



Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos -

**„Morphologische Untersuchungen an retinellen
Ganglienzellveränderungen in einem tierischen Glaukommodell“**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Goffer, Irad

aus Beer-Sheva

2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Böcker

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos
- Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos -
- Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Böcker -

ZUSAMMENFASSUNG

Morphologische Untersuchungen an retinellen Ganglienzellveränderungen in einem tierischen
Glaukommodell

Irad Goffer

Das Glaukom stellt eine vielfältige Gruppe von Funktionsstörungen dar mit einer gemeinsamen Folge: *Optikus*-Neuropathie, die letztendlich zur Erblindung führt. Diese chronische Krankheit, die mit einem progressiven Verlust von RGZ und deren Axone einhergeht, führt zur Entwicklung eines mit der Zeit zunehmenden Gesichtsfeldverlustes.

In der vorliegenden Dissertation wurden die Effekte des erhöhten Augeninnendruckes an den retinalen Ganglienzellen bei genetisch mutierten Ratten (sogenannte „rcsGL-Ratten“) mit angeborenem Glaukom (Buphthalmus) analysiert, um krankheitsbedingte Zellveränderungen zu erfassen.

Durch die retrograde Färbung der RGZ mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI in fixiertem Gewebe war es möglich, die verschiedenen RGZ-Typen fluoreszenzmikroskopisch zu unterscheiden und auf morphologische Veränderungen zu untersuchen.

Alle untersuchten rcsGL-Ratten zeigten bilateral pathologische IOD-Werte, die über 16 mmHg lagen. Die dargestellte Zusammensetzung der drei verschiedenen Zelltypen entsprach grob der üblichen Verteilung von RGZ in der Rattenretina.

Die größten Somata wurden bei SD-Ratten dargestellt, und nahmen bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten stufenweise ab. Auch die höchsten Werte der Dendritenfelder und der Verzweigungshäufigkeit wurden bei SD-Ratten gefunden und waren bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten ähnlich niedriger.

Bei der rcsGL-Ratte wurde zunächst eine Hypertrophie der Somata und Dendritenfelder beobachtet, die über längere Zeit wiederum atrophierten und an Größe abnahmen.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein erhöhter Augeninnendruck in unserem Tiermodell, zu Gewebeveränderungen führt, die sich als Apoptosis oder Veränderungen der Zellmorphologie manifestieren. Dies trifft auch bei der Glaukom-Erkrankung zu.

Die Ergebnisse sind für das Verständnis von zellulären Vorgängen beim Glaukom wichtig, da sie den morphologischen und chronologischen Verlauf der Zellschädigung darstellen und eine Grundlage für die Entwicklung einer eventuellen Therapie des Glaukoms sein könnten.

Die tierexperimentelle Arbeit wurde am 26.04.2001 durch die Bezirksregierung Münster genehmigt, und unter dem Aktenzeichen Nummer G9/2001 registriert.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2006

A. Einleitung	1
1. Anatomie des Auges	1
2. Die Retina	2
2.1. Morphologie und Funktion der Retina	2
2.2. Retinale Ganglienzellen (RGZ)	5
3. Das Glaukom	8
3.1. Einleitung und Definition	8
3.2. Physiologie der Kammerwasser-Zirkulation	9
3.3. Klassifizierung der Glaukome	10
3.4. Folgen okulärer Hypertension: „Glaukomschäden“	11
3.5. Das Glaukom am Tiermodell der Ratte	12
3.6. Die Royal College of Surgeons-Glaukom-Ratte (rcsGL-Ratte)	13
B. Material / Methoden / Techniken	16
1. Versuchstiere	16
2. Augeninnendruck	16
2.1. Verwendete Geräte und Lösungen	16
2.2. IOD-Messung	16
3. Die Retina	17
3.1. Verwendete Geräte und Lösungen	17
3.2. Präparation der Retina	17
4. Histologie	19
4.1. Verwendete Geräte, Lösungen und Fluoreszenzfarbstoff	19
4.2. Retrograde Färbung der RGZ in vitro	19

5.	Fluoreszenzmikroskopie.....	20
5.1.	Verwendete Geräte und Lösungen	20
5.2.	Vermessung der Ganglienzellen.....	21
C.	Ergebnisse	24
1.	Augeninnendruck.....	24
2.	Verteilung der RGZ.....	25
3.	Größe und Morphologie der RGZ vom Typ I, II und III.....	26
3.1.	Somafläche der RGZ	32
3.2.	Dendritenfeldflächen der RGZ	33
3.3.	Verzweigungshäufigkeit der Dendritenbäume	34
3.4.	Morphologische Änderungen von RGZ bei der rcsGL-Ratte	36
D.	Diskussion	39
1.	Das Glaukom	39
2.	Die rcsGL-Ratte als Tiermodell des Glaukoms.....	39
3.	Augeninnendruck.....	40
4.	Retrograde Färbung der RGZ.....	41
5.	Verteilung der RGZ.....	41
6.	Morphologie der RGZ	42

E.	Zusammenfassung	47
F.	Abkürzungen	48
G.	Literaturverzeichnis	49
H.	Lebenslauf	55
I.	Danksagung	56

A. Einleitung

1. Anatomie des Auges

Der dioptrische Apparat besteht aus der durchsichtigen *Kornea* (Hornhaut), den mit Kammerwasser gefüllten vorderen und hinteren Augenkammern, der die Pupille bildenden Iris, der Linse, die von einer durchsichtigen Linsenkapsel umgeben ist, und dem Glaskörper, der den größten Raum des Augapfels ausfüllt (s. Abb. 1).

Der Glaskörper besteht aus einem wasserklaren Gel aus extrazellulärer Flüssigkeit, in der Kollagen und Hyaluronsäure kolloidal gelöst sind. Die hintere Oberfläche an der Innenseite des Auges wird von der *Retina* (Netzhaut) ausgekleidet. Der Raum zwischen *Retina* und der den *Bulbus oculi* bildenden festen *Sklera* wird durch das Gefäßnetz der *Choroidea* ausgefüllt. Am hinteren Pol des Auges hat die menschliche *Retina* eine kleine Grube, die *Fovea centralis*. Sie ist für das Tageslichtsehen die Stelle des schärfsten Sehens und normalerweise der Schnittpunkt der optischen Achse des Auges mit der Netzhaut (Schmidt & Thews, 1997). Medial vom hinteren Pol verlässt der Sehnerv, *N. Opticus*, den Bulbus (Schiebler, 1999).

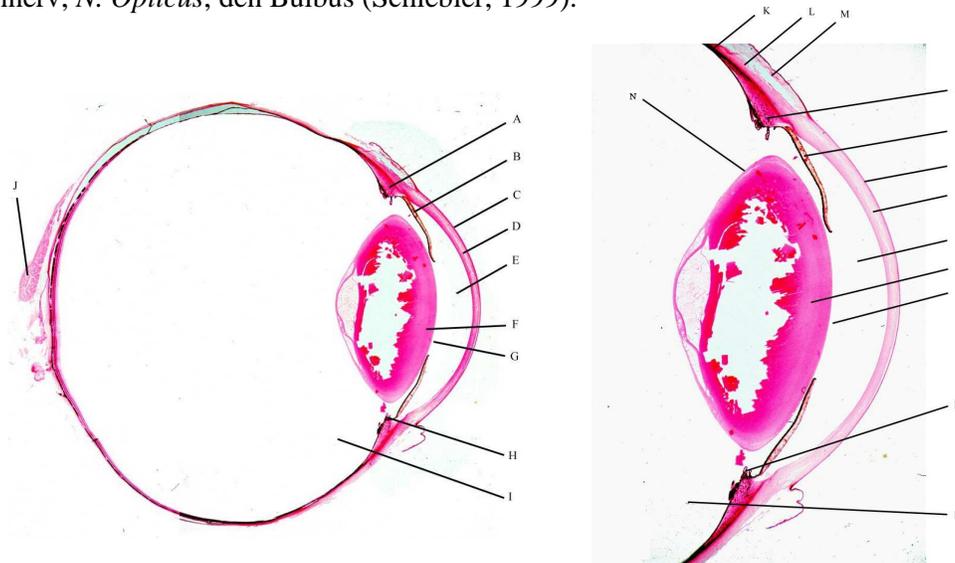


Abb. 1: Medianer Schnitt des Auges: A - Ziliarkörper, B - Iris, C - *Conjunctiva* (Bindehaut), D - *Kornea* (Hornhaut), E - vordere Augenkammer, F - Linse, G - Pupille, H - Linsenaufhängung, I - Hintere Augenkammer, J - *N. Opticus* (Sehnerv), K - *Retina* (Netzhaut), L - *Choroidea* (Aderhaut), M - *Sklera* (Lederhaut), N - Linsenkapsel.

2. Die Retina

2.1. Morphologie und Funktion der Retina

Die *Retina* entsteht während der Embryonalentwicklung aus einer Ausstülpung des Zwischenhirnbodens. Sie ist ein Teil des Zentralnervensystems (Schmidt & Thews, 1997).

Die Neuroretina ist aus folgenden neun Schichten aufgebaut: *Membrana limitans interna*, Nervenfaserschicht, Ganglienzellschicht, innere plexiforme Schicht, innere nukleäre Schicht, äußere plexiforme Schicht, äußere nukleäre Schicht, *Membrana limitans externa*, Photorezeptoren (s. Abb. 2).

Die verschiedenen Neuronentypen der Netzhaut sind in Schichten angeordnet. 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).

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).

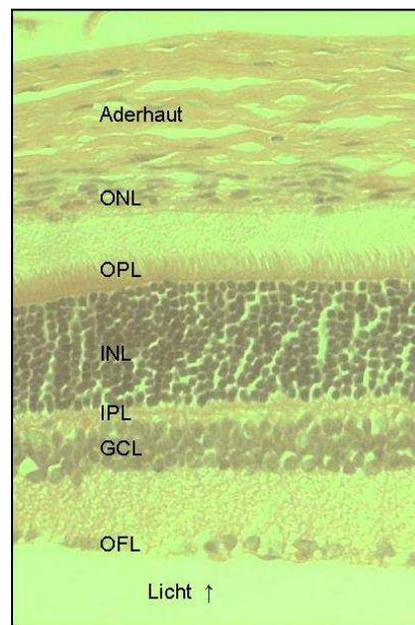


Abb. 2: Lichtmikroskopische Abbildung eines vertikalen Schnittes durch die *Retina* der Ratte, mit Darstellung der Schichten: **ONL** = äußere nukleäre Schicht, **OPL** = äußere plexiforme Schicht, **INL** = innere nukleäre Schicht, **IPL** = innere plexiforme Schicht, **GCL** = Ganglienzellschicht, **OFL** = äußere Faserschicht.

Die Anpassung an die Beleuchtungsbedingungen der Umwelt wird durch zwei retinale Rezeptortypen mit unterschiedlichen Absolutschwellen erleichtert. Mit den Stäbchen der Netzhaut wird bei Sternenlicht gesehen (skotopisches Sehen), mit den Zapfen am Tage (photopisches Sehen). Beim skotopischen Sehen erkennt man Helligkeitsunterschiede, aber keine Farben. Beim photopischen Sehen kann man dagegen an den Gegenständen Farben und Hell-Dunkelwerte unterscheiden. Die prozentuale Verteilung von Stäbchen und Zapfen in der Netzhaut verschiedener Säugetierarten hängt u.a. davon ab, ob sie überwiegend nachtaktiv oder tagaktiv sind.

Die Rezeptorschicht des menschlichen Auges besteht aus etwa 120 Millionen Stäbchen und 6 Millionen Zapfen. Die Rezeptordichte (Rezeptoren pro Flächeneinheit) ist für die Zapfen in der Mitte der Fovea, für die Stäbchen dagegen im parafovealen Bereich am höchsten. In der Fovea centralis gibt es keine Stäbchen, die Fovea ist also für das Tageslichtsehen spezialisiert (Schmidt & Thews, 1997).

Da Belichtung eines Photorezeptors eine Abnahme von intrazellulärem Natrium, Verdunklung dagegen eine Erhöhung von Natrium bewirkt, kommt es bei Belichtung der Photorezeptoren zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials, bei Verdunklung zu einer Depolarisation. Im Dunkeln beträgt das Membranpotential der Photorezeptormembran etwa -30 mV. Die Amplitude des Photorezeptorpotentials nimmt mit der Intensität der Lichtreize zu (Schmidt & Thews, 1997).

Jener Bereich des Gesichtsfeldes bzw. der Netzhaut, dessen adäquate Stimulation zu einer Aktivitätsänderung des Neurons führt, nennt man „Rezeptives Feld (RF) eines visuellen Neurons“. Ein RF kann in funktionell unterschiedliche Bereiche aufgeteilt werden. In der Netzhaut sind die RFs meist „konzentrisch“ organisiert: Das RF-Zentrum ist von einer ringförmigen RF-Peripherie umgeben. Die räumliche Ausdehnung der RFs nimmt in der Regel von der Fovea zur Netzhautperipherie zu. RFs benachbarter Neurone überlagern sich. Das RF ist der Ausdruck der Signalkonvergenz und Signaldivergenz der Nervenzellen des retinalen Neuronennetzes. Man unterscheidet in der Netzhaut einen „direkten“ Signalfluss (Photorezeptoren-Bipolarzellen-Ganglienzellen) und einen „lateralen“ Signalfluss von den Photorezeptoren über die Interneurone (Horizontalzellen, Amakrinen) zu den Bipolar- und Ganglienzellen (Schmidt & Thews, 1997).

2.2. Retinale Ganglienzellen (RGZ)

Die Sehnerven beider Augen sammeln alle Axone der retinalen Ganglienzellen (RGZ) und vereinigen sich an der Schädelbasis zum *Chiasma nervi optici*. Die aus der nasalen Retinahälfte stammenden Sehnervenfasern kreuzen im *Chiasma* zur Gegenseite und ziehen mit den ungekreuzten Sehnervenfasern aus der temporalen Retinahälfte im *Tractus opticus* zu den ersten zentralen Schaltstationen der „Sehbahn“ im Gehirn, den subkortikalen „visuellen Zentren“ (*Corpus geniculatum laterale, Hypothalamus, Area praetectalis, Colliculi superiores*) (Schmidt & Thews, 1997).

Die On-Zentrum-Ganglienzellen reagieren auf Belichtung des RF-Zentrums mit einer Aktivierung, auf Verdunklung mit einer Hemmung. Ihre Antwort auf Stimulation der RF-Peripherie ist spiegelbildlich: Lichthemmung und Dunkelaktivierung. Die Off-Zentrum-Ganglienzellen reagieren entgegengesetzt zu den On-Zentrum-Ganglienzellen: Lichthemmung und Dunkelaktivierung bei Belichtung des RF-Zentrums, Licht-Aktivierung und Dunkelhemmung bei Reizung der RF-Peripherie. Die Erregungs- und Hemmungsprozesse, die aus dem RF-Zentrum und der RF-Peripherie ausgelöst werden summieren sich bei den On-Zentrum- und Off-Zentrum-Ganglienzellen (Schmidt & Thews, 1997).

In der menschlichen Retina existieren zwölf bis fünfzehn verschiedene Typen von Ganglienzellen, die sich äußerlich beispielsweise durch ihre Größe und die Verzweigungsmuster ihrer Dendriten unterscheiden lassen. Die wichtigsten Ganglienzelltypen sind die sogenannten parvozelluläre oder P-Zellen (auch Zwergzellen = Midget Cells (relativ klein)) die sogenannten magnozellanäre oder M-Zellen (auch Schirmzellen = Parasol Cells (relativ groß)). Die M-Zellen besitzen eine hohe räumliche Dichte und kleine Dendritenbäume. Sie erhalten ihre Impulse vorwiegend von den retinalen Stäbchen. Somit ermöglicht das licht-, aber nicht farbempfindliche M-System ein hohes Auflösungsvermögen (Sehschärfe). Das P-System dagegen wird eher von den retinalen Zapfen gespeist und ist somit farbempfindlich. Bemerkenswert ist auch, dass das M-System Informationen von der gesamten Retina (auch aus der Peripherie), das P-System aber eher Informationen aus dem Bereich der Fovea erhält.

Retinale Ganglienzellen fielen früh in der neuroanatomischen Forschung durch ihre besonders auffällige Morphologie und die Vielfalt ihrer dendritischen Verzweigungen

auf. Cajal verwendete das argyrophile Verhalten der Ganglienzellen, um verschiedene Arten von RGZ

zu klassifizieren. Als Klassifikationsmerkmale verwendete er die Form (Morphologie der Dendriten), die Ausdehnung (Größe des Zellkörpers und des Dendritenbaumes) und die Anzahl der Unterschichten, in denen die Ganglienzellen sich verzweigen (Ramifikationsniveau in der IPL).

Der Aufstellung einer Drei-Gruppen-Klassifikation der RGZ in der Katzenretina (Boycott & Wässle, 1974) (s. Abb. 3) folgten mehrere Versuche, die RGZ auch in der Rattenretina entsprechend zu klassifizieren.

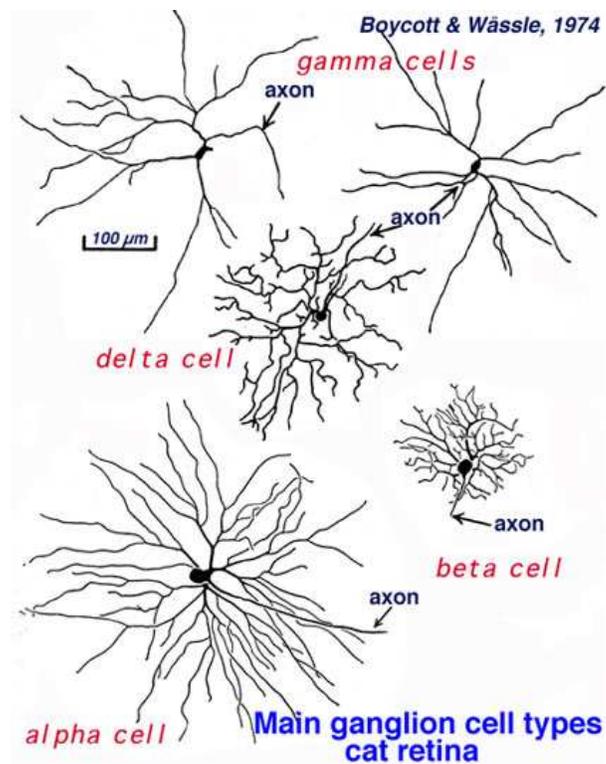


Abb. 3: Golgi-gefärbte RGZ der Katzenretina (aus: Boycott & Wässle, 1974).

Die Dendritenfelder der Ganglienzelle variieren im Durchmesser in der folgenden morphologischen Hauptklassifikation der RGZ der Ratte in drei Gruppen. Für die RGZ vom Typ I und III sind sie groß (bis zu 540 µm) und klein bis mittelgroß für Typ II-Zellen (140 bis 250 µm) (Thanos, 1988). Allerdings basiert diese Klassifizierung nicht nur auf der Zellgröße, der Größe der Dendritenfelder und der Dendritenmorphologie,

sondern auch auf den physiologischen Zelleigenschaften, Leitungsgeschwindigkeiten und zentralen Projektionsgebieten (Fukuda, 1977; Perry, 1979; Ni & Dreher, 1981; Dreher et al. 1985).

Nach Fukuda (1977) könnten die Typ I-, II- und III-Zellen bei der Ratte den morphologischen α -, β - und γ -Zellen bei der Katze (Boycott & Wässle, 1974) entsprechen. Perry (1979) korreliert die Typ I-Zellen der Ratte zu den α -Zellen der Katze und die Typ II- Zellen zu den β -Zellen, nicht aber die Typ III-Zellen zu den γ -Zellen. Thanos (1988) bestätigt die Korrelationen von Perry (1979) und Fukuda (1977) und verstärkt die Annahme, dass die Typ III-Zellen der Ratte den γ -Zellen der Katze entsprechen könnten.

Die verschiedenen Typen von RGZ in der Rattenretina scheinen typenspezifische, stereotype Verastungsmuster zu besitzen. Zusammen mit der unterschiedlichen Verzweigungshäufigkeit zwischen den Typ I-, II- und III-Zellen sind dies wertvolle Parameter, um die verschiedenen RGZ-Typen zu unterscheiden (Thanos, 1988).

Die Mehrzahl der RGZ ist in der GCL lokalisiert. Es erscheint so, also ob ein kleinerer Teil (< 1.5%) der RGZ „deplaziert“ sind, da sie sich am inneren Rand der INL befinden (Perry, 1979; Linden, 1987; Drager & Olsen, 1981). Alle morphologischen Klassen und Zellgrößen scheinen in der Gruppe der deplazierten RGZ repräsentiert zu sein und sind auf der ganzen *Retina* verteilt (Perry, 1979; Dreher et al. 1985; Linden, 1987).

Die retinalen Ganglienzellen können bei diversen Erkrankungen der Netzhaut geschädigt werden. Folgende Netzhautgefäßerkrankungen können u.a. vorkommen: Gefäßdilataationen, Gefäßobliterationen, Exsudationen in die Netzhaut als Ausdruck einer gestörten Funktion der Blut-Retina-Schranke, sowie intra- und präretinale Gefäßproliferationen. Am häufigsten sind die diabetische Retinopathie (in den westlichen Ländern eine der häufigsten Ursachen für Blindheit), die arterielle Hypertonie und der Zentralvenenverschluss. Weiterhin werden RGZ durch degenerative Netzhauterkrankungen, Netzhautablösung, Erkrankungen der Makula, Netzhautentzündungen, Glaukomschäden, traumatische und toxische Netzhautveränderungen und Sehnervschädigungen sowie Tumoren der Netzhaut geschädigt. Diese Erkrankungen können bis hin zur Erblindung führen, da eine Schädigung der RGZ irreversibel ist.

3. Das Glaukom

3.1. Einleitung und Definition

Als Glaukom (grüner Star) bezeichnet man eine Anzahl von ätiologisch verschiedenen Krankheiten. Deren gemeinsames Kennzeichen ist die Steigerung des Augeninnendrucks auf Werte, die sich schädlich ausgewirkt haben oder höchstwahrscheinlich schädlich auswirken werden (Axenfeld & Pau, 1992).

Das Glaukom gehört zu den häufigsten Erblindungsursachen. Pro Jahr erblinden ca. 6,7 Millionen Menschen an Glaukomen, weltweit gibt es schätzungsweise 66,8 Millionen Erkrankte (Daten gültig für das Jahr 2000). Eine hohe Dunkelziffer ist jedoch auch anzunehmen. In den Industrienationen rangiert das Glaukom an dritter Stelle der Erblindungsursachen (nach Makuladegeneration und diabetischer Retinopathie), in den Entwicklungsländern an zweiter Stelle (nach Katarakt) und weltweit an erster Stelle der irreversiblen Erblindungen. Die Prävalenz des Glaukoms steigt mit dem Alter und variiert zwischen Ländern und Rassen (das Glaukom ist mindestens vier- bis sechsmal häufiger in der schwarzen Bevölkerung als in der weißen) (Racette et al., 2003). Ein Glaukom in der familiären Anamnese bringt ein 15- bis 20-faches Risiko mit sich, die Krankheit zu entwickeln. Das Glaukom kann in allen Altersgruppen vorkommen, einschließlich bei Kindern, tritt aber häufiger bei älteren Menschen auf (Coleman, 1999).

Der Augeninnendruck liegt in der Bevölkerung im Allgemeinen zwischen 11 und 21 mmHg. Obwohl es keinen Grenzwert gibt, wird 21 mmHg als obere Grenze des Normalen angesehen, Werte darüber sind verdächtig. Bei einigen Patienten können aber bereits bei einem Druck unter 21 mmHg Glaukomschäden beobachtet werden (Normaldruckglaukom), während andere Patienten unbeschadet Werte bis 30 mmHg tolerieren (okuläre Hypertension). Obwohl der aktuelle Augeninnendruck - Level für die Entwicklung von Glaukomschäden wichtig ist, spielen auch noch andere Faktoren eine Rolle. Der intraokuläre Druck-Level (IOD-Level) wird vererbt, sodass bei Verwandten ersten Grades von Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom höhere Augeninnendruckwerte gemessen werden (Kansky & Menon, 2003).

Der normale Augeninnendruck ändert sich im Tagesverlauf, mit dem Herzschlag, dem Blutdruck und der Atmung. Das Muster der Tagesdruckkurven ist variabel, er tendiert dazu, am Morgen höher zu sein als am Nachmittag oder am Abend. Normale Augen haben durchschnittliche Tagesdruckschwankungen von 5 mmHg. Augen mit okulärer Hypertension oder Glaukom haben höhere Fluktuationen (Kansky & Menon, 2003).

Objektive Befunde beim Glaukom sind die Drucksteigerung, die man um so höher und um so regelmäßiger findet je weiter die Krankheit fortgeschritten ist, ferner verstärkte Tagesschwankungen von mehr als 5 mmHg und Gesichtsfeldausfälle mit Pupillenveränderungen. In Spätfällen wird die Pupille randständig exkaviert und atrophisch. Bleibt die Drucksteigerung lange bestehen, so werden die Gesichtsfeldausfälle größer, Exkavation und Atrophie der Pupille nehmen zu, bis schließlich die Erblindung eintritt (Axenfeld & Pau, 1992).

3.2. Physiologie der Kammerwasser-Zirkulation

Das Kammerwasser wird von den Ziliarkörperfortsätzen durch einen kombinierten Prozess aus Ultrafiltration und aktiver Sekretion in einer Größenordnung von 2-4 μ l/Minute in die hintere Augenkammer sezerniert, fließt durch die Pupille von der hinteren in die vordere Augenkammer, verlässt das Auge über einen Ringkanal, den sog. Schlemm-Kanal und gewinnt über intrasklerale Sammelkanäle Anschluss an das episklerale Venensystem. Auf diese Weise wird der Kammerinhalt alle 1-2 Stunden erneuert. Wenn sich Produktion und Abfluss die Waage halten, bleibt der IOD, von geringen Tagesschwankungen abgesehen, konstant.

Neben der Aufrechterhaltung des physiologischen Drucks besteht die Funktion des Kammerwassers aber auch in der Ernährung avaskulären Gewebes, vor allem der Hornhaut, der Linse und des Trabekelwerks, mit denen es einen Stoffaustausch unterhält.

Die Regulation des Kammerwasser-Abflusses erfolgt in der Hauptsache durch den Ziliarmuskel, der über sehnenartige Strukturen mit den Trabekelbalken in Verbindung steht und bei Kontraktion das gesamte Trabekelwerk einschließlich des juxtakanalikulären Gewebes aufweitet, aber auch durch eine Eigenkontraktilität der

Trabekelzellen, die funktionell antagonistisch zum Ziliarmuskel wirkt.

Die bei Glaukompatienten auftretenden Drucksteigerungen werden normalerweise nicht durch eine gesteigerte Kammerwasser-Produktionsrate verursacht, sondern fast immer durch eine Abflussbehinderung im Bereich des Trabekelwerks. Je nach Ätiologie der zugrundeliegenden Glaukomform kann die Abflussbehinderung die unterschiedlichsten Ursachen haben (Schlötzer, 2003).

3.3. Klassifizierung der Glaukome

Man teilt die Glaukome gewöhnlich in primäre und sekundäre Glaukome ein. Unter einem primären Glaukom versteht man ein Glaukom, das nicht in Folge einer anderen Augenerkrankung entstand. Unter sekundär versteht man ein Glaukom, das infolge einer anderen Augenkrankheit oder als unerwünschte Nebenwirkung von Heilmaßnahmen oder Medikamenten auftritt. In der Praxis ist die Trennung zwischen primärem (anlagebedingtem Glaukom) und sekundärem (durch eine andere Augenkrankheit bedingtem) Glaukom nicht immer eindeutig möglich, denn auch bei sekundären Glaukomen findet man oft eine Anlage zur Glaukomentwicklung, die sich in der gleichzeitigen oder späteren Glaukomerkrankung des zweiten Auges zeigt.

Das Glaukom des Säuglings oder Kleinkindes nennt man Hydrophthalmie (Buphthalmus). Hierbei vergrößert sich das Auge sich infolge der Innendrucksteigerung. Dieses Glaukom entsteht meist durch eine ungenügende Differenzierung der Gewebe des Kammerwinkels und seltener durch prä- oder postnatale Fehlentwicklungen (retrolentale Fibroplasie, Aniridie) oder durch Entzündungen. Somit kann es zu den primären, anlagebedingten wie zu den sekundären Glaukomen gehören.

Bei dem primären Glaukom des Erwachsenen unterscheidet man folgende Formen:

1. Glaucoma chronicum simplex (primäres Offenwinkelglaukom). Der Kammerwinkel ist stets offen, auch bei der Druckspitze. Bei weitem Kammerwinkel ist die Vorderkammer meist tief. Der Verlauf ist schleichend. Frühsymptome fehlen oft. Daraus ergibt sich die Gefahr, dass der Patient erst im Spätstadium zum Arzt kommt. Der Druck liegt im Allgemeinen zwischen 25 und 40 mmHg.

2. Akuter Glaukomanfall (akutes Winkelblockglaukom). Der Kammerwinkel ist während des Anfalles verlegt, im Intervall zwischen den Anfällen eng, aber offen. Die Vorderkammer ist auch zwischen den Anfällen flach. Die Symptome sind akut und heftig: Schmerzen und/oder Sehverschlechterung sind die Folge. Im Anfall ist das Auge tastbar hart und der Druck auf 60-80 mmHg oder mehr gesteigert.
3. Chronisches Winkelblockglaukom. Auch hierbei ist der Kammerwinkel im Anfall verlegt, zwischen den Anfällen jedoch nur teilweise durch Synechien blockiert. Auch in der Zeit zwischen den Anfällen ist der Druck erhöht, jedoch nicht so stark wie beim akuten Glaukom. Die subjektiven Symptome entsprechen denen des akuten Anfalles, sind aber weniger heftig. Diese Glaukomform entsteht nach wiederholtem Winkelblock oder nach Iridozyklitis.
4. Mischform. Bei Glaucoma simplex mit engem Kammerwinkel kann eine Mischform aus (1) und (2) auftreten.
5. Glaukom ohne Hochdruck. Hierbei wird die statistische Normgrenze von 21 mmHg nicht überschritten. Ursachen des Sehnervenschadens können Arteriosklerose, niedriger Blutdruck und Herzleistungsschwäche sowie Anstieg des IOD innerhalb der statistischen Normgrenzen oder ein starker Druckanstieg im Liegen (nachts) sein.

Das absolute Glaukom ist keine eigene Krankheitsform, sondern dies bedeutet die Erblindung infolge eines Glaukoms. Die Ursache dieses Endzustandes kann jede Glaukomform gewesen sein (Axenfeld & Pau, 1992).

3.4. Folgen okulärer Hypertension: „Glaukomschäden“

Die Konsequenzen des chronischen Druckanstiegs, die „Glaukomschäden“, manifestieren sich vor allem am Sehnervenkopf, der Papille. Durch diese *Papilla nervi optici* verlassen die Axone der retinalen RGZ das Auge, um retrobulbär den *Nervus opticus* zu bilden. Diese Austrittsstelle der Sehnervenfasern durch einen fenestrierten Anteil der *Sklera*, die *Lamina cribrosa*, ist der anfällige Engpass und strukturelle Schwachpunkt des visuellen Systems, da hier die Axone auf kleinstem Querschnitt gebündelt werden und einen Druckgradienten überwinden müssen.

Der progressive Axonverlust ist histopathologisch auch an einer *Optikus*-Atrophie erkennbar, wobei der Verlust neuronalen Gewebes durch eine reaktive Proliferation von Gliazellen ersetzt wird. Diese *Optikus*-Atrophie geht mit dem Untergang von RGZ einher.

Dabei ist im Moment noch nicht geklärt, ob der Untergang primär im Zellkörper, in der Netzhaut oder im Axon in der Papille beginnt und welcher Pathomechanismus jeweils vorliegt.

Im wesentlichen stehen sich zwei Theorien gegenüber: Laut der mechanischen Theorie führt der erhöhte Druck zu einer direkten Schädigung der Axone durch mechanische Kompression im Bereich der *Lamina cribrosa*, während die vaskuläre Theorie eine Störung der Mikrozirkulation in der Papille und damit ein nutritives Defizit verantwortlich macht.

Als Mechanismus der Axonschädigung wird eine Blockade des axoplasmatischen Flusses, d.h. des Stofftransports entlang der Axone auf Höhe der *Lamina cribrosa* diskutiert. Als Mechanismus des Ganglienzelluntergangs ist das Konzept der Exzitotoxizität gegenwärtig sehr aktuell. Dieses Konzept besagt, dass neuronale Noxen, wie z.B. Ischämie, eine exzessive Freisetzung von Neurotransmittern wie z.B. Glutamat, hervorrufen. Infolgedessen kommt es zu einer ungehemmten Exzitation von Nervenzellen durch Glutamatrezeptoren und damit zu einem massiven Calcium-Einstrom in das Zellinnere, was zum Nervenzelluntergang führt.

Dieses Konzept gilt inzwischen als grundlegender Pathomechanismus des cerebralen Nervenzelluntergangs, wie z.B. nach einem Schlaganfall, muss aber für die Glaukompathogenese erst noch bewiesen werden (Schlötzer, 2003).

3.5. Das Glaukom am Tiermodell der Ratte

Ein erhöhter IOD wird als Hauptfaktor für die Einleitung und das Fortschreiten der glaukomatösen optischen Neuropathie angesehen (Leske, 1983). Daher war die Entwicklung von Tiermodellen mit chirurgisch induziertem, chronisch erhöhtem IOD ein wichtiges Ziel, um die Krankheit zu erforschen. Ein solches Tiermodell würde unser

Verständnis der zellulären Geschehnisse, die zum ganglionären Zelltod führen, sehr erleichtern, sowie den Einfluss vom IOD und anderen Risikofaktoren des Glaukoms.

Aufgrund der geringen Größe von Mäuseaugen, wurden bislang alle induzierten Modelle mit erhöhtem IOD bei der Ratte entwickelt. Das Interesse, ein solches Modell an Ratten zu erstellen, basiert auf mehreren Gesichtspunkten: Ratten sind relativ preiswert und leicht zu erwerben, der Sehnervenkopf der Ratte hat mehrere anatomische Ähnlichkeiten mit dem der Primaten und es existiert eine Vielzahl an Literatur über die verschiedenen zellbiologischen Ursachen des Sehnervenkopfschadens bei der Ratte (Moore et al., 1995, Goldblum & Mittag, 2002). Solch ein ideales Tiermodell des Glaukoms sollte zusätzlich noch eine vernünftig lange Dauer der Pathologie aufweisen, um diejenige im menschlichen Auge nachahmen zu können (Gelatt, 1977).

Verschiedene Methoden wurden ausprobiert, um einen erhöhten IOD im Rattenauge mit dem Ziel zu induzieren, den Abfluss vom Kammerwasser zu unterbrechen. Die gängigste Methode ist die Kauterisation von zwei bis drei episkleralen / limbalen Venen (Mittag et al., 2000; Shareef et al., 1995; Garcia-Valenzuela et al., 1995) oder die Injektion von hypertrophischer Lösung in die Venen, die das limbale Kammerwasser aufnehmen (Moore, Milne & Morrison, 1993; Morrison et al., 1997; Johnson et al., 1996). Andere Methoden benutzen trabekuläre Laser-Photokoagulation nach Injektion von Schwarztusche in die Vorderkammer (Udea et al., 1998) oder Injektion von S-Antigen (Mermoud, Baerveldt, Mickler, Wu & Rao, 1994). Jedes der genannten Ratten-Glaukom-Modelle hat Vor- und Nachteile, die vom Niveau und der Dauer seiner IOD-Erhöhung abhängen.

3.6. Die Royal College of Surgeons-Glaukom-Ratte (rcsGL-Ratte)

Die Royal College of Surgeons-Glaukom-Ratte (rcsGL-Ratte) ist eine genetisch mutierte Royal College of Surgeons-Ratte (rcs-Ratte) mit angeborenem Glaukom (Buphthalmus). In dieser neu aufgetretenen Spontanmutation sind beide Augen vom Buphthalmus betroffen. Die Ursache des erhöhten IOD ist eine erhöhte Produktion von Kammerwasser, die durch mehrere Ziliarkörperanlagen hervorgerufen wird (s. Abb. 4).

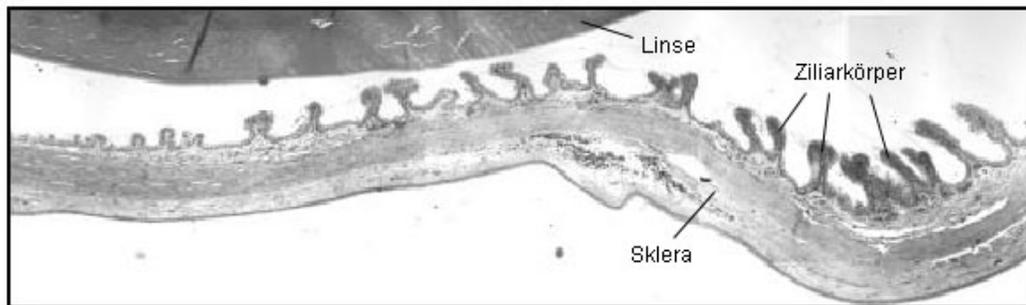


Abb. 4: Histologischer Schnitt durch das Auge der rcsGL-Ratte: multiple Ziliarkörperanlagen.

Die Augen vergrößern sich durch den dauerhaft erhöhten IOD (s. Abb. 5). Es stellen sich Gewebeveränderungen ein, die sich als Apoptosis oder Veränderungen der Zellmorphologie manifestieren.



Abb. 5: Makroskopische morphologische Veränderungen am Auge der rcsGL-Ratten als Folge des erhöhten IOD.

Die in unserer Zucht erstmalig aufgetretene Mutation stellt ein wichtiges Modell auf dem Wege der Testung moderner diagnostischer Erfassungstechniken und eventueller Therapien dar. Aus dem erwarteten Ergebnis dieser Arbeit erhoffen wir uns ein detailliertes Wissen zum zellulären Mechanismus der glaukomatösen Schädigung. Insbesondere wird dieses Wissen dem kindlichen, hereditären Glaukom des Menschen zugute kommen, eine Glaukomform, für die es ungenügende therapeutische Ansätze gibt.

Da RGZ die primär betroffenen Neurone beim Glaukom sind, erwarten wir, dass auch bei diesen Rattenmutanten typische Veränderungen im intraretinalen Teil der Ganglienzelle auftreten. Krankheitsbedingte Veränderungen könnten sich demzufolge sowohl im Axon als auch im Zellkörper und nicht zuletzt in fein ramifizierten Dendriten manifestieren. In dieser Arbeit wurden deshalb die Ganglienzellen bei erhöhtem Augeninnendruck untersucht, um krankheitsbedingte Zellveränderungen zu erfassen und den zellulären Mechanismus der glaukomatösen Schädigung zu verstehen. Um die Effekte des IOD zu erfassen, wurden die Dendriten von RGZ mittels neuroanatomischer Färbung dargestellt und morphometrisch analysiert. Darüber hinaus wurde der retrograde Transport des Fluoreszenzfarbstoffes DiI entlang der Axone der RGZ untersucht.

B. Material / Methoden / Techniken

1. Versuchstiere

Für diese Studie wurden zehn Ratten des rcsGL - Stammes verwendet. Als Kontrollgruppe wurden acht Ratten des rcs-Stammes und drei Ratten des Sprague-Dawley-Stammes (SD) verwendet. Die sechs Wochen bis 21 Monate alten Tiere beiderlei Geschlechts stammten aus eigener Zucht des Instituts für Experimentelle Ophthalmologie in Münster. Die Tiere wurden paarweise oder zu dritt in Zuchtbehältern bei 18°C bis 20°C Raumtemperatur unter natürlichem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Als Nahrung diente eine ad libitum Diät aus Standard-Alleinfutter und Leitungswasser.

2. Augeninnendruck

2.1. Verwendete Geräte und Lösungen

- Tono-Pen XL (Mentor, Norwell, MA, USA)
- 0.5% Proparacaine-Lösung (URSA-Pharm, Saarbrücken)

2.2. IOD-Messung

Die Tonometrie dient der Messung des Augeninnendruckes. Der Augeninnendruck kann von außen durch Messung der Korneaeindellung bestimmt werden, die ein Senkstift von definiertem Durchmesser und Gewicht bewirkt (Impressionstonometrie), oder durch Messung der Kraft, die notwendig ist, die Kornea über einen kleinen Bereich abzuflachen (Applanationstonometrie).

Für die Durchführung der IOD-Messung wurden die Ratten unter eine leichte Äthernarkose gesetzt, da bewiesen wurde, dass Anästhetika eine Erniedrigung des IOD bei Ratten bewirken (Krupin et al., 1980; Mirakhur et al., 1990). Die Augen wurden

zusätzlich mit einem Tropfen einer topischen 0.5% Proparacain-Lösung betäubt. Alle Messungen wurden mit Hilfe des Tono-Pen XL zwischen 9:00 und 12:00 Uhr durchgeführt. An jedem Auge wurden 10 Tonometer-Messungen sofort vom Bildschirm des Instrumentes entnommen, aufgezeichnet und deren Mittelwert errechnet. „Off“-Messungen und Instrument-vermittelte Mittelwerte wurden ignoriert. Tiere, deren IOD wieder zu einem normalen Wert sank, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

3. Die Retina

3.1. Verwendete Geräte und Lösungen

- Begasungsglocke (Gaszufuhr von CO₂)
- Präparationsbesteck (feine Pinzetten, Schere, gebogene Mikroschere, Skalpell)
- Becherglas, steril 500/250 ml
- Spülkanüle
- Petrischalen
- Nitrozellulose Filter (C-N-Filter, Sartorius, Göttingen, Porengröße 0,65 µm)
- Stereomikroskop (Zeiss) mit Kaltlichtlampe
- PBS 0,1 M; pH 7.4
- 4% Paraformaldehyd in 0,1 M PBS

3.2. Präparation der Retina

Jedes Tier wurde durch eine letale Dosis von CO₂ in einer Begasungsglocke getötet. Anschließend wurden beide Augen aus der Orbita entfernt. Mit einer gebogenen Mikroschere wurde durch einen Kreisschnitt möglichst entlang der *Ora serrata* die vordere Augenhälfte entfernt. Damit blieb in der hinteren Hälfte die *Retina* in ihrer gesamten Ausdehnung weitgehend erhalten. Unter dem Stereomikroskop erfolgte die Ablösung der *Retina* von den darunter liegenden Schichten (*Choroidea und Sklera*). Die isolierte *Retina* wurde an 4 Stellen im peripheren Bereich radiär Mitte der *Papilla Nervi*

Optici hin eingeschnitten, so dass sie ohne Faltenbildung flach ausgebreitet werden konnte (Mey & Thanos, 1993). Danach wurde sie auf einem Nitrozellulose-Filter mit der Ganglienzellschicht nach oben aufgezogen (s. Abb. 6).

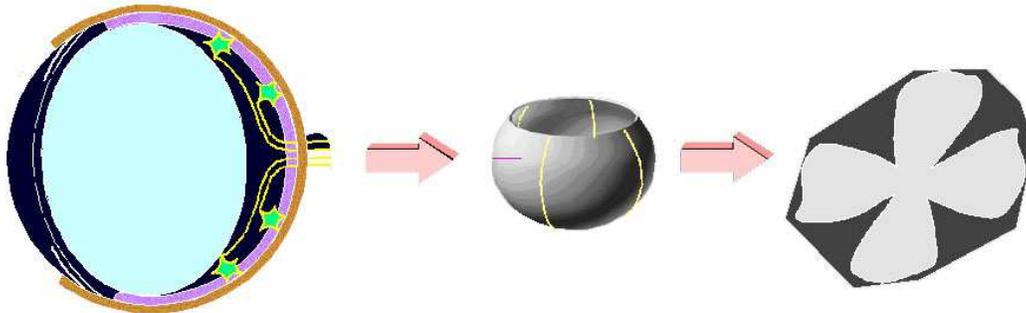


Abb. 6: Schematische Darstellung der Präparation der *Retina*.

Unter Zuhilfenahme eines Mikroskops wurde der Glaskörper mit einer feinen Pinzette entfernt und die *Retina* von noch anhaltenden Verschmutzungen befreit.

Die *Retina* wurde zum Fixieren auf dem Nitrozellulose-Filter in 4% Paraformaldehyd in 0.1 M PBS-Lösung (pH 7.4) enthaltenden Petrischalen im Kühlschrank aufbewahrt.

Da die *Retina* der rcsGL-Ratte durch den dauerhaft erhöhten Druck atrophiert, reißt sie bei der leichtesten Manipulation. Aus diesem Grund erfolgte die Ablösung der rcsGL-Ratten *Retina* von der darunter liegenden Schicht nicht sofort nach der Entnahme des Auges. Die gesamte hintere Augenhälfte wurde an 4 Stellen eingeschnitten, flach auf einem Nitrozellulose-Filter ausgebreitet, fixiert und gefärbt (s. 4.2.). Erst unmittelbar vor dem Mikroskopieren wurde die durch die Fixierung gehärtete *Retina* von den darunter liegenden Schichten getrennt (s. 5.2.).

Für die quantitative Analyse ist die Frage der Schrumpfung von Bedeutung. Laut Literatur (Fukuda, 1977; Tiwo & Blakemore, 1976; Schober & Gruschka, 1977) ist bei guter Haftung der *Retina* auf dem Objektträger die Schrumpfung gering (in der Länge weniger als 5%, in der Fläche etwa 10%). Wenn die Schnitte nicht am Objektträger haften oder flottierend behandelt werden, kann die Schrumpfung 20% (linear) erreichen. Bei gleichem Fixierungsmittel haben auch die Art der Fixierung (Immersion oder Perfusion) sowie die Dauer der Nachfixierung einen Einfluss auf die Schrumpfung und erschweren oft den Vergleich der eigenen Befunde mit den Daten aus der Literatur. Aus

diesem Grund wurde bei dieser Arbeit, so wie auch in anderen Studien, die Schrumpfung nicht berücksichtigt und keine Korrektur der Werte vorgenommen.

4. Histologie

4.1. Verwendete Geräte, Lösungen und Fluoreszenzfarbstoff

- Präparationsbesteck (feine Pinzetten, Skalpell)
- Glas-Objektträger
- Deckgläser
- Becherglas, steril 500/250 ml
- Spülkanüle
- Petrischalen
- Parafilm
- Silberpapier
- Stereomikroskop (Zeiss) mit Kaltlichtlampe
- PBS 0.1 M; pH 7.4
- DiI ([1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Molecular Probes, D282)

4.2. Retrograde Färbung der RGZ in vitro

Fluoreszenzfarbstoffe sind wahrscheinlich die am meisten benutzten neuroanatomischen Marker. Der Fluoreszenzfarbstoff DiI ([1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) ist hochgradig lipophil. Aus diesem Grund kann er durch Membranen, sogar in fixiertem Zustand, diffundieren. DiI erscheint gelb und hat seine maximale Fluoreszenz-Emission bei 565 nm. Verschiedene Carbozyanin-Fluoreszenzfarbstoffe wurden im visuellen System der Säugetiere verglichen (Köbber

et al., 2000). Bei retrogradem Färben vom Oberen *Colliculus* und Sehnerven der Ratte aus, wurden die feinsten Markierungen der Dendriten mit DiI erreicht.

Obwohl die Geschwindigkeit der Färbung extrem schwer zu ermitteln ist, werden Schätzungen von 100 bis 400 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ angenommen. Am Beispiel des visuellen Systems sind zwei Wochen ausreichend, um Axone von über 5 mm, und sechs Wochen, um Axone von über 12 mm Länge zu markieren, welche die gesamte Länge der retinotektalen Projektion ist (Köbber et al., 2000).

Die faltenfrei auf dem Nitrozellulose-Filter gelegte, in 4% Paraformaldehyd in 0,1 M PBS fixierte *Retina* wurde aus der Petrischale entnommen, auf ein Objektträger gelegt, und mittels Stereomikroskop vom Sehnervstumpf aus gefärbt. Einige Kristalle DiI wurden dabei vorsichtig mittels eines spitzen Skalpells kranzförmig um den Sehnervstumpf gelegt und in das retinale Gewebe eingedrückt. Anschließend wurde die *Retina* wieder in die Petrischale gelegt und die Petrischale mit Parafilm versiegelt, um die Verdunstung der Fixierlösung zu vermeiden. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluoreszenzfarbstoff DiI, der bei Lichtexposition bleicht, wurden die gefärbten *Retinae* in größere, mit Silberpapier verdichtete Petrischalen aufbewahrt. Um die vollständige Färbung der RGZ zu erreichen, wurden die gefärbten *Retinae* bei Raumtemperatur vier bis sechs Wochen aufbewahrt.

Nach seiner Applikation auf den Sehnerv wurde der Farbstoff von den Axonen der RGZ aufgenommen und diffundierte intraaxonal in retrograder Richtung. In Folge füllte der Farbstoff die Somata und Dendriten der RGZ, hob sie vollständig hervor und erlaubte dadurch qualitative und quantitative Untersuchungen der *Retina*. Mittels dieser Technik wurden die Morphologie, die Ausmaße und die Verastungsschemen der RGZ untersucht.

5. Fluoreszenzmikroskopie

5.1. Verwendete Geräte und Lösungen

- Präparationsbesteck (feine Pinzetten, Skalpell)
- Glas-Objektträger

- Deckgläser
- Mowiol (Hoechst)
- Stereomikroskop (Zeiss) mit Kaltlichtlampe
- Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop: „Axiophot“ (Zeiss, Oberkochen)
- Fluoreszenzfilter 510-560 (Zeiss, Oberkochen)
- Objektive: Neofluar 5x, 10x, 20x
- Okulare: Zeiss-Axiophot 20x
- Kamera (Zeiss, Oberkochen) in Axiophot integriert
- Belichtungsautomat Axiophot: keine Angaben
- Computergestützte Bildanalysesysteme: „DISCUS“, „KS300 3.0“ (Zeiss), „Axiovision 3.1“ (Zeiss)
- Graphikprogramm: „Micrografx Designer“ vers. 6.0 (Micrografx TM)
- Statistikprogramm: „Microsoft Excel 2000“ (Microsoft)
- Statistikprogramm: „SPSS 12.0 for windows“ (SPSS Inc.)

5.2. Vermessung der Ganglienzellen

Nach erfolgter retrograder Färbung der RGZ (unmittelbar vor der Auswertung der *Retina* unter dem Fluoreszenzmikroskop) wurde die *Retina* aus der Petrischale entnommen und unter dem Stereomikroskop mittels eines gerundeten Skalpells entlang den Einschnitten, die bei der Präparation erfolgten, in vier Gewebestücke geteilt.

Die *Retina* der rcsGL-Ratte, die noch an den darunter liegenden Schichten haftete, wurde zu diesem Zeitpunkt unter dem Stereomikroskop mittels eines Skalpells von der *Choroidea* und *Sklera* abgelöst.

Die vier Gewebestücke wurden mit der Ganglienzellschicht nach oben auf einem Objektträger flach aufgelegt, in ein paar Tropfen Mowiol eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt. Anschließend wurde die *Retina* bei 400-facher Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Exzitations-Filter von 515 nm und einem Fluoreszenz-Emissionsfilter von 590 nm, welcher optimal für den Fluoreszenzfarbstoff DiI ist, untersucht.

Die Daten wurden aus zufällig verteilten RGZ über die gesamte *Retina* (ohne Beachtung

ihrer Distanz zum Sehnerv) ermittelt. Dies erfolgte unter Berücksichtigung vorhandener Literatur, die bei der Ratte über leichte Unterschiede in den Ausmaßen der Zellkörper und Dendriten von RGZ vom gleichen Typ und von unterschiedlicher Exzentrizität berichtet (Dreher et al., 1985).

Die markierten RGZ wurden mit dem 20x Objektiv in zwei oder mehr Fokussierebenen photographiert (Zellkörper in der GCL und Dendriten in der IPL, s. Abb. 2), gespeichert und später mit dem Bildanalyzesystem KS300 3.0 (Zeiss) vermessen. Abb. 7 verdeutlicht die Art und Weise, wie die Zellen vermessen wurden.

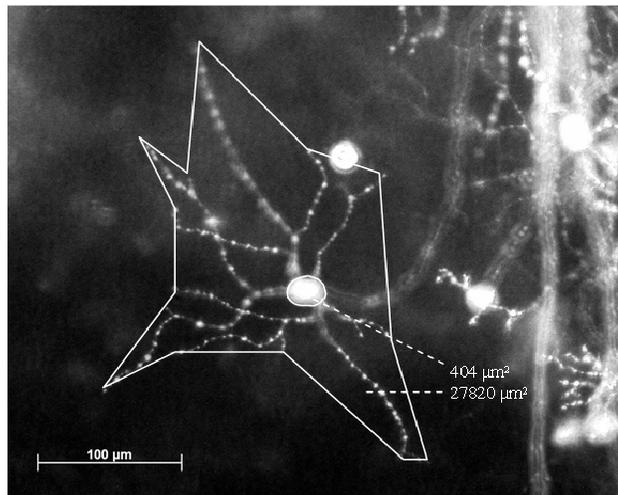


Abb. 7: Vermessung von Soma und Dendritenfeldfläche einer Typ II Ganglienzelle.

Aus dem Pool der photographierten RGZ wurden diejenigen ausgeschlossen, die über sich überlagernden Dendritenfelder oder unvollständig gefüllten Dendriten verfügen.

Alle photographierten RGZ wurden in verschiedene Gruppen von Zelltypen sortiert. Die morphologischen Eigenschaften der RGZ, die in dieser Arbeit benutzt wurden, sind diejenigen, die von Boycott und Wässle (1974) für Katzen und von Perry (1979) für die Rattenretina berichtet worden sind. Sie beinhalten morphologische und quantitative Aspekte der Zellkörper, die Zahl und das Bifurkationsschema der primären Dendriten und das Verastungsschema der Dendritenbäume. Diese Kriterien sind effektiv in der Klassifizierung der retrograd gefärbten RGZ-Population. Basierend auf der Größe und Morphologie von Zellkörper und Dendriten und nach sorgfältigem Vergleich mit

Beispielen aus der Literatur, werden die RGZ wie folgt als Typ I-, Typ II- und Typ III-Zellen bezeichnet.

Es wurden demnach drei spezifische RGZ-Typen klassifiziert: Zellen mit großen Somata und Dendritenfeldflächen (Typ I), Zellen mit kleinen Somata und Dendritenfeldflächen (Typ II) und Zellen mit kleinen Somata und großen Dendritenfeldflächen (Typ III).

Die Analyse der Ergebnisse wurde mittels des Statistikprogramms SPSS 12.0 durchgeführt. Es wurde ein One Way Anova und ein Bonferroni Test benutzt um die Signifikanz der Ergebnisse festzustellen (durch * markiert).

C. Ergebnisse

1. Augenninnendruck

Der IOD in den Augen von normalen, nicht an Glaukom erkrankten Ratten, beträgt zwischen 11 und 14 mmHg und durchschnittlich etwa 13 mmHg. Es bestehen bloß unwesentliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Rattenstämme (Ahmed, Chaudhary & Sharma, 2001; Laquis, Chaudhary & Sharma, 1998).

Die rcsGL-Ratten, die für diese Studie verwendet wurden, hatten während der gesamten Dauer des Experimentes einen erhöhten IOD. Um ein Glaukomaug bei der Ratte zu definieren, wurde eine untere Grenze von 16 mmHg IOD festgelegt.

Alle untersuchten rcsGL-Ratten zeigten bilateral pathologische IOD-Werte, die höher als 16 mmHg waren. Der durchschnittliche IOD, der bei den rcsGL-Ratten mit Hilfe des Tono-Pen XL gemessen wurde, betrug 24.4 mmHg (1.9-fach höher als der normale IOD bei Ratten). Er variierte je nach Alter der Ratte (s. Abb. 7) zwischen 16 und 32 mmHg (1.2 bis 2.5-fach höher als der normale IOD bei Ratten).

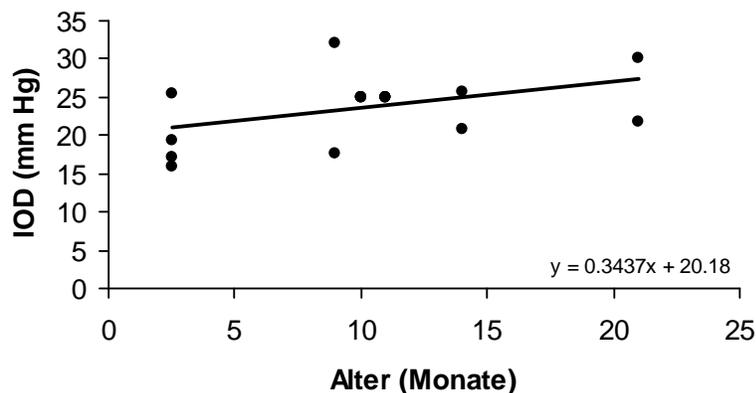


Abbildung 8: Gemessene IOD-Werte bei rcsGL-Ratten ($n^{\circ}=9$) verschiedenen Alters.

In anderen Studien, in denen eine Kauterisation von zwei bis drei Episkleralvenen durchgeführt wurde, um ein Glaukommodell bei der Ratte zu bilden, lagen die IOD-Werte um 1.5 bis beinahe 2 Mal höher als der normale durchschnittliche IOD (Ahmed, Chaudhary & Sharma, 2001; Mittag et al., 2000; Laquis, Chaudhary & Sharma, 1998).

2. Verteilung der RGZ

Die Typ I-Zellen stellten bei den SD-Ratten 18.5%, bei den rcs-Ratten 13.7% und bei den rcsGL-Ratten 7% des Zellpools dar (s. Abb. 9).

Die Mehrheit der retrograd gefärbten RGZ wurde als Typ II-Zellen identifiziert. Bei den SD-Ratten repräsentierten die Typ II-Zellen 77.8%, bei den rcs-Ratten 76.6% aller RGZ. Bei den rcsGL-Ratten war der Anteil der Typ II-Zellen mit 89.6% wesentlich höher (s. Abb. 9).

Die Typ III-Zellen bildeten in dieser Studie die kleinste Gruppe von RGZ. Bei den SD-Ratten stellten sie 3.7%, bei den rcs-Ratten 9.7%, bei den rcsGL-Ratten 3.5% aller Zellen dar (s. Abb. 9).

Die oben beschriebene Zusammensetzung entspricht grob der Verteilung von RGZ in der Rattenretina (Dreher et al., 1985; Thanos, 1988).

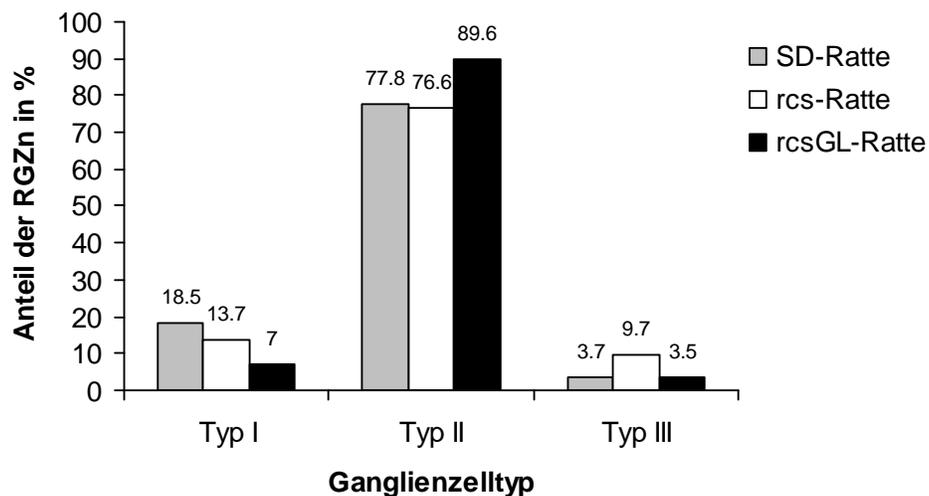


Abbildung 9: Verteilung der retrograd gefärbten RGZ der drei Rattenstämme je nach Zelltyp in %. Die Stichprobe der RGZ betrug bei den SD-Ratten: Typ I-Zellen $n^{\circ}=10$, Typ II-Zellen $n^{\circ}=42$, Typ III-Zellen $n^{\circ}=2$; bei den rcs-Ratten: Typ I-Zellen $n^{\circ}=24$, Typ II-Zellen $n^{\circ}=134$, Typ III-Zellen $n^{\circ}=17$; bei den rcsGL-Ratten: Typ I-Zellen $n^{\circ}=8$, Typ II-Zellen $n^{\circ}=103$, Typ III-Zellen $n^{\circ}=4$.

3. Größe und Morphologie der RGZ vom Typ I, II und III

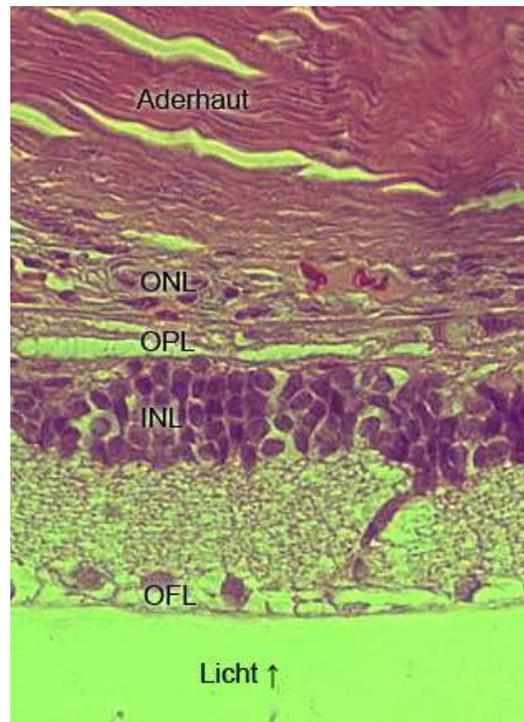


Abbildung 9: Lichtmikroskopische Abbildung eines vertikalen Schnittes durch die *Retina* der rcsGL-Ratte (Abkürzungen in der Beschriftung: siehe S. 48).

Die Durchschnittswerte der Soma- und Dendritenfeldflächen sowie die Verzweigungshäufigkeiten der Dendritenbäume wurden an Zellen aus den Feldern der mittleren und peripheren *Retina*, die eine niedrige Zelldichte aufweist, gemessen. Nach retrograder Färbung der RGZ mit DiI wurden diese Messungen bei allen drei Rattenstämmen durchgeführt.

In den meisten Fällen konnten stark gefärbte Axone beobachtet werden und Stellen, die eine niedrigere Zelldichte aufwiesen, ließen deutliche Dendritenbäume erkennen.

Die Abbildungen 11 bis 14 zeigen die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI retrograd gefärbten RGZ der mittleren und peripheren *Retina*. Es gab einen deutlichen Unterschied in der Zelldichte zwischen der zentralen, mittleren und peripheren *Retina*. Die höchsten Dichten wurden in der zentralen *Retina* und die niedrigsten in der

peripheren *Retina* gefunden. Aus diesem Grund wurden die RGZ aus der mittleren und peripheren *Retina* fotografiert, da sie sich einigermaßen überlagerungsfrei darstellten und damit präziser zu vermessen waren.

Die Fläche der retrograd gefärbten Somata und Dendritenfeldflächen der RGZ variierte nicht nur je nach Zelltyp und Rattenstamm, sondern auch zwischen Zellen desselben Typs eines Rattenstammes. Diese Vielfalt der Zelldimensionen und Morphologien zeigte sich bei allen drei Rattenstämmen, was die hohe Standardabweichung erklärt. Die größte Vielfalt an Zellmorphologien und Größen zeigte sich bei den RGZ vom Typ II (s. Abb. 11).

Die retrograd gefärbten Typ I-Zellen (Perry, 1979) zeigten große Somata und große Dendritenfelder (s. Abb. 12, 15 und 16). Die Typ I-Zellen waren gleichmäßig auf der gesamten *Retina* verteilt und änderten nicht wesentlich in Größe mit zunehmender retinaler Exzentrizität. Die Dendriten der Typ I-Zellen waren eher glatt und ihre Axone relativ dick.

Die Gruppe der Typ II-Zellen (Fukuda 1977; Perry 1979; Dreher et al. 1985) war in dieser Studie am häufigsten repräsentiert. Typ II-Zellen besaßen kleine bis mittelgroße Somata und kleine bis mittelgroße Dendritenfelder (s. Abb. 13, 15 und 16). Die Eigenschaft des Dendritenbaumes, sich „buschig“ zu verzweigen, ließ in den meisten Fällen eine einfache Erkennung dieser Zellen zu. Für Beispiele dieser Zellen siehe Abb. 11 und 13. Die primären Dendriten waren dünn und verzweigten sich nahe dem Zellkörpers. Die kurzen gewundenen Äste erschienen oft perlschnurförmig.

Die vollständig retrograd gefüllten RGZ vom Typ III, identifiziert gemäß den zur Verfügung stehenden morphologischen Kriterien (Fukuda 1977; Perry 1979; Perry and Walker, 1981; Dreher et al. 1985) schienen die folgenden Eigenschaften zu besitzen: kleine bis mittelgroße Somata und breite Dendritenfelder, im Durchmesser jedoch schmal, sie ziehen sich in die Länge und weisen daher eine relativ geringe Dendritenfeldfläche auf (s. Abb. 14, 15 und 16).

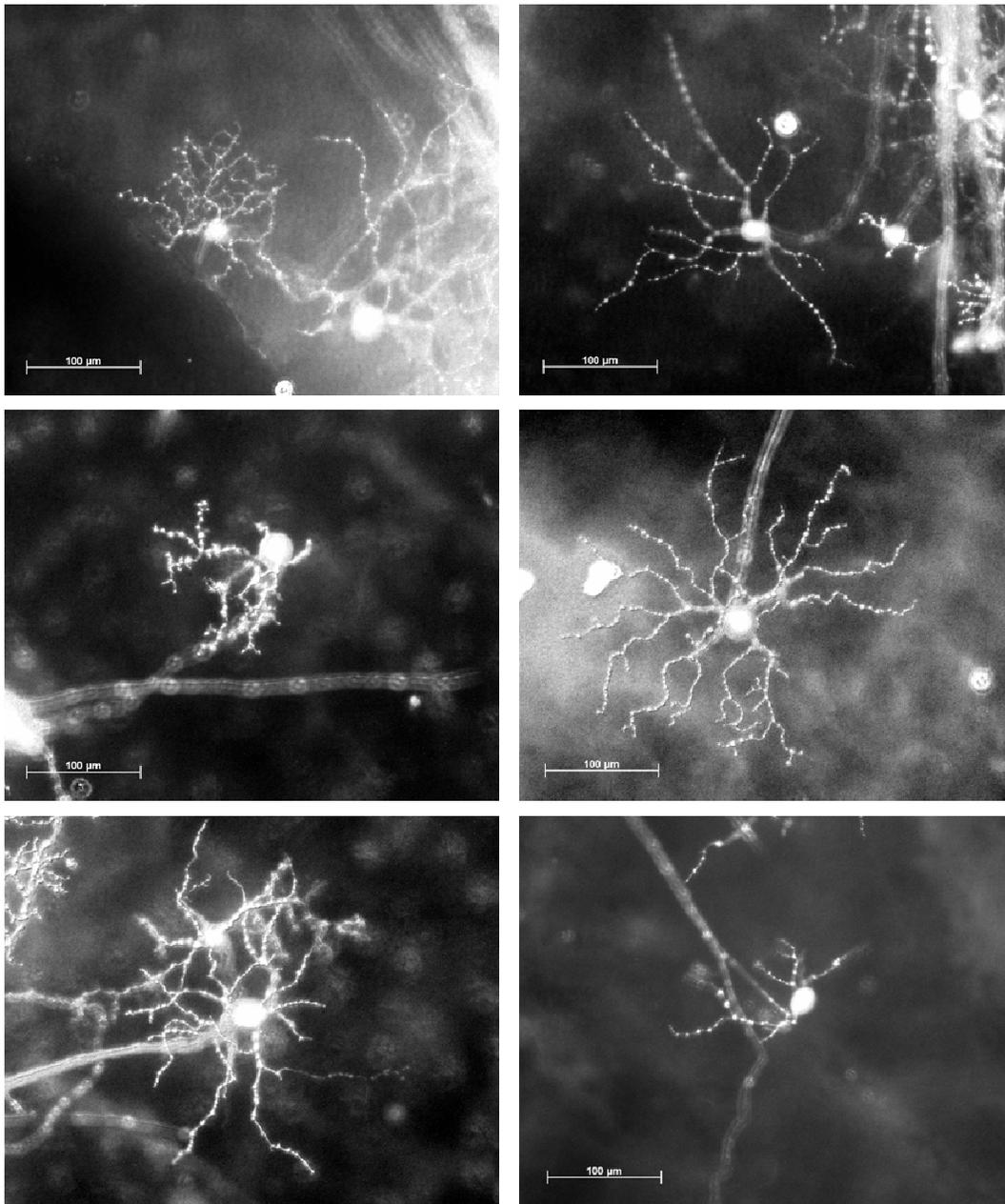


Abbildung 11: Verdeutlichung der Vielfalt von Morphologien und Dimensionen der RGZ vom Typ II anhand von 6 verschiedenen Typ II-Ganglienzellen vom rcs-Rattenstamm.

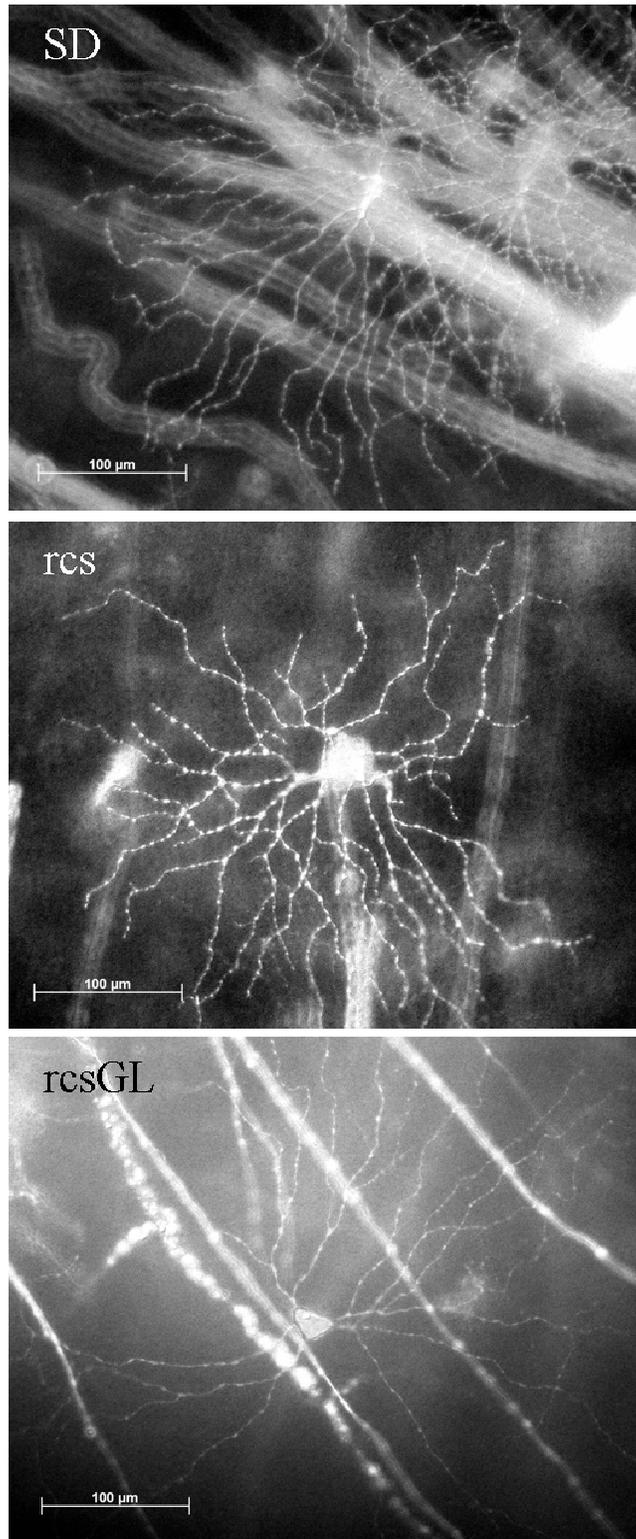


Abbildung 12: Retrograd gefärbte Zellen vom Typ I der drei Rattenstämme.

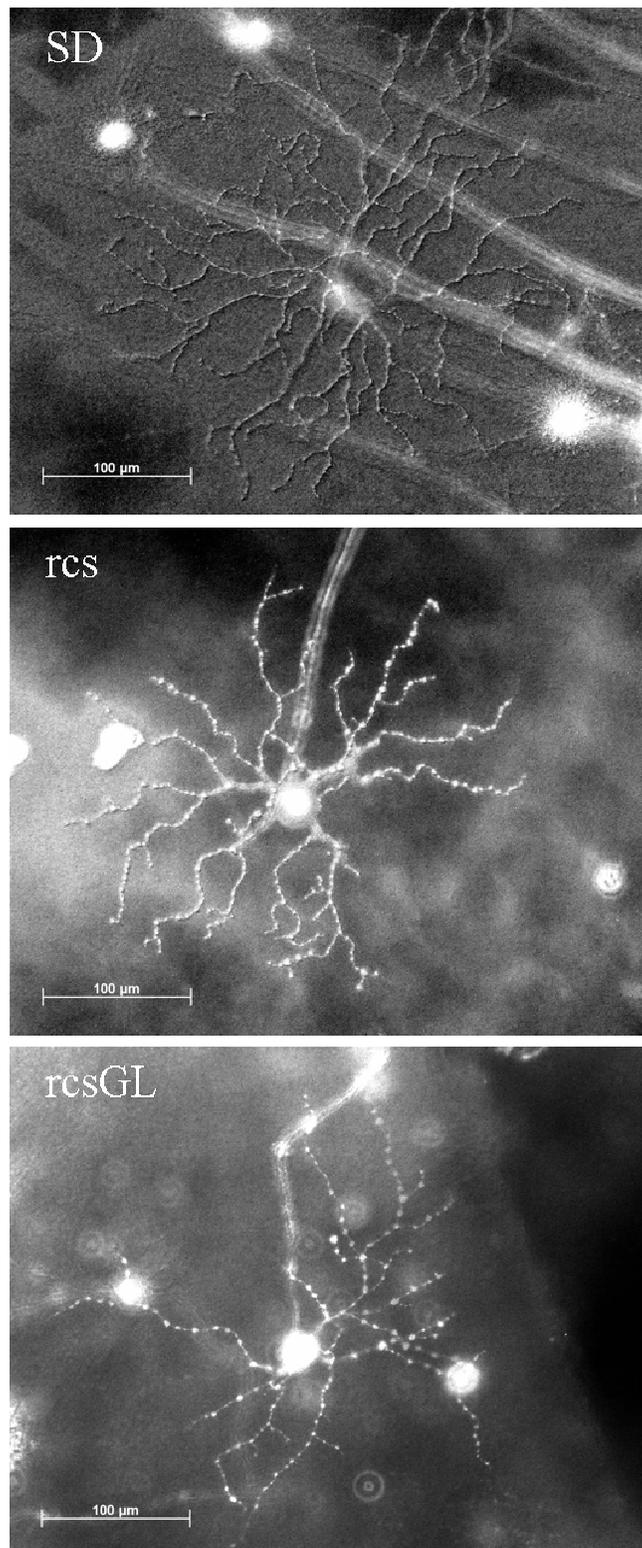


Abbildung 13: Retrograd gefärbte Zellen vom Typ II der drei Rattenstämme.

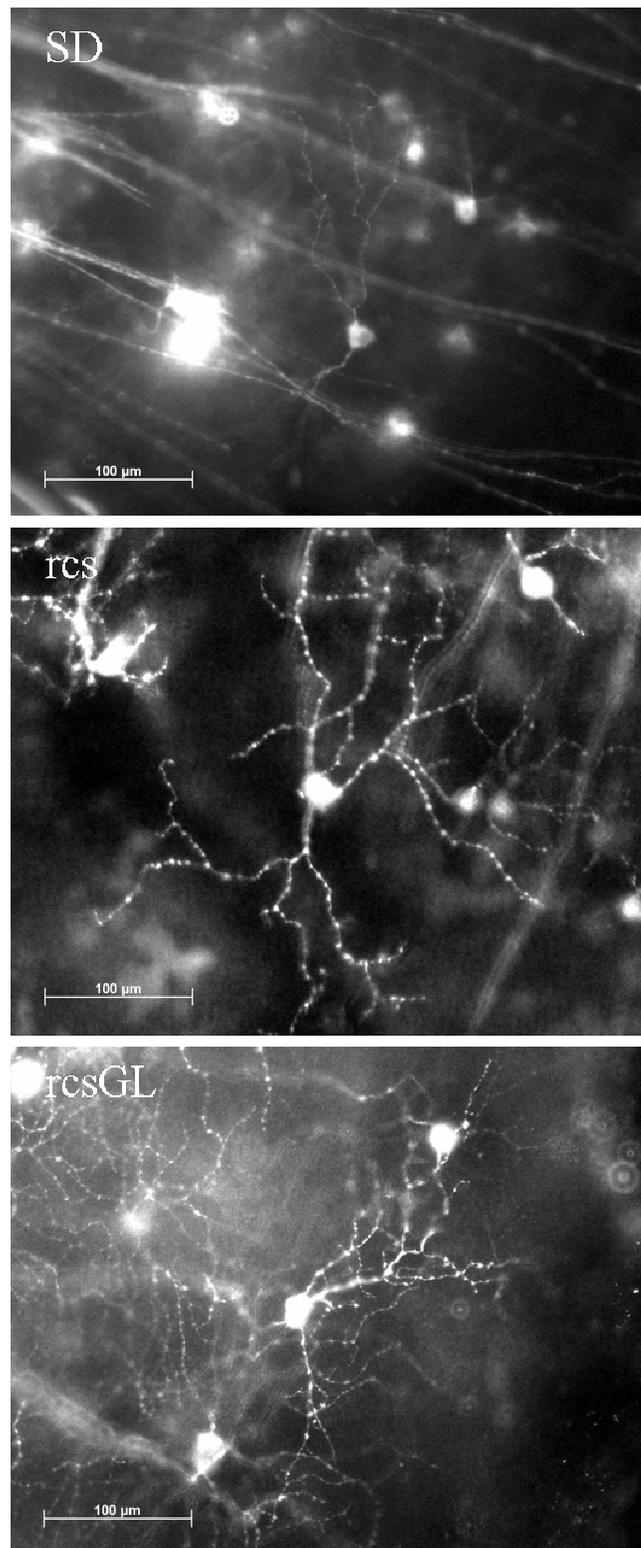


Abbildung 14: Retrograd gefärbte Zellen vom Typ III der drei Rattenstämme.

3.1. Somafläche der RGZ

Die größten Somata wurden bei den Zellen vom Typ I dargestellt. Die gemessenen Werte waren bei den SD-Ratten am höchsten und nahmen bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten stufenweise ab (s. Abb. 15). Bei den SD-Ratten betrug die Somafläche der Typ I-Zellen $740 \mu\text{m}^2$, bei den rcs-Ratten $538 \mu\text{m}^2$, und bei den rcsGL-Ratten $388 \mu\text{m}^2$ (s. Tab. 1).

Die Somata der Typ II-Zellen waren kleiner als die Somata der Typ I-Zellen, und folgten einem ähnlichen stufenweisen Abfall in Größe von SD-Ratten über rcs-Ratten zu rcsGL-Ratten, so wie es bei den Typ I-Zellen beschrieben wurde (s. Abb. 15). Bei den SD-Ratten betrug die Somafläche der Typ II-Zellen $545 \mu\text{m}^2$, bei den rcs-Ratten $426 \mu\text{m}^2$, und bei den rcsGL-Ratten $268 \mu\text{m}^2$ (s. Tab. 1).

Die Typ III-Zellen zeigten die kleinsten Somata der drei Zelltypen. Es bestanden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Rattenstämmen (s. Abb. 15). Bei den SD-Ratten betrug die Somafläche der Typ III-Zellen $240 \mu\text{m}^2$, bei den rcs-Ratten $343 \mu\text{m}^2$, und bei den rcsGL-Ratten $306 \mu\text{m}^2$ (Tab. 1).

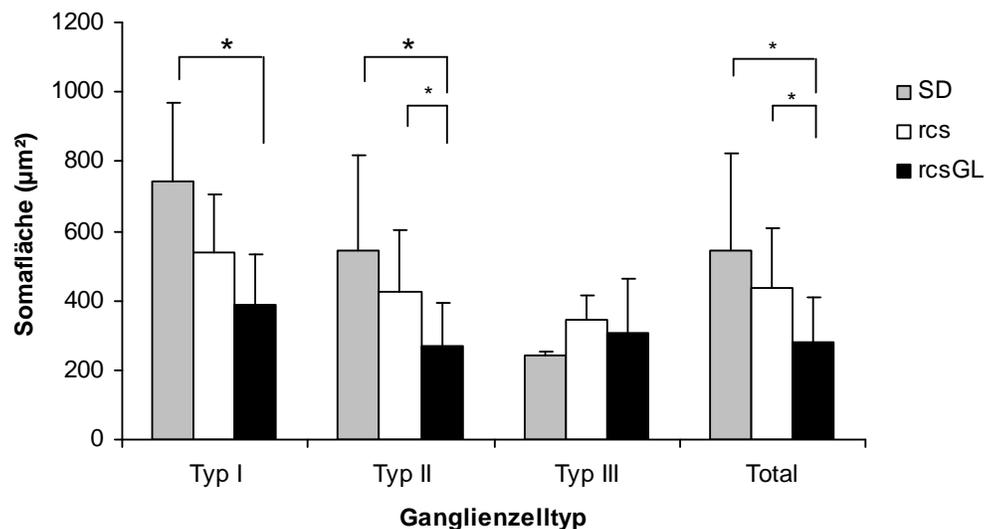


Abbildung 15: Durchschnittliche Somaflächen der RGZ-Typen der drei Rattenstämmen (Bonferroni Test, $p < 0.05$).

Tabelle 1: Durchschnittliche Somaflächen der RGZ.

Rattenstamm	Somafläche in μm^2 (Durchschnitt \pm SD) und Stichprobe der Zellen (n°)			
	Typ I	Typ II	Typ III	Total
SD	740 ± 227 ($n^\circ=3$)	545 ± 275 ($n^\circ=7$)	240 ± 12 ($n^\circ=2$)	543 ± 280 ($n^\circ=12$)
Rcs	538 ± 167 ($n^\circ=11$)	426 ± 177 ($n^\circ=54$)	343 ± 71 ($n^\circ=6$)	435 ± 175 ($n^\circ=71$)
RcsGL	388 ± 147 ($n^\circ=8$)	268 ± 124 ($n^\circ=106$)	306 ± 159 ($n^\circ=4$)	278 ± 129 ($n^\circ=118$)

3.2. Dendritenfeldflächen der RGZ

Die größten Dendritenfelder wurden bei den Zellen vom Typ I dargestellt. Die gemessenen Werte waren bei den SD-Ratten mit einer Fläche von $88015 \mu\text{m}^2$ am höchsten. In der Größe der Dendritenfelder waren sich die Typ I-Zellen der rcs-Ratten und rcsGL-Ratten ähnlich. Die Fläche der Dendritenfelder betrug $60279 \mu\text{m}^2$ bei den rcs-Ratten, und $62146 \mu\text{m}^2$ bei den rcsGL-Ratten (s. Abb. 16 und Tab. 2).

Die Dendritenfelder der Typ II-Zellen waren kleiner als diejenigen der Typ I-Zellen. Bei den SD-Ratten betrug die Dendritenfeldfläche der Typ II-Zellen $47002 \mu\text{m}^2$, bei den rcs-Ratten $25528 \mu\text{m}^2$, und bei den rcsGL-Ratten $24147 \mu\text{m}^2$ (s. Abb. 16 und Tab. 2).

Die Typ III-Zellen zeigten die kleinsten Dendritenfeldflächen der drei Zelltypen. Bei den SD-Ratten wurden die niedrigsten Werte gemessen, während die Werte bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten ähnlich hoch waren. Bei den SD-Ratten betrug die Dendritenfeldfläche der Typ III-Zellen $13303 \mu\text{m}^2$, bei den rcs-Ratten $28225 \mu\text{m}^2$, und bei den rcsGL-Ratten $24484 \mu\text{m}^2$ (s. Abb. 16 und Tab. 2).

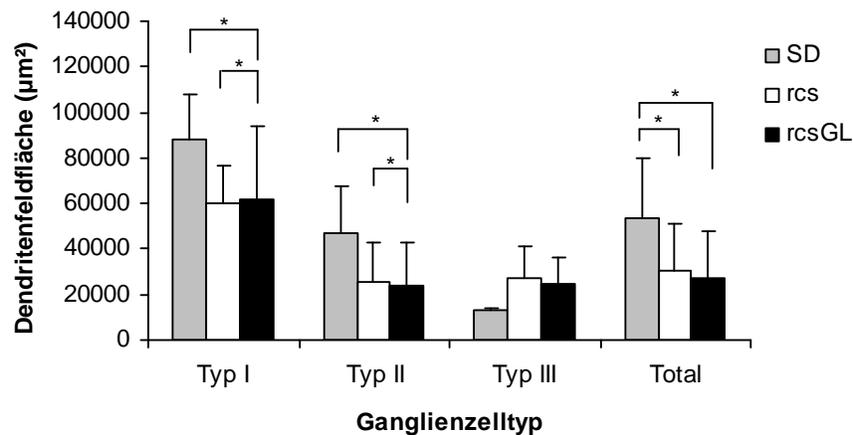


Abbildung 16: Durchschnittliche Dendritenfeldflächen, je nach RGZ-Typ der drei Rattenstämme (Bonferroni Test, $p < 0.05$).

Tabelle 2: Durchschnittliche Dendritenfeldflächen der RGZ.

Rattenstamm	Dendritenfläche in μm^2 (Durchschnitt \pm SD) und Stichprobe (n°)			
	Typ I	Typ II	Typ III	Total
SD	88015 \pm 20248 ($n^\circ=10$)	47002 \pm 20494 ($n^\circ=42$)	13303 \pm 550 ($n^\circ=2$)	53349 \pm 26715 ($n^\circ=54$)
rcs	60279 \pm 16713 ($n^\circ=24$)	25607 \pm 17204 ($n^\circ=134$)	26955 \pm 14002 ($n^\circ=17$)	30521 \pm 20585 ($n^\circ=175$)
rcsGL	62146 \pm 31577 ($n^\circ=8$)	24147 \pm 18398 ($n^\circ=103$)	24484 \pm 11389 ($n^\circ=4$)	26912 \pm 21166 ($n^\circ=115$)

3.3. Verzweigungshäufigkeit der Dendritenbäume

Es erwies sich als bedeutend, die Verzweigungshäufigkeit der Dendritenbäume bei degenerierenden und regenerierenden RGZ zu messen, da sie ein Ausdruck von regressiven Vorgängen am Dendritenbaum einzelner Zellen sein kann.

Die Verzweigungshäufigkeit der Typ I-Zellen war die Höchste unter den drei Zelltypen. Bei den SD-Ratten betrug sie 34.3, bei den rcs-Ratten 28.6, und bei den rcsGL-Ratten 26.8 Verzweigungen der Dendriten pro Zelle (s. Abb. 17 und Tab. 3).

Die Verzweigungshäufigkeit der Typ II-Zellen war geringer als diejenige der Typ I-Zellen. Sie betrug bei den SD-Ratten 31.6, bei den rcs-Ratten 20.5, und bei den rcsGL-Ratten 21.4 Verzweigungen der Dendriten pro Zelle (s. Abb. 17 und Tab. 3).

Die Verzweigungshäufigkeit der Typ III-Zellen war die geringste, die unter den drei RGZ Klassen beobachtet wurde. Sie betrug bei den SD-Ratten 9, bei den rcs-Ratten 11.4, und bei den rcsGL-Ratten 10 Verzweigungen der Dendriten pro Zelle (s. Abb. 17 und Tab. 3).

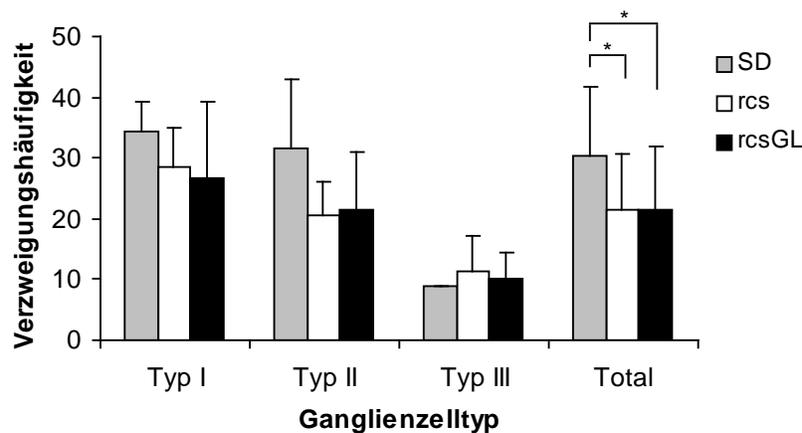


Abbildung 17: Verzweigungshäufigkeit der Dendritenbäume je nach RGZ-Typ und Rattenstamm (Bonferroni Test, $p < 0.05$).

Tabelle 3: Durchschnittliche Verzweigungshäufigkeit der Dendritenbäume der RGZ.

Rattenstamm	Verzweigungshäufigkeit (Durchschnitt \pm SD) und Stichprobe (n°)			
	Typ I	Typ II	Typ III	Total
SD	34.3 \pm 4.9 ($n^\circ=4$)	31.6 \pm 11.5 ($n^\circ=5$)	9 ($n^\circ=1$)	30.4 \pm 11.2 ($n^\circ=10$)
rcs	28.6 \pm 6.3 ($n^\circ=16$)	20.5 \pm 5.7 ($n^\circ=13$)	11.4 \pm 5.9 ($n^\circ=10$)	21.5 \pm 9.1 ($n^\circ=39$)
rcsGL	26.8 \pm 12.5 ($n^\circ=6$)	21.4 \pm 9.7 ($n^\circ=20$)	10 \pm 4.4 ($n^\circ=3$)	21.3 \pm 10.6 ($n^\circ=29$)

3.4. Morphologische Änderungen von RGZ bei der rcsGL-Ratte

Die Ganglienzellen in der *Retina* der rcsGL-Ratte zeigten im Vergleich zu den rcs-Ratten und den SD-Ratten eine niedrigere Zelldichte. Dies betraf sowohl die zentrale als auch die mittlere und periphere *Retina*.

Da die Stichprobe der Typ I- und Typ III-Zellen aufgrund deren Seltenheit statistisch irrelevant ist, wurden in der folgenden Datenauswertung nur die Typ II-Zellen in Betracht gezogen.

Die RGZ der jungen rcsGL-Ratten erschienen im Vergleich zu den RGZ der rcs-Ratten vergrößert. Die Dendritenfeldfläche der Typ II-Zellen der 2.5 Monate alten rcsGL-Ratten war um 63% größer als diejenige der als Kontrolle benutzten Typ II-Zellen der rcs-Ratten. Die Somafläche der Typ II-Zellen war bei den jungen 2.5 Monate alten rcsGL-Ratten höher als bei den älteren rcsGL-Ratten, blieb aber dennoch um 24% niedriger als die Somafläche der als Kontrolle benutzten Typ II-Zellen der rcs-Ratten.

Die Somafläche der Typ II-Zellen der rcsGL-Ratten fiel zunächst kontinuierlich von 325 μm^2 bei den 2.5 Monate alten Ratten auf 170 μm^2 bei den 11 Monate alten Ratten. Bei den 14 und 21 Monate alten Ratten fanden sich etwas höhere Werte (s. Abb. 18 und Tab. 4).

Die Dendritenfeldfläche der Typ II-Zellen der rcsGL-Ratten verhielt sich ähnlich wie deren Somafläche. Zunächst erfolgte ein kontinuierlicher Abfall der Werte von 41577 μm^2 bei den 2.5 Monate alten Ratten bis auf 8564 μm^2 bei den 11 Monate alten Ratten. Bei den 14 und 21 Monate alten Ratten fanden sich höhere Werte (s. Abb. 19 und Tab. 4).

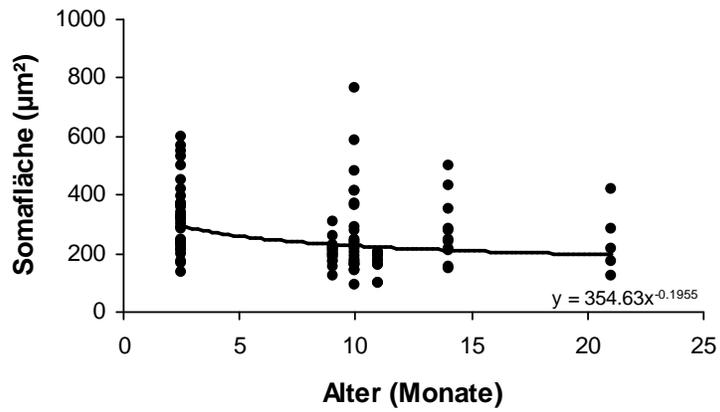


Abb. 18: Entwicklung der Somafläche der Typ II-Zellen in Abhängigkeit vom Alter bei der rcsGL-Ratte.

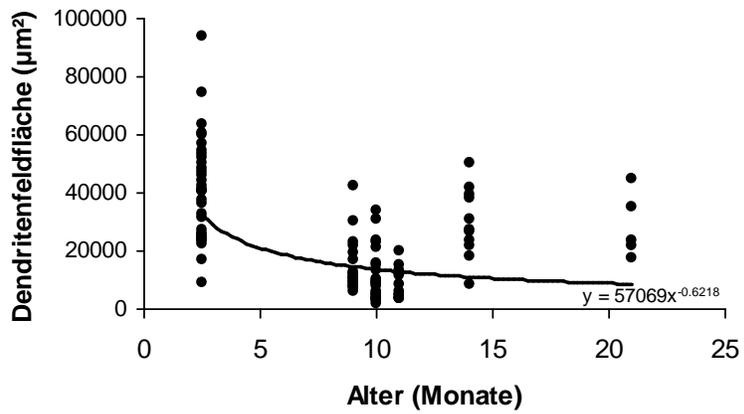


Abb. 19: Entwicklung der Dendritenfeldfläche der Typ II-Zellen in Abhängigkeit vom Alter bei der rcsGL-Ratte.

Tabelle 4: Änderungen der Soma- und Dendritenfeldflächen der RGZ vom Typ II bei der rcsGL-Ratte je nach Alter.

Alter	Somafläche in μm^2	Dendritenfläche in μm^2
	Durchschnitt \pm SD und Stichprobe der Zellen (n°)	
2.5 Monate	325 \pm 121 (n°=33)	41577 \pm 11725 (n°=33)
9 Monate	205 \pm 38 (n°=19)	14718 \pm 9253 (n°=19)
10 Monate	208 \pm 160 (n°=24)	11335 \pm 9104 (n°=24)
11 Monate	170 \pm 38 (n°=11)	8564 \pm 5707 (n°=11)
14 Monate	279 \pm 110 (n°=11)	29716 \pm 11980 (n°=11)
21 Monate	242 \pm 114 (n°=5)	28461 \pm 11239 (n°=5)

D. Diskussion

1. Das Glaukom

Das Glaukom stellt eine vielfältige Gruppe von Funktionsstörungen dar, mit einer gemeinsamen Folge: *Optikus*-Neuropathie, die letztendlich zur Erblindung führt. Primär als Offenwinkelglaukom bekannt, ist diese eine chronische Krankheit, die einen progressiven Verlust von RGZ und deren Axone darstellt, was zur Entwicklung eines progredienten Gesichtsfeldverlustes führt.

Beim chronischen Glaukom sterben nicht alle RGZ gleichzeitig; sie sterben über die Zeitdauer von mehreren Jahren oder Jahrzehnten ab. Aus diesem Grund ermöglicht das langsame Fortschreiten der *Optikus*-Neuropathie eine Untersuchung der noch lebenden Zellen über einen längeren Zeitraum und das Bewahren der Zellen vor der Apoptose.

Der wichtigste ätiologische Faktor, gegen welchen bedeutende therapeutische Bemühungen gerichtet werden, bleibt der erhöhte Augeninnendruck (obwohl andere Annäherungen auch in Betracht gezogen werden (Schumer & Podos, 1994)). Beim primären Offenwinkel-Glaukom, Winkelverschluss und sekundärem Glaukom entwickelt sich eine *Optikus*-Neuropathie und führt zum Absterben von RGZ.

Die herrschenden Hypothesen bezüglich des Mechanismus vom IOD-vermittelten Sehnervschadens erfassen die Kompression der Axone in der *Lamina cribrosa*; Ischämie in den *laminae*; erhöhte Glutamatspiegel, die den Untergang von RGZ verursachen; und Stickstoffoxid-Synthetase (NOS) im Sehnervenkopf (Shareef et al, '99).

2. Die rcsGL-Ratte als Tiermodell des Glaukoms

Zur Untersuchung von retinalen Schäden, die durch *Optikus*-Neuropathie verursacht wurden, werden Tiermodelle benötigt, die auch im menschlichen Gewebe nachweisbare Aspekte von primärem oder sekundärem Glaukom enthalten. Bisher existierte kein spezifisches Tiermodell, das unmittelbare Ähnlichkeit zum humanen Glaukom hatte.

Die rcsGL-Ratte ist eine genetisch mutierte rcs-Ratte (Royal College of Surgeons) mit angeborenem Glaukom (Buphthalmus).

Bedingt durch einen Gendefekt, findet bei der rcs-Ratte zunächst eine Degeneration des retinalen Pigmentepithels statt, die von einer Degeneration der Netzhaut gefolgt wird. Die Photorezeptoren werden dabei geschädigt und entarten.

Da die rcsGL-Ratte durch eine Spontanmutation aus dem rcs-Rattenstamm entstanden ist, kann das nicht-glaukomatöse Auge einer rcs-Ratte bzw. deren *Retina* am ehesten als Kontrolle zur druckgeschädigten rcsGL-Ratten-*Retina* in Betracht gezogen werden.

Die in unserer Zucht erstmalig aufgetretene rcsGL-Ratte hat sich als geeignetes Tiermodell für die Glaukomforschung erwiesen.

Die bisher üblichen Tiermodelle des Glaukoms benutzten unterschiedliche künstliche Techniken, damit erhöhte IOD Werte erreicht werden. Übliche Methoden sind die Kauterisation von episkleralen oder limbalen Venen (Mittag et al., 2000; Shareef et al., 1995; Garcia-Valenzuela et al., 1995), die Injektion von hypertrophischer Lösung in die das limbale Kammerwasser aufnehmende Venen (Moore et al., 1993; Morrison et al., 1997; Johnson et al., 1996), trabekuläre Laser-Photokoagulation nach Injektion von Schwarztusche in die Vorderkammer (Udea et al., 1998) oder die Injektion von S-Antigen (Mermoud et al., 1994).

Das Auge bei der rcsGL-Ratte muss, anders als bei diesen künstlichen Tiermodellen des Glaukoms, nicht chirurgisch oder chemisch manipuliert werden, um einen erhöhten IOD zu erreichen. Somit werden die RGZ einzig und alleine durch erhöhten IOD geschädigt, nicht etwa durch eventuelle Verletzung von Gewebe oder Stress-Vermittelnden Faktoren, die bei der Operation am Auge freigesetzt werden.

Das bei der rcsGL-Ratte auftretende Glaukom kommt, von den pathophysiologischen Mechanismen her, dem kindlichen hereditären Glaukom des Menschen sehr nahe.

3. Augeninnendruck

Ursächlich für den erhöhten IOD bei der rcsGL-Ratte ist eine erhöhte Produktion von Kammerwasser, die durch mehrere Ziliarkörperanlagen bedingt ist. Während der

gesamten Dauer des Experimentes wiesen die rcsGL-Ratten einen erhöhten IOD auf. Mit fortschreitendem Alter der Ratten stieg der IOD nach und nach leicht an.

Bei allen untersuchten rcsGL-Ratten lagen die bilateral pathologischen IOD-Werte über 16 mmHg. Der durchschnittliche IOD, der bei den rcsGL-Ratten gemessen wurde, betrug 24.4 mmHg (1.9-fach höher als der normale IOD von 13 mmHg bei Ratten).

4. Retrograde Färbung der RGZ

Langketten-Dialkylkarbocyanine, insbesondere der Fluoreszenzfarbstoff DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate), werden weit verbreitet als anterograde und retrograde neuronale Marker in Zellen und in lebendigen, fixierten Gewebe benutzt. DiI färbt Neurone gleichmäßig durch laterale Diffusion in die Plasmamembran mit einer Geschwindigkeit von etwa 0.2-0.6 mm pro Tag im fixierten Gewebe.

Der zum Markieren der Zellen verwendete DiI ist nicht selektiv für einen bestimmten Ganglienzelltyp und bringt alle Zelltypen in ihren normalen und degenerierenden Silhouetten hervor (Mey & Thanos, 1993; Thanos et al., 1993; Thanos et al., 1992).

In den meisten Fällen konnten stark gefärbte Axone beobachtet werden und, an den Stellen an denen die Zelldichte niedriger war, deutliche Dendritenbäume entdeckt werden. Diese Beobachtungen deuten auf eine angemessene Zellfärbung hin.

5. Verteilung der RGZ

Die Verteilung der RGZ entsprach grob der Verteilung, wie sie von Dreher et al. (1985) und Thanos (1988) beschrieben wurde.

Die Typ II-Zellen waren bei den rcsGL-Ratten mit einem Anteil von 89.6% aller RGZ um mehr als 10% häufiger repräsentiert als bei den zwei anderen Rattenstämmen.

Der Anteil der Typ I-Zellen an den RGZ betrug bei den rcsGL-Ratten 7%. Damit waren sie nur etwa halb so häufig repräsentiert als die Typ I-Zellen der zwei anderen Rattenstämme.

Die Typ III-Zellen erfassten die kleinste Gruppe von RGZ. Bei den rcsGL-Ratten lag ihr Anteil an allen RGZ bei 3.5%.

Da die Typ I- und Typ III-Zellen selten sind und bei den rcsGL-Ratten gar noch seltener aufzufinden waren als bei den zwei anderen Rattenstämmen, war ihre Stichprobe entsprechend auch geringer (s. Erläuterung von Abb. 8). Daher ist ihr hier genannter prozentueller Anteil, welcher alle drei Rattenstämme betrifft, nur begrenzt aussagekräftig.

Es wurde der Untergang von RGZ bei Ratten und Affen mit okulärer Hypertension beschrieben (Quigley et al. 1987, 1995; Garcia-Valenzuela et al., 1995; Selles-Navarro et al., 1996; Laquis et al., 1998). Ahmed et al. (2001) beschreiben einen RGZ-Untergang von 3-4% pro Woche in Augen mit erhöhten IOD.

Die hier vorgefundene Verteilung von RGZ bei den rcsGL-Ratten kann durch das frühere Absterben von großen RGZ, wie die Typ I- und II-Zellen, erklärt werden. Laquis et al. (1997) beschreiben beim Affen eine höhere Empfindlichkeit von großen RGZ für erhöhten IOD. Kleinere RGZ, wie die Typ II-Zellen, sind dagegen weniger empfindlich gegenüber erhöhtem IOD. RGZ mit großem Somadurchmesser sterben mit höherer Frequenz (Quigley et al., 1987).

6. Morphologie der RGZ

Vier bis sechs Wochen nachdem der Fluoreszenzfarbstoff DiI auf die *Retina* aufgetragen worden ist, konnten stark gefärbte Axone und deutliche Dendritenbäume beobachtet werden. Die vollständig retrograd gefüllten RGZ waren deutlich zu erkennen.

Die retrograd gefärbten Typ I-Zellen zeigten große Somata und große Dendritenfelder. Die Dendriten der Typ I-Zellen waren eher glatt, ihre Axone relativ dick.

Typ II-Zellen besaßen kleine bis mittelgroße Somata und kleine bis mittelgroße Dendritenfelder. Die Eigenschaft des Dendritenbaumes, sich „buschig“ zu verzweigen, ließ in den meisten Fällen eine einfache Erkennung dieser Zellen zu.

Die RGZ vom Typ III besaßen folgende Eigenschaften: kleine bis mittelgroße Somata und breite Dendritenfelder im Durchmesser, jedoch schmal und sich in die Länge ziehend. Folglich besaßen sie eine relativ geringe Dendritenfeldfläche.

Die hier präsentierten Daten bestätigen frühere Berichte über die Morphologie und Ausdehnung der RGZ-Dendriten der Rattenretina (Brown, 1965; Fukuda, 1977; Perry, 1979, Perry & Walker, 1981; Dreher et al. 1985, Thanos, 1988).

Die Soma- und Dendritenfeldfläche der markierten RGZ wurden mit Hilfe eines computergestützten Bildanalyse-Systems errechnet. In dieser Arbeit wurde die Fläche der Somata berechnet, nicht deren Durchmesser wie es in älteren Studien üblich war, da die Fläche genauere Werte ergibt und einen genaueren Vergleich der Somata ermöglicht. Der Nachteil, den Somadurchmesser als Parameter festzulegen, sind vor allem die nicht rundlichen Somata mancher RGZ, bei denen ein Mittelwert aus längstem und kürzestem Durchmesser gebildet wird (Schober & Gruschka, 1977). Computergestützte Bildanalyse-Systeme machten die genaue Errechnung der Fläche des Zellkörpers und des Dendritenfeldes einer RGZ möglich, eine Methode, die auch von anderen Autoren benutzt wurde (Moore & Thanos, 1996; Leak & Moore, 1997).

Die gemessenen Flächen der Somata waren bei den SD-Ratten am höchsten und nahmen bei den rcs-Ratten deutlich stufenweise um ~28% ab und bei den rcsGL-Ratten um ~28%.

Die Somata der Typ II-Zellen folgten einem ähnlichen stufenweisen Abfall bezüglich der Größe von SD-Ratten über rcs-Ratten zu rcsGL-Ratten, wie es bei den Typ I-Zellen beschrieben wurde. Die Somataflächen der Typ II-Zellen der rcs-Ratte waren um ~22% kleiner als diejenigen der SD-Ratten, diejenigen der rcsGL-Ratten um etwa ~38% kleiner als bei den rcs-Ratten.

Bei den Typ III-Zellen bestanden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Rattenstämmen. Die Typ III-Zellen waren sehr selten und ihre Stichprobe daher auch recht klein (s. Tab. 1). Deswegen sind die hier genannten Daten nur begrenzt aussagekräftig und nur bedingt verwertbar.

Die deutlichen Wertunterschiede der Flächen weisen auf degenerative Prozesse bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten hin. Bei den rcs-Ratten gehen wir von einer genetisch

bedingen, bei den rcsGL-Ratten von einer IOD und genetisch bedingten Degeneration aus.

Die Flächen der gemessenen Dendritenfelder der Typ I-Zellen waren bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten ähnlich und um ~30% niedriger als bei den SD-Ratten.

Auch die Werte der Dendritenfeldflächen der Typ II-Zellen waren bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten ähnlich und um ~47% niedriger als bei den SD-Ratten. Eine Abnahme von Dendritenbäumchen deutet auf degenerative Vorgänge hin, z.B. auf das Wegfallen kleiner, peripherer Verzweigungen. Dies könnte in Übereinstimmung mit dem Funktionsverlust der RGZ bei rcs und rcsGL-Ratten der Fall sein.

Für die Typ III-Zellen wurden bei den SD-Ratten die niedrigsten Werte der Dendritenfeldflächen gemessen, während die Werte bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten etwa doppelt so hoch waren. Da diese Zellen selten sind, war ihre Stichprobe dementsprechend kleiner (s. Tab. 2) und daher die hier genannte Daten nur bedingt aussagekräftig.

Die Retina der rcsGL-Ratte zeigte im Vergleich zu den rcs-Ratten und den SD-Ratten eine niedrigere Zelldichte. Dies ist bedingt durch den glaukomatös verursachten Zelltod. Daraufhin wurde die Auswirkung von erhöhtem IOD auf die RGZ bei der rcsGL-Ratte über eine längere Zeitdauer beobachtet.

Da die Stichprobe der Typ I- und Typ III-Zellen aufgrund deren Seltenheit statistisch irrelevant ist, wurden in der folgenden Datenauswertung nur die Typ II-Zellen in Betracht gezogen.

Die Dendritenfeldfläche der Typ II-Zellen war bei den 2.5 Monate alten rcsGL-Ratten um 63% größer als diejenige der als Kontrolle benutzten Typ II-Zellen der rcs-Ratten. Die Somafläche der Typ II-Zellen war bei den 2.5 Monate jungen rcsGL-Ratten höher als bei den Älteren, blieb dennoch um 24% niedriger als die Somafläche der als Kontrolle benutzten Typ II-Zellen der rcs-Ratten.

Die Somafläche der Typ II-Zellen der rcsGL-Ratten fiel zunächst kontinuierlich ab; allerdings fanden sich etwas höhere Werte bei den 14 und 21 Monate alten Ratten. Die Somafläche der Typ II-Zellen der rcsGL-Ratten verhielt sich ähnlich wie deren Dendritenfeldfläche, d.h. sie wiesen einen zunächst kontinuierlichen Abfall der Werte auf, die von höheren Werten bei den 14 und 21 Monate alten Ratten gefolgt wurden.

Obwohl über den Untergang von RGZ durch Apoptose in Augen mit erhöhtem IOD bei Ratten und Affen berichtet wurde (Quigley et al. 1987, 1995; Garcia-Valenzuela et al., 1995; Selles-Navarro et al., 1996; Laquis et al., 1998), ist das Schicksal der verbliebenen RGZ nicht ausreichend dokumentiert. Es wird angenommen, dass die überlebenden RGZ in Augen mit erhöhtem IOD entweder unverändert bleiben oder aufgrund des Raumes, der durch den Zelltod geschädigter Zellen geschaffen wird, an Größe zunehmen.

Schäden im visuellen System von sich entwickelnden Ratten, welche durch Vakuumaspiration oder Injektion von kainischer Säure in das *Tectum* bewirkt werden, führten zur Abnahme der RGZ-Dichte in der *Retina* (Bahr et al., 1992, Carpenter et al., 1986). Diese Autoren zeigten eine Zunahme in der Somagröße der überlebenden RGZ.

Ahmed et al. (2001) beschrieben eine Zunahme von Soma- und Dendritenfeldgröße bei allen Typen der überlebenden RGZ (I, II und III) in der *Retina* von Ratten, bei denen erhöhter IOD durch die Kauterisation von zwei limbalen Venen erzeugt wurde. Sie beschreiben eine schnellere Zunahme an Soma- und Dendritenfeldgröße bei den Typ I- und Typ III Zellen als bei den Typ II-Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Typ I- und Typ III-Zellen schneller betroffen sind und unter experimentellen Bedingungen früher sterben als Typ II-Zellen. Ihre Beobachtungen der durch erhöhten IOD zugefügten Schäden der RGZ erstrecken sich über maximal 10 Wochen. Es ist durchaus denkbar, dass eine kurzfristige experimentelle Erhöhung des IOD zu einer vorübergehenden „Anschwellung“ von Zellen führt. Eine solche Veränderung ist beim echten Glaukom und beim hier behandelten Glaukommodell nicht beobachtet worden.

Die Mechanismen, die zu erhöhten Soma- und Dendritenfeldergrößen in Augen mit erhöhtem IOD führen, sind schwer fassbar. Es könnte als Antwort auf kurzfristig erhöhten IOD sein, bei dem die Zellen „anschwellen“ bevor sie sterben. Da der Tod von RGZ in Augen mit erhöhtem IOD langwierig ist, wird angenommen, dass die erste Reaktion der Zellen eine Hypertrophie der Somata ist (Ahmed et al., 2001).

Der Unterschied zwischen dem hier vorgestellten Tiermodell und dem Modell von Ahmed et al. (2001) besteht in der Dauer des Glaukoms, wobei wir RGZ über einen längeren Zeitraum beobachtet haben. Wie im Experiment von Ahmed et al. (2001)

zeigte sich zunächst eine mäßige Hypertrophie der Somata und Dendritenfelder von RGZ. Über einen längeren Zeitraum hin wurde allerdings ein Abfall der Somata- und Dendritenfeldflächen beobachtet. Die Ursachen hierfür sind vermutlich einerseits das Absterben großer Zellen, die empfindlicher auf einen erhöhten IOD reagieren, und andererseits eine Atrophie aller Zellen, die über einen längeren Zeitraum dem erhöhten IOD ausgesetzt waren.

Ein dritter wichtiger Parameter ist die Häufigkeit der Verästelung der Dendritenbäume unter den unterschiedlichen Typen von RGZ (Thanos, 1988). Die Verästelungshäufigkeit wird definiert als die absolute Zahl der Bifurkationen im Dendritenfeld einer Zelle. Es hat sich als wichtig herausgestellt, diesen Parameter zu ermitteln, da er sich deutlich in degenerierenden und regenerierenden RGZ verändert (Thanos & Aguayo, 1988).

Die Verzweigungshäufigkeit der Dendriten aller RGZ war bei den SD-Ratten um 42% höher als bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass bei den beiden mutierten Rattenstämmen auch auf der Ebene der Ganglienzellen degenerative Veränderungen ablaufen.

Die Dendritenverästelung der RGZ über die Zeit konnte bei der rcsGL-Ratte aufgrund der zu kleinen Stichprobe nicht bewertet werden. Trendmäßig zeigten jedoch die beobachteten Zellen eine Abnahme der Dendritenverästelung über die Zeit.

Ahmed et al. (2001) fanden nach einem erhöhtem IOD über zehn Wochen keine bedeutenden Unterschiede in der Zahl der primären Dendriten der RGZ.

Die hier beobachtete niedrigere Verzweigungshäufigkeit der RGZ-Dendriten bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten lässt sich möglicherweise auf den Gendefekt der rcs-Ratte, durch den eine Degeneration des retinalen Pigmentepithels und der Netzhaut auftritt, zurückführen. Neben den Photorezeptoren können auch die RGZ dadurch geschädigt werden und degenerieren, was die niedrigere Ramifikationshäufigkeit ihrer Dendritenbäume erklären könnte. Es könnte aber auch eine sekundäre Degeneration sein, die auf der Basis eines fehlenden visuellen Eingangs entsteht. Durch den Wegfall der Photorezeptoren werden die RGZ funktionslos und reagieren mit einer Reduktion ihres Dendritenfeldes.

E. Zusammenfassung

Das Glaukom stellt eine vielfältige Gruppe von Funktionsstörungen dar mit einer gemeinsamen Folge: *Optikus*-Neuropathie, die letztendlich zur Erblindung führt. Diese chronische Krankheit, die mit einem progressiven Verlust von RGZ und deren Axone einhergeht, führt zur Entwicklung eines mit der Zeit zunehmenden Gesichtsfeldverlustes.

In der vorliegenden Dissertation wurden die Effekte des erhöhten Augeninnendruckes an den retinalen Ganglienzellen bei genetisch mutierten Ratten (sogenannte „rcsGL-Ratten“) mit angeborenem Glaukom (Buphthalmus) analysiert, um krankheitsbedingte Zellveränderungen zu erfassen.

Durch die retrograde Färbung der RGZ mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI in fixiertem Gewebe war es möglich, die verschiedenen RGZ-Typen fluoreszenzmikroskopisch zu unterscheiden und auf morphologische Veränderungen zu untersuchen.

Alle untersuchten rcsGL-Ratten zeigten bilateral pathologische IOD-Werte, die über 16 mmHg lagen. Die dargestellte Zusammensetzung der drei verschiedenen Zelltypen entsprach grob der üblichen Verteilung von RGZ in der Rattenretina.

Die größten Somata wurden bei SD-Ratten dargestellt, und nahmen bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten stufenweise ab. Auch die höchsten Werte der Dendritenfelder und der Verzweigungshäufigkeit wurden bei SD-Ratten gefunden und waren bei den rcs-Ratten und rcsGL-Ratten ähnlich niedriger.

Bei der rcsGL-Ratte wurde zunächst eine Hypertrophie der Somata und Dendritenfelder beobachtet, die über längere Zeit wiederum atrophierten und an Größe abnahmen.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein erhöhter Augeninnendruck in unserem Tiermodell, zu Gewebeveränderungen führt, die sich als Apoptosis oder Veränderungen der Zellmorphologie manifestieren. Dies trifft auch bei der Glaukom-Erkrankung zu.

Die Ergebnisse sind für das Verständnis von zellulären Vorgängen beim Glaukom wichtig, da sie den morphologischen und chronologischen Verlauf der Zellschädigung darstellen und eine Grundlage für die Entwicklung einer eventuellen Therapie des Glaukoms sein könnten.

Die tierexperimentelle Arbeit wurde am 26.04.2001 durch die Bezirksregierung Münster genehmigt, und unter dem Aktenzeichen Nummer G9/2001 registriert.

F. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
GCL	Ganglienzellschicht (= layer)
INL	innere nukleäre Schicht
IPL	innere plexiforme Schicht
IOD	intraokularer Druck
OFL	äußere Faserschicht
ONL	äußere nukleäre Schicht
OPL	äußere plexiforme Schicht
PBS	Phosphate-Buffered saline
rcs-Ratte	Royal College of Surgeons-Ratte
rcsGL-Ratte	Royal College of Surgeons-Glaukom-Ratte
RF	rezeptives Feld
RGZ	retinale Ganglienzellen
SD	Standardabweichung (= deviation)
SD-Ratte	Sprague Dawley Ratte
Tab.	Tabelle

G. Literaturverzeichnis

Ahmed F. A. K. M., Chaudhary P., Sharma S. C. (2001) Effects of increased intraocular pressure on rat retinal ganglion cells. *Intern. J. Developm. Neurosci.*, 19, 209-218.

Axenfeld T., Pau H. (1992) *Lehrbuch der Augenheilkunde*. Gustav Fischer, Stuttgart Jena New York, 13. Aufl., 381-423.

Bahr M., Wizenmann A., Thanos S. (1992) Effect of bilateral tectum lesions on retinal ganglion cell morphology in rats. *J. Comp. Neurol.*, Jun 15, 320(3), 370-380.

Brown J. E. (1965) Dendritic fields of retinal ganglion cells of the rat. *J. Neurophys.*, 28, 1091-1110.

Boycott B. B., Wässle H. (1974) The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J. Phys.(London)*, 240, 397-419.

Carpenter P., Sefton A. J., Dreher B., Lim W. L. (1986) Role of target tissue in regulating the development of retinal ganglion cells in the albino rat: effects of kainate lesions in the superior colliculus. *J. Comp. Neurol.*, 251, 240-259.

Coleman A. L. (1999) Glaucoma. *The Lancet*, 354, 1803–1810.

Drager U. C., Olsen J.F. (1981) Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest. Ophthalm. & Vis. Sci.*, Vol 20, 285-293.

Dreher B., Sefton A. J., Ni, S. Y. K., Nisbett G. (1985) The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behav. Evol.*, 26, 10-48.

- Fukuda Y. (1977) A three-group classification of rat retinal ganglion cells: Histological and physiological studies. *Brain Res.*, 119, 327-344.
- Garcia-Valenzuela E., Shareef S., Walsh J., Sharma, S. C. (1995) Programmed cell death of retinal ganglion cells during Exp. glaucoma. *Exp. Eye Res.*, 61, 33-44.
- Gelatt K. N. (1977) Animal models for glaucoma. *Invest. Ophthalm. & Vis. Sci.*, 16, 592-596.
- Kansky J. J., Menon J. (2003) *Klinische Ophthalmologie.* Urban & Fischer, München Jena, 5. Aufl., 194-195.
- Johnson E. C., Morrison J. C., Farrell S., Deppmeier L., Moore C. G., Meginty, M. R. (1996) The effect of chronically elevated intraocular pressure on the rat optic nerve extracellular matrix. *Exp. Eye Res.*, 62, 663-674.
- Köbber C., Apps R., Bechmann I., Lanciego J. L., Mey J., Thanos S. (2000) Current concepts of neuroanatomical tracing. *Progr. in Neurobiol.*, 62, 327-351.
- Krupin T., Feitl M., Roshe R., et al. (1980) Halothane anesthesia and aqueous humor dynamics in laboratory animals. *Invest. Ophthalm. & Vis. Sci.*, 19, 518-521.
- Laquis S., Chaudhary P., Sharma S. C. (1998) The Patterns of Retinal Ganglion Cell Death in Hypertensive Eyes. *Brain Res.*, 784, 100-104.
- Leak R. K., Moore R. Y., (1997) Identification of retinal ganglion cells projecting to the lateral hypothalamic area of the rat. *Brain Res.*, 770, 105-114.
- Leske M. C. (1983) The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *American J. Epidem.*, 118, 166-191.

Linden R. (1987) Displaced ganglion cells in the retina of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 258, 138-143.

Mermoud A., Baerveldt G., Mickler D. S., Wu G. S., Rao N. A. (1994) Animal model for uveitic glaucoma. *Graefes Arch. of Clinical and Exp. Ophthalmol.*, 232, 553–560.

Mey J., Thanos S. (1993) Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res.*, 602, 304–317.

Mirakhur R., Elliott K., Shepard W. F. I., McGalliard J. N. (1990) Comparison of the effects of isoflurane and halothane on intraocular pressure. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 34, 282-285.

Mittag T. W., Danias J., Pohorenc G., Yuan H. M., Burakgazi E., Chalmers-Redman R., Podos S. M., Tatton W. G. (2000) Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, 41, 3451–3459.

Moore C. G., Milne S. T., Morrison J. C. (1993) A rat model of pressureinduced optic nerve damage. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci. (Supplement)*, 34, S1141 (Abstract).

Moore C. G., Epley D., Milne S. T., Morrison J. C. (1995) Long-term non-invasive measurement of intraocular pressure in the rat eye. *Current Eye Res.*, 14, 711-717.

Moore S., Thanos S., (1996) Differential increases in rat ganglion cell size with various methods of optic nerve lesion. *Neurosci. Letters*, 207, 117-120.

Morrison J. C., Moore C. G., Deppmeier L. M., Gold B. G., Meshul C. K., Johnson E. C. (1997) A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp. Eye Res.*, 64, 85–96.

Ni S. Y. K., Dreher B. (1981) Morphology of rat ganglion cells projecting to the thalamus and midbrain. Proc. Aust. Phys. and Pharm. Society, 12, 97P.

Peichl L. (1989) Zur Organisation der Netzhaut: Struktur/Funktions-Beziehungen und ein Speziesvergleich retinaler Ganglienzellen. Fortgeschr. Ophtalm., 86, 47-53.

Perry V. H. (1979) The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgy study. Proc. R. Society London, B 204, 363-375.

Perry V. H., Walker M. (1981) Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. Neurosci. 6, 931-944.

Quigley H. A., Nickels R. W., Kerrigan L. A., Pease, M. E., Thibault D. J., Zack D. J. (1995) Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. Invest. Ophtalm. & Vis. Sci., 36, 774-786.

Quigley H. A., Sanchez R. M., Dunkelberger G. R., L'Hernault N. L., Baginski T. A. (1987) Chronic glaucoma selectively damages large optic nerve fibers. Invest. Ophtalm. & Vis. Sci., 28, 913-920.

Racette L., Wilson M. R., Zangwill L. M., Weinreb R. N., Sample P. A. (2003) Primary open-angle glaucoma in blacks: a review. Survey of Ophthalm., 48, 295-313.

Schiebler T. H., Schmidt W., Zilles K. (1999) Anatomie. Springer, Berlin Heidelberg New York, 8. Aufl., 692-702.

Schlötzer U. (2003) Pathogenese der Glaukome: Strukturen und Mechanismen. [Online], <http://www.onjoph.com/deutsch/schloetz/schloetzer1.html>.

Schmidt R. F., Thews G. (1997) Physiologie des Menschen. Springer, Berlin Heidelberg New York, 27. Aufl., 283-315.

Schober W., Gruschka H. (1977) Die Ganglienzellen der Retina der Albinoratte: Eine qualitative und quantitative Studie. *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung*, Leipzig, 91, 397-414.

Schumer R. A., Podos S.M. (1997) The nerve of glaucoma. *Arch. Ophthalmol.*, 112, 37-44.

Selles-Navarro I., Villegas-Perez M. P., Salvador-Silva M., Ruiz-Gomez J. M., Vidal-Sanz M. (1996) Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, 37, 2002-2014.

Shareef S. R., Garcia-Valenzuela E., Salierno A., Walsh J., Sharma S. C. (1995) Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp. Eye Res.*, 61, 379-382.

Shareef S., Sawada A., Neufeld A.H. (1999) Isoform's of nitric synthase in the optic nerve of rat eye with chronic moderately elevated intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, 40, 2.884-91.

Simon P., Thanos S., (1998) Combined methods of retrograde staining, layer-separation and viscoelastic cell stabilization to isolate retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci. Meth.*, 83, 113–124.

Thanos S. (1988) Morphology of ganglion cell dendrites in the albino rat retina: an analysis with fluorescent carbocyanine dyes. *J. Hirnforsch.*, 29, 617-631.

Thanos S., Mey J., Wild M. (1993) Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J. Neurosci.*, 13, 455-466.

Thanos S., Pavlidis C., Mey J. and Thiel H.-J. (1992) Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after experimentally induced degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.*, 55, 101-117.

Thanos S., Vidal-Sanz M., Aguayo A. J. (1987) The use of rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. *Brain Res.*, 406(1-2), 317-321.

Tiwo Y. C., Blakemore C. (1976) Regional specialisation in the golden hamster's retina. *J. Comp. Neurol.*, 168, 439-458.

Ueda J., Sawaguchi S., Hanyu T., Yaoeda K., Fukuchi T., Abe H., Ozawa H. (1998) Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jap. J. Ophthalm.*, 42, 337-344.

H. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Goffer
Vorname: Irad
Geburtsdatum / -ort: 08.04.1977, Beer-Sheva, Israel
Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 - 1988: Grundschule in Kiryat Biyalik, Israel
1988 - 1990: Grundschule - in Esch-sur-Alzette, Luxemburg
1990 - 1997: Gymnasium - Lycée des Garçons Esch-sur-Alzette, Luxemburg

Hochschulbildung

01.09-1997 - 15.06.1998: Centre Universitaire Luxembourg, Luxemburg
Studiengang: Humanmedizin
Ab 01.10.1998: Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Studiengang: Humanmedizin
29.03.2000: Ärztliche Vorprüfung
22.03.2001: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03.04.2003: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29.04.2004: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

22.04.2003 - 10.08.2003: Innere Medizin im Centre Hospitalier Universitaire in Pointe-à-Pitre, Frankreich
11.08.2003 - 30.11.2003: Chirurgie im Centre Hospitalier Yverdon Chamblon in Yverdon, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität von Lausanne, Schweiz
01.12.2003 - 21.03.2004: Wahlfach: Radiologie im Rambam Medical Center Haifa, Universitätskrankenhaus der Universität von Haifa, Israel

I. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Solon Thanos, Leiter der Experimentellen Ophthalmologie der Universitäts-Augenklinik Münster, für die Bereitstellung der interessanten Thematik und die ausgezeichnete Betreuung dieser Dissertation. Ich habe sehr von seiner wissenschaftlichen Erfahrung, Diskussionsbereitschaft und Begeisterungsfähigkeit profitiert.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Rita Naskar für die Durchführung der Tonometrie und Beratung bedanken.

Herrn Peter Heiduschka danke ich für seine fachmännische Hilfestellung bei der Erstellung von Tabellen, Graphiken und Bilder.

Frau Mechthild Wissing und Frau Mechthild Langkamp-Flock danke ich für die enge Zusammenarbeit und die engagierte Unterstützung bei meinen durchgeführten Experimenten.

Allen anderen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Dr. Dr. Solon Thanos gilt mein großer Dank für die gute, entspannte und freundliche Zusammenarbeit während dieser Zeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Nico Schneider für die Ermutigung und Unterstützung meiner ersten Schritte auf dem Gebiet der Forschung und für seine scheinbar endlose Geduld, Frau Julia Kramer, Herrn Wladimir Schwarz und Herrn Yves Berna für ihre konstruktive Kritik bei der Durchsicht und Korrektur der Arbeit, Frau Rachel Levy für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und Herrn Mike Dechmann für sein Interesse an meiner Dissertation und für die moralische und logistische Unterstützung.

Letztendlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mir dieses Studium erst ermöglicht haben.