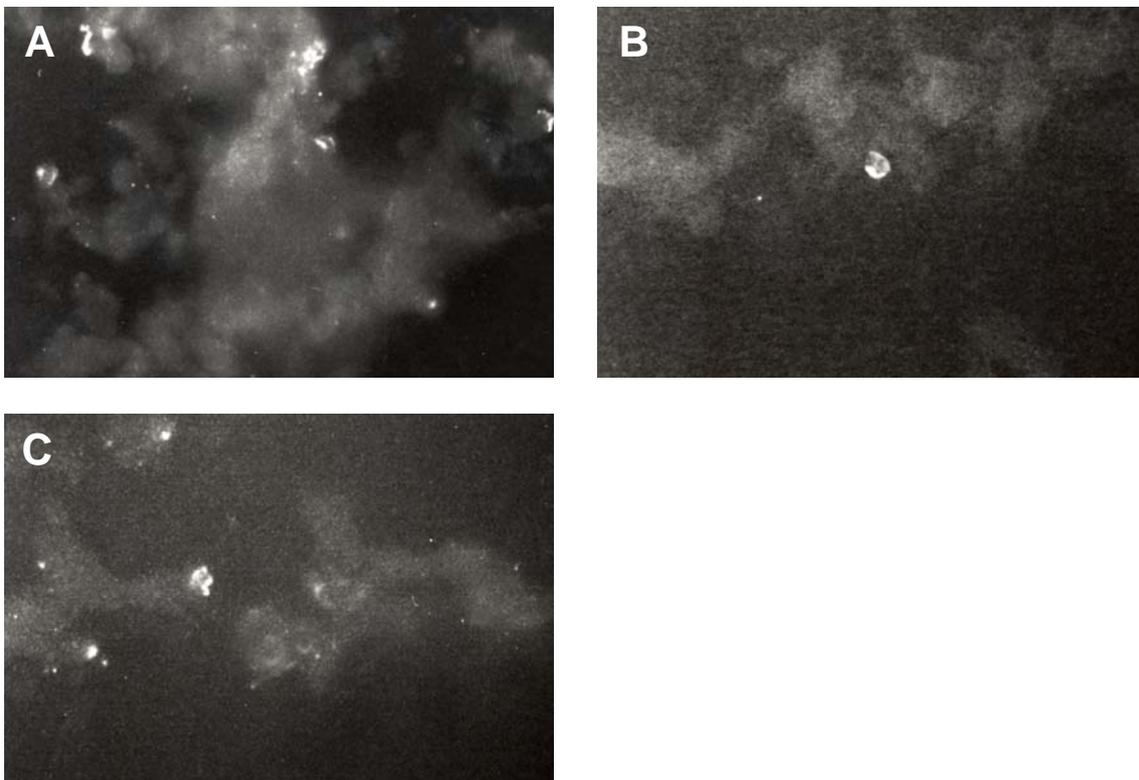


Abb. 15A-C: Diabetische Retina; Färbung mit ED1. A-C: 40facher Vergrößerung. In der diabetischen Netzhaut treten die ED1- positive Zellen, Makrophagen zahlreich auf. A: die Zellen treten in der Tiefe der Netzhaut auf und strecken sich durch alle Retinaschichten durch. B-C: ED1- positive Zellen wurden auch zahlreich in der Photorezeptorschicht vorgefunden, haben meistens einen runden Zelleib und manche besitzen einen oder mehrere Zellfortsätze.

3.3.7 Färbung mit Anti-Mac2

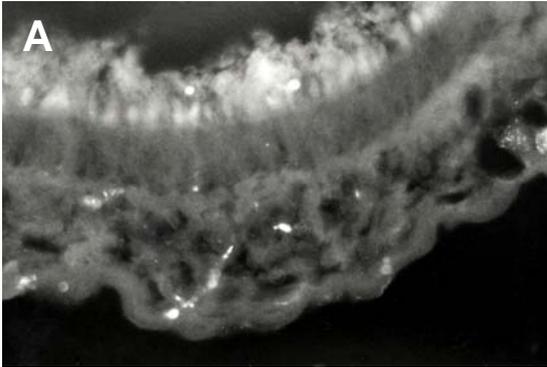


Abb. 16A: Normale Retina; Färbungen mit Anti- Mac2. A: 40facher Vergrößerung. Bei den meisten Retinapräparaten konnten keine Mac2- positive Zellen gefunden werden. Nur stellenweise vereinzelte Zellen traten in der Ganglienzellschicht oder inneren Retina auf.

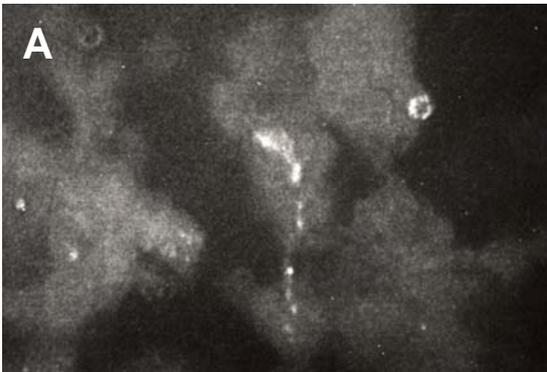


Abb. 17A-C: Diabetische Retina. Färbungen mit Anti- Mac2. A-C: 40facher Vergrößerung. Die Mac2 positive Zellen treten in der diabetischen Netzhaut zahlreich und in fast allen Schichten auf. A-B: Innere Retina; die dargestellten Zellen haben einen großen runden oder länglichen Zelleib. C: Innere Retina; einige Zellen scheinen die Funktion der Phagozytose auszuüben.

3.3.8 Färbung mit OX42



Abb. 18A: Normale Retina; Färbungen mit OX42. A: 20facher Vergrößerung. In den gesunden bzw. durch Diabetes mellitus nicht geschädigten Netzhäuten konnten keine OX42- positive Zellen gefunden werden.

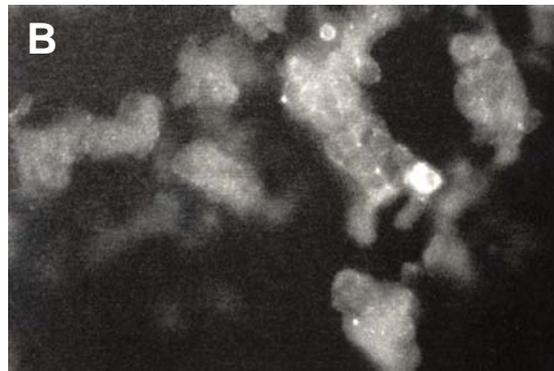
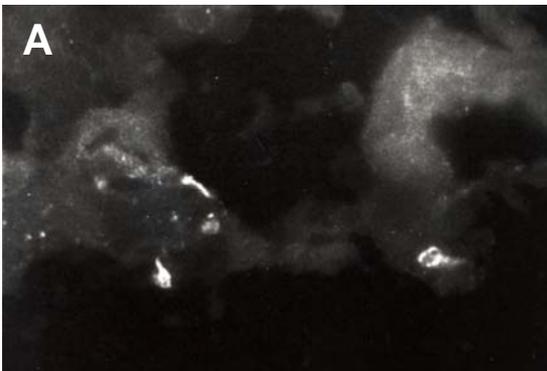


Abb. 19A-C: Diabetische Retina. Färbungen mit OX42. A-C: 40facher Vergrößerung. In der diabetischen Retina treten die OX42- positive Zellen sehr zahlreich und hauptsächlich in der Ganglienzellschicht und in der inneren Retina auf. Morphologie der dargestellten Zellen ist unterschiedlich; A-B: einige Zellen besitzen einen runden Zelleib und wenige Fortsätze, C: die anderen stellen sich als Zellen mit vielen Fortsätzen dar.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu einem tieferen Verständnis über die Auswirkungen des Diabetes mellitus auf Zellen der humanen Retina zu gelangen. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie unter Anwendung von verschiedenen Antikörpern wurden humane diabetische und nicht diabetische Netzhäute untersucht und auf Vorkommen von verschiedenen Antigenen ausgewertet. Auftreten und Invasion von bestimmten Zellen und Antigenen, die in dieser Studie untersucht worden sind, konnte einer Analyse von pathologischen Änderungen bei Diabetes mellitus und zellulären Antworten auf diese Veränderungen im Auge und Retina beitragen.

4.1 Vergleich der normalen und diabetischen Retina im Hinblick auf gliale Antigene

4.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Um gliale Antigene und Zellen darzustellen wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Antikörper verwendet: GFAP, ED1, Mac2, OX42.

GFAP (Glial fibrillary acidic protein) zeigte bei der normalen und diabetischen Retina positive Reaktionen. In der normalen Retina kommt die Großzahl der Gliazellen in der Ganglienzellschicht und in der Nervenfaserschicht, also dort wo sie auch zu erwarten sind. In der diabetischen Retina zeigen sich die angefärbten Strukturen in einer Mehrzahl im Vergleich zur gesunden Netzhaut und in der gesamten inneren Retina.

ED1 und Mac2 positive Zellen wurden ebenfalls in den gesunden und diabetischen Netzhäuten vorgefunden. Bei der normalen Retina handelt es sich

allerdings um vereinzelt vorkommende Zellen, die nur stellenweise in der Ganglienzellschicht oder in der inneren Retina vorkommen. Bei den meisten Präparaten waren keine angefärbten Strukturen zu finden. Insbesondere zeigten sich wenige Mac2 positive Zellen. In der diabetischen Retina traten die ED1 positive Zellen zahlreicher in allen Retinaschichten auf, auch in der Photorezeptorenschicht. Mit Mac2 färbten sich auch zahlreiche Zellen an.

OX42 positive Zellen wurden ausschließlich in der diabetischen Retina vorgefunden. Es handelt sich um reaktive Mikroglia und aktive Makrophagen, die zahlreich in allen Netzhautschichten vorkamen.

4.1.2 Proliferation des glialen Gewebes

In der vorliegenden Arbeit wird der Befund der deutlichen proliferativen Aktivität des glialen Gewebes in den diabetischen Netzhäuten bestätigt. Dieser Befund stimmt mit Beobachtungen früherer Arbeiten überein [Agardh et al. 2001, Runggler-Brandle et al. 2000, Barber et al. 2005, Zeng et al. 2000]. Die verschiedenen Gliazellarten reagieren unterschiedlich auf Hyperglykämie. Die Muellerzellen, die Hauptglia der Retina, zeigen eine Funktionsstörung, Hyperplasy und vermehrte Expression von GFAP [Mizutani 1998, Runggler-Brandle et al. 2000]. Die Anzahl der Astrozyten scheint zurück zu gehen und die Mikrogliazellen zeigen durch ihre Formveränderung eine Funktionsaktivierung. Dieses glial Verhalten kann zur Entwicklung von Neuropathie in der zuckerkranken Retinae entscheidend beitragen [Runggler-Brandle et al. 2000]. In einem Tierexperiment analysierten Barber et al. [Barber et al. 2005] nach vier bis 36 Wochen Hyperglykämie die Netzhäute auf Gefäßpermeabilität, Gefäßverletzungen, Leukostasis, morphologische Änderungen von Mikro- und Macroglia, Apoptosis und Netzhautdegeneration. Nach 12 Wochen Hyperglykämie wurde erhöhte Netzhautgefäßpermeabilität, nach 36 Wochen die Bildung von azellulären Kapillaren und Formveränderung von Astrozyten und Mikroglia festgestellt. Nach drei bis vier Wochen wurde die

erhöhte Apoptosis gekennzeichnet. Nach 22 Wochen waren Ganglienzelluntergang und Veränderungen in der inneren plexiformen und inneren Körnerschicht feststellbar. Runggler-Brandle et al. [Runggler-Brandle et al. 2000] kamen zu ähnlichen Ergebnissen, nämlich dass schon nach zwei Wochen Hyperglykemie ein Aufheben der Blut- Netzhaut- Sperre und nach vier Wochen eine Mikroglia proliferation und Funktionsaktivierung stattfinden. Die gliale Reaktivierung scheint einer der ersten Zeichen der diabetischen Retinopathie zu sein.

Das gliale Gewebe, seine Proliferation und Funktionsveränderung spielen auch eine wesentliche Rolle bei der kapillären Okklusion, die für frühe Non-proliferative diabetische Retinopathie charakteristisch ist. In dem früheren Lumen verschlossener Gefäße wurden positive Immunreaktionen auf GFAP nachgewiesen [Bek 1997]. Die Endothelzellen waren nur in den Gefäßwänden nachweisbar. Die Gliazellinvasion in den Gefäßlumen führt letztendlich zu einer vollständigen Gefäßobliteration [Bek 1997]. Es scheinen sich zwei Veränderungen des retinalen glialen Gewebes in der Pathophysiologie der diabetischen Retinopathie abzuspielen. Die Muellerzellen wachsen in den früheren Lumen obliterierter Netzhautgefäße ein [Bek 1997]. Gleichzeitig finden bei nicht okkludierten Kapillaren reaktive Veränderungen der perivaskulären Gliazellen statt [Bek 1997].

4.1.3 Funktion der Mikroglia und Makrophagen in der Pathophysiologie der diabetischen Retinopathie

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Mikroglia, Astrozyten und Muellerzellen der Netzhaut in multiple gliale Reaktionen in Folge Läsionen und nachfolgender neuronaler Degeneration involviert sind [Zeng et al. 2000]. Ganglienzelldegeneration resultiert in Aktivierung retinaler Mikroglia [Thanos et al. 1991]. In einigen Studien wird berichtet, dass die neuronale Degeneration bei der diabetischen Retinopathie auch vor und unabhängig von den

mikrovaskulären Abnormalitäten auftreten kann [Lecleire et al. 2005, Feit-Leichmann et al. 2005]. Die Ganglienzellschicht scheint dabei die empfindlichste Retinaschicht zu sein [Lecleire et al. 2005]. Hohe Glukosekonzentrationen führen zu verschiedenen Stoffwechselveränderungen unter anderem zur erhöhten Produktion von (AGEs) advanced glycation end products [Stitt et al. 1997, Degenhardt et al. 1998, Kakehashi et al. 2008]. Hyperglykämie und die Endprodukte der Glykation (AGE) können direkt für die Netzhautneurodegeneration verantwortlich sein und die AGE Toxizität einer der frühen pathologischen Faktoren in der Entwicklung der diabetischen Retinopathie. Des Weiteren bewirken AGEs verstärkte Expression von VEGF [Lu et al. 1998] aus Astrozyten, Muellerzellen und Mikroglia der Netzhaut. Dieser Faktor, dessen Konzentration im Auge bei der diabetischen Retinopathie [Spirin et al. 1999] erhöht ist, steigert die Permeabilität der Gefäßwände und hat eine angiogene Wirkung [Aiello 1997].

Die Befunde der vorliegenden Studie finden ihre Bestätigung in der bisherigen Literatur [Zeng et al. 2000]. In der diabetischen Retina wird durch die gesamte Laenge der Mueller Zelle verstärkte Expression von GFAP nachgewiesen. Nach 14 Monaten Hyperglykemie werden OX42 immunopositive Zellen in der inneren Retina und in der Photorezeptorenschicht ermittelt, sowie der Zelluntergang in der Ganglienzellschicht und inneren Körnerschicht [Zeng et al. 2000 OX42]. Dieses Mikrogliaverhalten und pathologische Veränderungen können direkten Einfluss auf die Photorezeptoren nehmen.

Makrophagen spielen eine aktive Rolle bei der Einleitung und dem Abschluss des programmierten Zelltodes während der Entwicklung. Sie werden als professionelle Phagozyten bezeichnet und ihre primäre Aufgabe ist Phagozytose. Der Prozess der Phagozytose ist komplex und bislang nur unzureichend definiert. Es wird postuliert, dass Makrophagen während der Entwicklung in die neuronale Netzhaut wandern und sich nach Abschluss ihrer Rolle als Schutt Entferner in die Mikroglia differenzieren [Hose et al. 2005].

Immunpositive ED1 Makrophagen sind unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen worden. Unter pathologischen Bedingungen scheinen sie in der gleichen Anzahl zu bleiben aber mit fortschreitender Entzündung sich zur Funktion der Phagozytose zu befähigen [Zhang, Tso 2003]. Im Gegensatz dazu treten die OX42 immunpositive Zellen erst wenn ein Entzündungszeichen gesetzt wird. Sie werden als ovoide, ameboide Zellen beschrieben, die gleich an der Phagozytose von absterbenden Zellen beteiligt sind. Mit fortschreitender Entzündung werden sie immer zahlreicher [Zhang, Tso 2003]. Subpopulationen der Makrophagen führen unterschiedliche Funktionen in der Induktion der Apoptose und in der Phagozytose Aktivität unter normalen und pathologischen Bedingungen [Hose et al. 2005, Zhang, Tso 2003].

Diese Erkenntnisse bestätigen auch die Befunde der vorliegenden Arbeit. Die ED1 und Mac2 positive Zellen traten zahlreicher bei der diabetischen Retina auf. Durch ihre Formveränderung scheinen sie sich an der Funktion der Phagozytose zu beteiligen. Ausschließlich bei der diabetischen Netzhaut traten die OX42 immunpositive Zellen zahlreich auf, was auf entzündliche Veränderungen und vermehrten Zelluntergang bei der diabetischen Retinopathie hindeutet. Chang et al. berichten ebenfalls nach dem neuronalem Zelltod von einer heftigen Reaktion der retinalen Mikroglia und Makrophagen, die möglicherweise in der Lage sind die phagozytierenden Zellen auch aus dem benachbarten Gewebe zu rekrutieren [Chang et al. 2006].

4.2 Vergleich der normalen und der diabetischen Retina im Hinblick auf nicht- neuronale Zellen in der Retina

4.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit dem Anti-human CD45 werden Leukozyten markiert. Leukozyten spielen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Pathophysiologie der diabetischen Retinopathie. Mit Hilfe dieses Antikörpers wurde die Infiltration von Leukozyten in die gesunde und diabetische Netzhaut ausgewertet. In der normalen Retina werden CD45 positive Zellen hauptsächlich in der Ganglienzellschicht, zum Teil in den Gefäßwänden und sehr selten in der inneren Retina angetroffen. In einer Großzahl der Präparate wurden aber keine Zellen markiert. Im Gegensatz dazu werden CD45 positive Zellen in der diabetischen Retina in allen Schichten und in den Gefäßwänden sehr zahlreich angetroffen, was auf eine Leukozyten Infiltration hindeutet.

4.2.2 Rolle der Leukozyten in der Pathogenese der diabetischen Retinopathie

Die Leukozyten sind an der Entstehung von drei großen pathologischen Bedingungen in der diabetischen Netzhaut beteiligt. Diese sind: Ödem, Ischemie und Angiogenese [Ishida et al. 2004].

Progression der vaskulären Missbildungen wie der selektive Verlust von Perizyten, Bildung von azellulären Kapillaren, Verdickung der Basalmembran und erhöhte vaskuläre Permeabilität charakterisieren die frühe nonproliferative diabetischen Retinopathie (NPDR). Kapillare Okklusion ist auch einer der frühesten klinisch erkennbaren Läsionen bei NPDR [Chibber et al. 2007]. In der Reaktion auf die kapilläre Non-Perfusion gibt es Dilatation der benachbarten Kapillaren, die zu Blut-Retina-Barriere Aufhebung und Endothelzell-Verletzungen und -Tod führen. Die daraus resultierende Ischämie und

hypoxische Stoffwechsellage führen zu einer erhöhten Produktion von Wachstumsfaktoren und Entwicklung der proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR), die durch das Wachstum neuer Gefäße und potenziellen schweren und irreversiblen visuellen Verlust gekennzeichnet ist [Chibber et al. 2007].

Der genauer pathogene Mechanismus durch den die kapilläre Non-Perfusion auftritt ist noch unklar, aber die Ergebnisse der bisherigen Literatur [Chibber et al. 2007, Bai et al. 2002, 2003, Yanagi 2008] deuten zunehmend darauf hin, dass erhöhte Leukozyten- Endothelzell -Adhäsion und Retina Leukostasis eine entscheidende Rolle spielen.

Bai et al. [Bai et al. 2002, 2003] fanden als eine der ersten Veränderungen bei den diabetischen Netzhäuten morphologische Veränderungen der Netzhautkapillaren, erhöhte Expression von CD45 in den diabetischen Retinae und Retinakupillaren und Leukozyten die sich an den Gefäßwänden stapeln und haften. Diese Leukozyten –Endothelzell- Adhäsion zeigte sich in sehr frühem Stadium der diabetischen Retinopathie und wurde im weiteren Krankheitsverlauf immer zunehmender.

Entzündliche Leukozyten- Akkumulation ist ein gemeinsames Merkmal großer okulärer Krankheiten zu den auch die diabetische Retinopathie gehört [Noda et al. 2007]. Immunologische Merkmale einer Entzündung wozu auch ein Zustrom von Leukozyten gehört, spielen nach der neueren Literatur [Noda et al. 2007, Adamis, Berman 2008, Yanagi 2008] eine herausragende Rolle in der Neovaskularisation der Retina. So sehen einige Autoren neue therapeutische Ansätze in der Behandlung der diabetischen Retinopathie in der Anwendung von entzündungshemmenden Medikamenten und Medikamenten die Leukostasis hemmen [Adamis, Berman 2008, Yanagi 2008].

4.3 Vergleich der normalen und der diabetischen Retina im Hinblick auf neuronale Antigene

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Anti- Neurofilament und Anti- Rhodopsin neuronale Bestandteile dargestellt und analysiert.

4.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse (Anti- Neurofilament)

Mit Anti- Neurofilament wurden die Axone der Ganglienzellen und die Nervenfaserschicht dargestellt. In den normalen Retinae ist diese Schicht trotz Postmorten- und Explantations- Traumata sehr gut erhalten. Die einzelnen Nervenfasern sind sehr gut darstellbar und zeigen in einer großen Dichte sehr regelmäßigen Verlauf. In der diabetischen Netzhaut ist Nervenfaserschicht durch viele Risse unterbrochen. Die einzelnen Fasern zeigen Unregelmäßigkeiten und Risse in ihrem Verlauf. Insgesamt stellen sich viel weniger Fasern als bei der normalen Netzhaut. Die Befunde dieser Arbeit deuten auf eine Schädigung der Axone der Ganglienzellen. Da es sich hier um die menschliche Präparate handelt, kann man auch ein Teil der Schäden insbesondere die Kontinuitätsunterbrechungen der gesamten Schicht und Retinaanteile der Postmorten- und Explantations- Traumata zuschreiben. Aber die Unregelmäßigkeiten und Risse in dem Verlauf der einzelnen Fasern und deren Schwund insgesamt im Vergleich zur gesunden Netzhaut, deuten auf Schäden, die durch Diabetes mellitus entstehen könnten, hin.

4.3.2 Neuronale Degeneration

Die Untersuchungen über retinale Ganglienzellen haben gezeigt, dass mit der primären Schädigung der Ganglienzellaxone das Absterben der Zellen induziert wird [Quigley et al. 1987, 1988, 1989]. So deuten die vorliegenden Befunde auf einen vermehrten Zelluntergang bei der diabetischen Retina.

Ganglienzelldegeneration resultiert in Aktivierung retinaler Mikroglia [Thanos et al. 1991]. Dieses bestätigt ebenfalls die vorliegenden Befunde. Die Proliferation des glialen Gewebes und die Reaktivierung der Mikroglia und Makrophagen in der diabetischen Netzhaut weisen andersrum auch auf die neuronale Degeneration. Es ließe sich vermuten, dass im Zusammenhang mit Ganglienzellendegeneration auch ein Untergang der Photorezeptoren verbunden ist.

Die meisten Forschungen über diabetische Retinopathie beschäftigen sich mit Gefäßveränderungen. Aber die neuen Ansichten legen nahe, dass die diabetische Retinopathie als neurodegenerative Krankheit des Auges angesehen werden muss [Barber 2003, Lecleire et al. 2005, Meyer-Rüsenberg et al. 2007]. Weit hinaus über Gefäßveränderungen geschehen im diabetischen Auge die erhöhte Apoptosis, Gliazell- Reaktivierung, Mikroglia Aktivierung und geänderter Glutamatmetabolismus. Wenn diese Veränderungen zusammen auftreten können sie als neurodegenerativ betrachtet werden und die Funktionsausfälle bald nach dem Anfang der Zuckerkrankheit erklären [Barber 2003, Lecleire et al. 2005]. Es gibt zwei Grundlegende Hypothesen die den neuronalen Zellschwund erklären. Die erste ist, dass der Verlust der Blut- Retina Barriere, der sich Initial in der erhöhten Gefäßpermeabilität manifestiert, zur Bildung von Ödemen und dem neuronalen Zelltod führt. Alternativ dazu hat Diabetes mellitus direkten Einfluss auf Metabolismus der neuronalen Retina und führt zu einer Zunahme der Apoptosis, die wiederum ein Zusammenbruch der Blut-Retina Barriere nach sich zieht. Es ist noch unklar welche Hypothese korrekt ist aber es steht fest, dass Gefäßpermeabilität und neuronale Apoptosis miteinander verbunden und grundlegende Bestandteile der diabetischen Retinopathie sind [Barber 2003]. Der stufenweise Verlust von Neuronen zeigt, dass die Krankheit irreversibel ist, da die neuronale Zellen nicht ersetzt werden können. Dementsprechend sollte die Behandlung der diabetischen Retinopathie vorbeugend sein und ihren Einsatz schon vor dem Auftritt der Symptome haben. Weiterhin sollte die neuronale Apoptosis neben der Gefäßpermeabilität

ein wesentliches Ziel der pharmakologischen Studien werden [Barber 2003]. Meyer-Rüsenberg et al. stellten in ihrer Studie fest, dass retinale Ganglienzellen bei Diabetes und arterieller Hypertonie neben der Verursachung von mikrovaskulären Veränderungen ähnliche Auswirkungen auf die Morphologie der retinale Ganglienzellen haben. Die Axone der beiden großen Ganglienzell-Typen, Midget- und Parasol- Zellen zeigten morphologische Veränderungen in Form von Schwellungen und großen Varizen, die sich ungleichmäßig entlang der Axone verteilten. Beide Zelltypen zeigten degenerative Veränderungen im Bereich der Dendriten und ein dramatisches Verschwinden von dendritischen Verzweigungen sowohl bei Diabetes als auch bei Bluthochdruck. Als Ursache für diese zellulären Komplikationen werden metabolische und molekulare Änderungen bei Diabetes, Hypertonie und Glaukom, die zur Beeinträchtigung des axonalen und dendritischen Verkehrs in den retinalen Ganglienzellen führen, diskutiert. Untersuchungen zur morphologischen Veränderungen der retinalen Ganglienzellen konnten sehr hilfreich bei der Aufklärung von, bei Diabetes und Bluthochdruck zugrunde liegenden neuropatischen Mechanismen sein [Meyer-Rüsenberg et al. 2007].

4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse (Anti- Rhodopsin)

Die Photorezeptorenschicht wurde mit Hilfe des Anti- Rhodopsins dargestellt. Es zeigen sich deutlich positive Reaktionen in den gesunden und in den diabetischen Netzhäuten. Die Photorezeptorenschicht zeigt mehrere Risse und Kontinuitätsunterbrechungen bei beiden Augen, so dass diese der Postmortalen- und Explantations- Traumata zugeschrieben werden können. Die Veränderungen der Photorezeptorenschicht bei den zuckererkrankten Augen konnten in der vorliegenden Arbeit mit Anti- Rhodopsin Färbungen nicht belegt werden. Aufgrund der Beobachtungen in dieser Studie ist die hier angewendete Technik der Fluoreszenzfärbung mit dem Anti- Rhodopsin allein, nicht geeignet aussagekräftige Rückschlüsse über degenerative Veränderungen in der

Photorezeptorenschicht infolge Diabetes mellitus zu geben. Aber die Färbungen mit ED1 und Mac2 zeigen ein vermehrtes Auftreten von Makrophagen und Mikroglia in der Photorezeptorenschicht, was auf einen Zelluntergang hindeuten kann. Es lässt sich auch annehmen, dass in Zusammenhang mit dem Ganglienzelltod auch ein Verlust der Photorezeptoren einhergeht. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass benachbarte Neurone in Folge synaptischer Dissoziation zur Degeneration neigen [Chu et al. 1993].

4.3.4 Photorezeptorendegeneration

Eine diabetesbedingte Photorezeptorendegeneration wird in der Literatur angenommen und zum Teil nachgewiesen [Nakazawa et al. 2007, Viores et al. 2000, Hamoui et al. 2000, van Eeden et al. 2006]. Photorezeptoren Apoptosis ist eine wesentliche Ursache für visuellen Verlust bei der Netzhautablösung im fortgeschrittenen Stadium der proliferativen diabetischen Retinopathie [Nakazawa et al. 2007]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind aber noch unklar. Die neueren Untersuchungen [Nakazawa et al. 2007, Phipps et al. 2006, van Eeden et al. 2006] beschäftigen sich mit den möglichen Ursachen und deren Ergebnisse sind als therapeutisches Ziel in der Vorbeugung der Photorezeptorendegeneration und des visuellen Verlustes von großer Bedeutung.

Neovaskularisation ist einer der wesentlichen pathogenen Faktoren in der Entwicklung der diabetischen Retinopathie. Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist einer der bekannten Faktoren, der die Neovaskularisation, Zusammenbruch der Blut- Retina Barriere, Makulaödem und letztendlich den visuellen Verlust fördert [Viores et al. 2000]. Viores et al. [Viores et al. 2000] belegen in einer tierexperimentellen Studie, dass eine Überexpression von VEGF relativ schnell zur Neovaskularisation, die sich bis zur Photorezeptorenschicht erstreckt, mit Aufhebung der Blut- Retina Schranke in diesem Bereich führt. Bei einer noch höheren VEGF- Expression beginnt sehr

zünftig die Photorezeptorendegeneration ohne weit verbreitete Neovaskularisation [Vinores et al. 2000].

Die gleichzeitigen vaskulären und neuronalen Schäden im frühen Stadium der diabetischen Retinopathie deuten darauf hin, dass beide Gewebearten betroffen sind und zur Entwicklung einer langfristigen irreversiblen Krankheit führen. Vaskuläre Läsionen werden immer zahlreicher, breiten sich von der Nervenfasern- und Ganglienzellschicht über die innere Retina und dringen in die Photorezeptorenschicht ein. Gleichzeitig werden die Netzhautschichten zunehmend dünner, was auf einen neuronalen Zellschwund hinweist [van Eeden et al. 2006].

4.4 Vergleich der normalen und der diabetischen Retina im Hinblick auf vaskuläre Antigene

4.4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Retina ist spärlich vaskularisiert. Zu Veränderungen der Retinagefäße bzw. zur stärkeren Vaskularisation und Angiogenese kommt es bei pathologischen Befunden z.B. Retinopathia diabetica.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Anti-von Willebrand Faktor Endothelzellen angefärbt und Retinagefäße dargestellt. In der normalen Netzhaut werden die Gefäße in der Ganglienzellschicht und zum Teil in der inneren Retina angetroffen. Es handelt sich hauptsächlich um kleinere Gefäße. Im Gegensatz dazu wird in der diabetischen Retina ein Gefäßreichtum beobachtet. Neben einer Vielzahl kleinerer Gefäße und Kapillare, die sich durch die gesamte Netzhaut erstrecken, werden auch zahlreiche Riesengefäße angetroffen, vor allem in der Ganglienzellschicht und in der Tiefe der inneren Retina.

4.4.2 Mikroangiopathie und Angiogenese bei der diabetischen Retinopathie

Bei Diabetes mellitus offenbart sich die Mikroangiopathie hauptsächlich als Glomerulosklerose (Kimmelstiel-Wilson), Neuropathie und Retinopathie. Ein sehr frühes morphologisches Zeichen der diabetischen Retinopathie ist verminderter Zell-Zellkontakt zwischen Endothelzellen und perivaskulären Zellen mit anschließendem Perizytenabfall von den Kapillaren [Cogan et al. 1961, Speiser et al. 1968, Dodge et al. 1992]. Hohe Glukosekonzentrationen führen zu verschiedenen Stoffwechseleränderungen; so werden z.B. advanced glycation end products (AGEs) durch nichtenzymatische Glykosylierung gebildet und letztlich auch die Expression von NF- κ B (nuclear factor- κ B) in den Perizyten erhöht, die daraufhin apoptotisch zugrunde gehen [Romeo et al. 2002]. Im späteren Stadium der diabetischen Retinopathie folgt die Ausbildung von Mikroaneurysmen und sog. azellulären Kapillaren, zusätzlich kommt es zu einer Verdickung der Basalmembran [Engerman 1989, Hammes et al. 2002]. Durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität kommt es im weiteren Verlauf zu intravitrealen, hämorrhagischen Blutungen und Netzhautödemen [Moss et al. 1988]. Die beschriebenen Gefäßanomalien führen u.a. zu Ablösung der Netzhaut oder zur Ischämie bestimmter Netzhautbezirke. Die resultierende Hypoxie induziert die Expression von VEGF, was zu verstärkter Neovaskularisierung der Retina führen kann. So kommt es bei Patienten, die über Jahre an manifestem Diabetes mellitus Typ 1 leiden, im fortgeschrittenen Stadium über die krankhaften Veränderungen der Netzhautgefäße in vielen Fällen zur Erblindung [Klein et al. 1984].

Von Willebrand Faktor (vWF) ist Glykoprotein, das hauptsächlich von Endothelzellen synthetisiert wird. Von WF spielt eine bedeutende Rolle bei der Thrombozyten- Adhäsion und Aggregation und fungiert als Träger vom Blutgerinnungsfaktor VIII im Plasma. Erhöhte vWF Konzentrationen deuten auf eine Beschädigung der Endothelzellen und deren Dysfunktion hin [Kessler et al. 1998]. In einigen Studien wird nachgewiesen, dass hohe Konzentrationen von

vWF eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der diabetischen Retinopathie haben. So zeigen die Patienten mit proliferativen diabetischen Retinopathie in der Studie von Lipp et al. [Lipp et al. 2000] erhöhte periphere Marker der Angiogenese (Plasma VEGF) und der endothelialen Dysfunktion (vWF). Feng et al. [Feng et al. 2000] finden, dass erhöhte Konzentrationen von vWF mit reduziertem retinalem Blutfluss und Hypoxämie im Zusammenhang stehen. Petty et al. [Petty et al. 1991] finden eine starke Assoziation zwischen dem Ausmaß der Erhöhung des vWF und des Vorhandenseins einer diabetischen Retinopathie. So wurde sich bei der diabetischen Retinopathie um eine spezielle aber auch um eine generalisierte Störung der vaskulären Endothelzellfunktion handeln. Insbesondere die ältere Literatur unterstreicht die Bedeutung des vWF und des Endothels in der Pathogenese der Retinopathie [Paton et al. 1981, Nozaki et al. 1987]. Es werden höhere Konzentrationen von vWF bei den Patienten mit diabetischer Retinopathie gefunden und der vWF als ein Marker der Mikroangiopathie angesehen. Im Gegensatz dazu finden Kessler et al. [Kessler et al. 1998], dass vWF nicht unbedingt mit der Retinopathie korreliert und als ein prädiktiver Marker der Retinopathie nicht angesehen werden kann.

In einer Studie untersuchten die Autoren [Duffy et al. 2006] Wirkung von hohen Glukose Konzentrationen auf makrovaskuläre (Human Aorten- Endothelzellen) und mikrovaskuläre (menschliche Netzhaut- Endothelzellen) Endothelzellen, deren Lebensfähigkeit und Apoptose. Sie stellten fest, dass Hyperglykämie die Lebensfähigkeit der Aorten- Endothelzellen verringert und deren Apoptose induziert, was unter Umständen zur makrovaskulären Komplikationen des Diabetes mellitus führen kann. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Lebensfähigkeit der Netzhaut- Endothelzellen und deren Apoptose wurde gehemmt. Dieses konnte unter Umständen zur Entwicklung der diabetischen Retinopathie führen [Duffy et al. 2006].

Retinopathie ist die häufigste mikrovaskuläre Komplikation von Diabetes mellitus aber der genauer Mechanismus ist noch ungeklärt. Zahlreiche Autoren

beschäftigten sich mit der Aufklärung der genauen Mechanismen. Viele Arbeiten untersuchten die vaskulären Komplikationen und die Rolle des Endothels. Aber die neuere Literatur unterstreicht die Bedeutung und Beteiligung von Gliazellen, Mikroglia und Makrophagen und weist auf eine Neurodegeneration auf [Meyer-Rüsenberg et al. 2007, Knott et al 1999, Nishkiori et al. 2007, van Eeden et al. 2006, Barber et al. 1998].

4.5 Schlussfolgerung und methodologische Aspekte

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind weitestgehend im Einklang mit der bisherigen Literatur. Die diabetische Netzhaut zeigt vaskuläre, gliale und neuronale Abweichungen im Vergleich zu normalen Netzhäuten. Die vorliegenden Befunde geben Hinweise auf eine gliale Proliferation, Invasion und Reaktivierung von Mikroglia und Makrophagen bei der Entwicklung der diabetischen Retinopathie. Ebenfalls bestehen Hinweise auf eine Neurodegeneration, insbesondere der Ganglienzellen. In Zusammenhang mit dem Ganglienzelluntergang wäre auch eine Degeneration der Photorezeptoren und anderen Neuronen anzunehmen. Allerdings scheint die hier angewandte Färbemethode nicht empfindlich genug zu sein um die Photorezeptorschicht genau darzustellen und beurteilen zu können. Die hier präsentierten Befunde bzw. Veränderungen in der diabetischen Retina könnten der Aufklärung von pathophysiologischen Mechanismen, die für die Entwicklung der diabetischen Retinopathie verantwortlich sind, verhelfen.

Das hier untersuchte menschliche Material, drei normale und eine diabetische Retinae, ist aufgrund seiner limitierten Anzahl statistisch gesehen nur begrenzt aussagefähig. Bedingt durch äußere Umstände, eine langwierige öffentliche Debatte über Transplantationsgesetz und eine kritische und misstrauische Öffentlichkeit, vom derzeitigen Standpunkt aus wäre selbst durch längeres Warten keine tief greifende Änderung dieser Situation und damit ein

Mehraufkommen geeigneten Spendermaterials zu erwarten. Trotz dieser Umstände sollte aus medizinischen Gesichtspunkten nicht auf die Untersuchung menschlichen zugunsten tierischen Materials verzichtet werden. So wurde dieser Arbeit dennoch mit dem begrenzt zur Verfügung stehenden humanen Gewebe durchgeführt.

Die präsentierten Ergebnisse stellen einen Hinweis über Veränderungen in der Netzhaut in Hinblick auf Vorkommen von neuronalen und nicht- neuronalen Antigenen und Zellen im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus dar. Weitere, in ähnliche Richtung zielende Arbeiten könnten diese Befunde bestätigen und darauf aufbauen. Dabei wäre es wünschenswert, auf ein größeres Kontingent diabetischer Retinae zurückgreifen zu können, um auf dieser Basis statistisch gesicherte Aussagen zu treffen. Um die Photorezeptorenschicht besser beurteilen zu können müsste jedoch auf andere Färbemethoden zurückgegriffen werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Adamis AP, Berman AJ (2008) Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol* 30(2):65-84
2. Agardh E, Bruun A, Agardh CD (2001) Retinal glial cell immunoreactivity and neuronal cell changes in rats with STZ-induced diabetes. *Curr Eye Res* 23(4):276-284
3. Aiello LP (1997) Vascular endothelial growth factor and the eye: Biochemical mechanisms of action and implications for novel therapies. *Ophthalmic Res* 29:354-362
4. Alexander K (1993) *Gefäßkrankheiten*. Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 1. Aufl. S 52-54
5. Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36:165–179
6. Axenfeld T, Pau H (1992) *Lehrbuch der Augenheilkunde*. Gustav Fischer, Stuttgart Jena New York, 13. Aufl. S 381-423.
7. Bai N, Tang S, Lin J, Zhu B, Luo Y, Lin S (2002) Study on relationship between leukocytes and early diabetic retinopathy. *Yan Ke Xue Bao* 18(2):71-75
8. Bai N, Tang S, Ma J, Luo Y, Lin S (2003) Increased expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cellular adhesion molecule-1 and leukocyte common antigen in diabetic rat retina. *Yan Ke Xue Bao* 19(3):176-183

9. Barber AJ (2003) A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(2):283-290
10. Barber AJ, Antonetti DA, Kern TS, Reiter CE, Soans RS, Krady JK, Levison SW, Gardner TW, Bronson SK (2005) The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(6):2210-8
11. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW (1998) Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 102(4):783-91
12. Barron KD (1995) The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci* 134:57–68
13. Barron KD (2003) Microglia: history, cytology and reactions. *J Neurol Sci* 207: 98
14. Barres BA (1991) New roles for glia. *J Neurosci* 11:3685–3694
15. Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian nervous system. *Physiol Rev* 81:871–927
16. Bek T (1997) Glial cell involvement in vascular occlusion of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol Scand* 75(3):239-243
17. Bek T (1997) Immunohistochemical characterization of retinal glial cell changes in areas of vascular occlusion secondary to diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol Scand* 75(4):388-392

18. Bek T (1998) Capillary closure secondary to retinal vein occlusion. A morphological, histopathological and immunohistochemical study. *Acta Ophthalmol Scand* 76(6):643-8
19. Bek T (2002) A clinicopathological study of venous loops and reduplications in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol Scand* 80(1):69-75
20. Boycott BB, Dowling JE (1969) Organization of the primate retina: Light microscopy. *Philosophical transactions of the Royal Society, London, Series B* 255:109–184
21. Bresnick GH, Engerman R, Davis MD, de Venecia G, Myers FL (1976) Patterns of ischemia in diabetic retinopathy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 81:694-709
22. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820
23. Chang ML, Wu CH, Chien HF, Jiang-Shieh YF, Shieh JY, Wen CY (2006) Microglia/macrophages responses to kainate-induced injury in the rat retina. *Neurosci Res* 54(3):202-212
24. Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JW, Vaughan DE (1998) Sp 1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273:8225-8231
25. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber S, Kohner EM (2007) Leukocytes in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 3(1):3-14
26. Chitu V, Stanley ER (2006) Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 18(1):39-48

27. Chu Y, Humphrey M, Constable I (1993) Horizontal cells of the normal and dystrophic rat retina: a wholemount study using immunolabeling for the 28-kDa calcium-binding protein. *Exp Eye Res* 57:141-148
28. Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T (1961) Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 66:366-378
29. Dacey DM (2000) Parallel pathways for spectral coding in primate retina. *Ann Rev Neurosci* 23:743-775
30. Dacey DM, Petersen MR (1992) Dendritic field size and morphology of midget and parasol ganglion cells of the human retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20):9666-9670
31. Deetjen P, Speckmann EJ (Hrsg.) (1994) *Physiologie*. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore, 2. Aufl. S 85
32. Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW (1998) Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol* 44:1139-1145
33. Dodge AB, D'Amore PD (1992) Cell-cell interactions in diabetic retinopathy. *Diabetics Care* 15:1168-1180
34. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp 1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12222-12226
35. Dudel J, Menzel R, Schmidt RF (Hrsg.) (1996) *Neurowissenschaft*. Springer, Berlin-Heidelberg

36. Duffy A, Liew A, O'Sullivan J, Avalos G, Samali A, O'Brien T (2006) Distinct effects of high-glucose conditions on endothelial cells of macrovascular and microvascular origins. *Endothelium* 13(1):9-16
37. van Eeden PE, Tee LB, Lukehurst S, Lai CM, Rakoczy EP, Beazley LD, Dunlop SA (2006) Early vascular and neuronal changes in a VEGF transgenic mouse model of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(10):4638-4645
38. Enge M, Bjarnegard M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalen M, Asker N, Hammes HP, Shani M, Fässler R, Betsholtz C (2002) Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO-Journal* 21(16): 4307-4316
39. Engerman RL (1989) Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 38:1203-1206.
40. Feit-Leichman RA, Kinouchi R, Takeda M, Fan Z, Mohr S, Kern TS, Chen DF (2005) Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(11):4281-4287
41. Feng D, Bursell SE, Clermont AC, Lipinska I, Aiello LP, Laffel L, King GL, Tofler GH (2000) von Willebrand factor and retinal circulation in early-stage retinopathy of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 23(11):1694-1698
42. Geneser F, Schwerdtfeger W (1990) *Histologie*. Deutscher Ärzteverlag Köln, 1. Aufl. S 343-344
43. Ginsberg HN (2000) Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin. Invest* 106:453-458

44. Gordon S, Lawson L, Rabinowitz S, Crocker PR, Morris L, Perry VH (1992) Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* 181:1-37
- 60
45. Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS (1992) Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem* 267:12404-12407
46. Hammes HP, Jihong L, Renner O, Shani M, Lundqvist A, Betsholtz C, Brownlee M, Deutsch U (2002) Pericytes and the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 51:3107-3112
47. Hammes HP (2003) Pathophysiological mechanisms of diabetic angiopathy. *J Diabetes Complications* 17:16-19
48. Hamaoui K, Butt A, Powrie J, Swaminathan R (2004) Real-time quantitative PCR measurement of circulatory rhodopsin mRNA in healthy subjects and patients with diabetic retinopathy. *Ann N Y Acad Sci* 1022:152-156
49. Hansson E, Rönnbäck L (2003) Glial neuronal signalling in the central nervous system. *FASEB J* 17:341-348
50. Hellström M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C (2001) Lack of Pericytes leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *Journal of Cell Biology* 153:543-553
51. Hempel A et al. (1997) High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ Res* 81:363-371

52. Hof H, Dorries R (2005) Medizinische Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart New York, 3. Aufl. S 82-88
53. Hose S, Zigler JS Jr, Sinha D (2005) A novel rat model to study the functions of macrophages during normal development and pathophysiology of the eye. *Immunol Lett* 96(2):299-302
54. Huijberts MSP et al. (1993) Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J Clin Invest* 92 1407-1411
55. Ishida S, Yamashiro K, Usui T, Amano S, Ogura Y, Hida T, Oguchi Y (2004) Significance of leukocytes in the regulation of retinal edema, ischemia, and angiogenesis. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 108(4):193-201
56. Ishii H et al. (1996) Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272:728-731
57. Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J, Tjian R (1988) Distinct regions of Sp 1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* 242:1566-1570
58. Kakehashi A, Inoda S, Mameuda C, Kuroki M, Jono T, Nagai R, Horiuchi S, Kawakami M, Kanazawa Y (2008) Relationship among VEGF, VEGF receptor, AGEs, and macrophages in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 79(3):438-445
59. Kalla R, Bohatschek M, Kloss CUA, Krol J, von Maltzan X, Raivich G (2003) Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: Involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase and Gi-protein systems. *Glia* 41:50-63

60. Kaplan E, Lee BB, Shapley R (1990) New views of primate retinal function. In Osborne N, Chader G (Hrsg.) Progress in Retinal Research 9:273–336
61. Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA (2001) Origin of microglia. Microsc Res Tech 54:2–9
62. Kessler L, Wiesel ML, Attali P, Mossard JM, Cazenave JP, Pinget M (1998) Von Willebrand factor in diabetic angiopathy. Diabetes Metab 24(4):327-336
63. Kiessling J, Kruse S, Rensing SA, Harter K, Decker EL, Reski R (2000) Visualization of a cytoskeleton-like FtsZ network in chloroplasts. Journal of Cell Biology 151:945-950
64. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL (1984) The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 102:520-532
65. Knott RM, Robertson M, Muckersie E, Folefac VA, Fairhurst FE, Wileman SM, Forrester JV (1999) A model system for the study of human retinal angiogenesis: activation of monocytes and endothelial cells and the association with the expression of the monocarboxylate transporter type 1 (MCT-1). Diabetologia 42(7):870-7
66. Kohner EM, Mcleod D, Marshall J (1982) Diabetic eye disease: Complications of diabetes. Keen H and J Jarrett, London Arnold
67. Kolb B, Whishaw IQ (1996) Neuropsychologie. Spektrum
68. Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 2. Aufl. S 92-94

69. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED (1998) High glucose induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 101:160-169.
70. Koya D, King GL (1998) Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47:859-866
71. Kuffler SW, Nicholls JG (1966) The physiology of neuroglial cells. *Ergeb Physiol* 57:1-90
72. Lang GK, Gareis O, Lang GE, Recker D, Spraul CW, Wagner P (2008) *Augenheilkunde*. Thieme, Stuttgart New York, 4. Aufl. S 311-317
73. Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF (1991) Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res* 28:236-243
74. Lecleire-Collet A, Tessier LH, Massin P, Forster V, Brasseur G, Sahel JA, Picaud S (2005) Advanced glycation end products can induce glial reaction and neuronal degeneration in retinal explants. *Br J Ophthalmol* 89(12):1631-1633
75. Lennie P, Trevarthen C, Van Essen D, Wässle H (1990) Parallel processing of visual information. In: Spillman L, Werner JS (Hrsgb.): *Visual Perception: The Neurophysiological Foundations*, New York: Academic Press, 103-128
76. Leonhardt H (1985) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Thieme, Stuttgart, 7. Aufl. S 233-241
77. Leventhal AG, Rodieck RW, Dreher B (1981) Retinal ganglion cell classes in the Old World monkey: morphology and central projections. *Science* 213(4512):1139-1142

78. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C (1997) Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice. *Science* 277:242-245
79. Ling EA, Wong WC 1993 The origin and nature of ramified and amoeboid Microglia: A historical review and current concepts. *Glia* 7:9–18
80. Lip PL, Belgore F, Blann AD, Hope-Ross MW, Gibson JM, Lip GY (2000) Plasma VEGF and soluble VEGF receptor FLT-1 in proliferative retinopathy: relationship to endothelial dysfunction and laser treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(8):2115-2119
81. Löffler G, Petrides PE (1997) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 5. Aufl. S 920-930
82. Lu M. et al. (1998) Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelium growth factor expression. *J. Clinical Investigation* 101:1219-1224
83. Malone JI, Morrison AD, Pavan PR, Cuthbertson DD (2001) Diabetes Control and Complications Trial: Prevalence and significance of retinopathy in subjects with type 1 diabetes of less than 5 years' duration screened for the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 24(3):522-526
84. Manschot WA, Lee WR (1985) Development of retinal neovascularisation in vascular occlusive disease. *Trans Ophthalmol Soc U K* 104:880-886
85. Meyer-Rüsenberg B, Pavlidis M, Stupp T, Thanos S (2007) Pathological changes in human retinal ganglion cells associated with diabetic and hypertensive retinopathy. *Graefe's Arch Exp Ophthalmol* 245:1009-1018

86. Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M (1998) Muller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes* 47(3):445-449
87. Moses R, Hart WJ (1987) Adler`s Physiology of the eye. Clinical Application St. Louis, Washington D.C., Toronto: Mosby Comp
88. Moss SE, Klein R, Klein BE (1988) The incidence of vision loss in adiabetic population. *Ophthalmology* 95:1340-1348
89. Nakazawa T, Hisatomi T, Nakazawa C, Noda K, Maruyama K, She H, Matsubara A, Miyahara S, Nakao S, Yin Y, Benowitz L, Hafezi-Moghadam A, Miller JW (2007) Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(7):2425-2430
90. Naumann GO, Apple DJ, Deuble-Bente K, von Domarus D, Doerr W (Hrsg), Seifert G (Hrsg) (1997) *Pathologie des Auges*. Springer, Berlin Heidelberg, 2. Aufl. S 14-39, 834-849
91. Nishikawa et al. (2000) Normalising mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787-790
92. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, Kojima T, Mitamura Y, Ohguro H, Sawada N (2007) Glial cell-derived cytokines attenuate the breakdown of vascular integrity in diabetic retinopathy. *Diabetes* 56(5):1333-40
93. Noda K, Miyahara S, Nakazawa T, Almulki L, Nakao S, Hisatomi T, She H, Thomas KL, Garland RC, Miller JW, Gragoudas ES, Kawai Y, Mashima Y, Hafezi-Moghadam A (2008) Inhibition of vascular adhesion protein-1 suppresses endotoxin-induced uveitis. *FASEB J* 22(4):1094-1103

94. Nozaki H, Hiramatsu K, Arimori S (1987) Factor VIII, von Willebrand factor and platelet adhesiveness in diabetic retinopathy. *Tokai J Exp Clin Med* 12(1):7-9
95. Okamoto T, Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Koga K, Abe R, Takeuchi M, Ohno S, Yoshimura A, Makita Z (2002) Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin. *FASEB J* 16(14):1928-1930
96. Ozerdem U, Monosov E, Stallcup WB (2002) NG2 Proteoglycan Expression by Pericytes in Pathological Microvasculature. *Microvascular Research* 63:129-134
97. Paton RC, Passa P, Canivet J (1981) Von Willebrand factor, diabetes mellitus and retinopathy. *Horm Metab Res Suppl* 11:55-58
98. Patz A (1982) Clinical and experimental studies on retinal neovascularization. XXXIX Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 94(6):715-743
99. Peichl L (1989) Organisation of the retina: structure/function relations and a species comparison of retinal ganglion cells. *Fortschr Ophthalmol* 86:47-53
100. Perry VH, Cowey A (1984) Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neurosci* 12:1101-1137
101. Petty RG, Pottinger BE, Greenwood RM, Pearson JD, Mahler RF (1991) Diabetes is associated with a high incidence of endothelial-binding antibodies which do not correlate with retinopathy, von Willebrand

- factor, angiotensin-converting enzyme or C-reactive protein. *Diabetes Res* 17(3):115-123
102. Phipps JA, Yee P, Fletcher EL, Vingrys AJ (2006) Rod photoreceptor dysfunction in diabetes: activation, deactivation, and dark adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(7):3187-3194
 103. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LEH (1995) Vascular endothelium growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularisation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:905-909
 104. Portilla D et al. (2000) Etomoxir-induced PPAR alpha modulated enzymes protect during acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:667-675
 105. Quigley H, Dunkelberger G, Green W (1988) Chronic human glaucoma causes selectively greater loss of large optic nerve fibers. *Ophthalmology* 95:357-363
 106. Quigley H, Dunkelberger G, Green W (1989) Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *Am J Ophthalmol* 107:453-464
 107. Quigley H, Sanchez R, Dunkelberger G, L'Hernault N, Balginski T (1987) Chronic glaucoma selectively damages large optic nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:913-920
 108. Reichenbach A, Robinson SR (1995) Ependymoglia and ependymoglia-like cells. *Neuroglia*, Hrsg Kettenmann H, Ransom BR, Oxford University Press, pp. 58-84

109. Reski R (2002) Rings and networks: the amazing complexity of FtsZ in chloroplasts. *Trends in Plant Science* 7:103-105
110. Rodieck RW (1988) The Primate Retina. In: Steklis HD, Erwin J (Hrsg.) *Comparative Primate Biology, Neuroscience*, New York, Vol. 4, S 203–278
111. Rodieck RW, Binmoeller KF, Dineen J (1985) Parasol and midget ganglion cells of the human retina. *Journal of Comparative Neurology* 233:115–132
112. Romeo G, Liu WH, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M (2002) Activation of nuclear factor kappa B induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* 51(7):2241-2248.
113. Rungger-Brandle E, Dosso A, Leuenberger PM (2000) Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(7):1971-1980
114. Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, Stern LJ, Strominger JL, Riese R (2001) Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6295–6300
115. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (1999) *Anatomie*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 8. Aufl. S 692-702.
116. Schmidt RF, Thews G (1997) *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 27. Aufl. S 283-315
117. Somjen GG (1979) Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol* 41:159–177

118. Speiser P, Gittelsohn AM, Patz A (1968) Studies on diabetic retinopathy. III Influence of diabetes on intramural pericytes. Arch Ophthalmol 80:332-337
119. Spirin KS, Saghizadeh M, Lewin SL, Zardi L, Kenney MC, Ljubimov AV (1999) Basement membrane and growth factor gene expression in normal and diabetic human retinas. Curr Eye Res 18:490-499
120. Standl E, Maurer D (1997) Neuerblindungen bei Diabetikern 1995 in Oberbayern. Diabetes und Stoffwechsel 6(1):16
121. Stitt AW et al. (1997) Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. Am. J. Pathol 150:523-528
122. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E (1995) Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. J Neurosci 15: 4738–4747
123. Thanos S (1991) Specific transcellular carbocyanine-labeling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration. Neurosci Lett 127:108-112
124. Thanos S, Rohrbach J, Thiel H (1991) Gliale und neuronale zelluläre Veränderungen in der glaukomatösen menschlichen Retina. Fortschr Ophthalmol 88:341-345
125. Thanos S, Thiel H-J (1990) Regenerative and proliferative capacity of adult human retinal cells in vitro. Graefe`s Arch Clin Exp Ophthalmol 228:369-376

126. Thornalley PJ (1990) The glyoxalase system: new developments towards functional characterisation of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 269:1-11
127. Trautner C, Icks A, Haastert B, Plum F, Berger M (1997) Incidence of blindness in relation to diabetes: A population-based study. *Diabetes Care* 20(7):1147-1153
128. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998) Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. (UKPDS 33) *Lancet* 352: 837-853
129. Viores SA, Derevjanić NL, Viores MA, Okamoto N, Campochiaro PA (2000) Sensitivity of different vascular beds in the eye to neovascularization and blood-retinal barrier breakdown in VEGF transgenic mice. *Adv Exp Med Biol* 476:129-138
130. Watanabe M, Rodieck RW (1989) Parasol and midget ganglion cells of the primate retina. *Journal of Comparative Neurology* 289:434-454
131. Wells-Knecht KJ et al. (1995) Mechanism of autooxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autooxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 34:3702-3709
132. Werblin F (1991) Synaptic connections, receptive fields, and patterns of activity in the tiger salamander retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 32:459-483

133. Werblin FS, Dowling JE (1969) Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *Journal of Neurophysiology* 32: 339–355
134. Yamagishi SS, Amano S, Inagaki Y, Okamoto T, Koga K, Sasaki N, Yamamoto H, Takeuchi M, Makita Z (2002) Advanced glycation end products-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290:973-978
135. Yanagi Y (2008) Role of Peroxisome Proliferator Activator Receptor gamma on Blood Retinal Barrier Breakdown. *PPAR Res* 2008:679237
136. Zeng XX, Ng YK, Ling EA (2000) Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Vis Neurosci* 17(3):463-471
137. Zhang C, Tso MO (2003) Characterization of activated retinal microglia following optic axotomy. *J Neurosci Res* 73(6):840-845

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Solon Thanos (Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Leiter der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie) für die Überlassung dieses interessanten Themas aussprechen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Univ. Prof. Dr. Dr. S. Thanos für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und das freundliche und produktive Klima in der Arbeitsgruppe bedanken.

Herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter der experimentellen Ophthalmologie/ Universitätsklinikum Münster, die mich bei der Umsetzung der Experimente und bei den mikroskopischen Untersuchungen unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter.

Ausdrücklich möchte ich meinem Mann für den moralischen Beistand und seine Unterstützung während meiner Arbeit danken

Lebenslauf

Geburtsdatum:	29.09.1972
Geburtsort:	Sarajevo, Bosnien-Herzegowina
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet, eine Tochter
Schulbildung:	
06/1990	Abitur
Studium:	
WS 1990/91 - WS 1992/93	Studium der Zahnmedizin an der Universität Sarajevo
WS 1994/95 - 12.1999	Studium der Zahnmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Beruflicher Werdegang:	
06.2000 - 06.2003	Assistenz Zahnärztin (Praxis, Bünde/Westfalen)
06.2003 - 06.2007	Weiterbildungsassistentin im Fach Kieferorthopädie (Dreijährige Weiterbildungs-Fachpraxis Andernach/Rheinland-Pfalz)
11.2006	Master of Science Kieferorthopädie (Donau Universität Krems/Österreich)
11.2008	Fach Zahnärztin für Kieferorthopädie (Universität Mainz/Rheinland-Pfalz) Erziehungsurlaub
Seit dem 01.12.2009	Angestellte Kieferorthopädin in der Fachpraxis (Geislingen/Baden-Württemberg)