

In-vivo-Imaging retinaler Zellapoptose nach akuter Lichtexposition

Neue diagnostische Verfahren liefern immer genauere Daten über Krankheitsentstehung und pathophysiologische Dysfunktionen, die bis auf die zellulären und biochemische Ebene hinabreichen. Die sog. „molekulare Bildgebung“ zielt auf die In-vivo-Identifikation von organischen und zellulären Fehlfunktion schon vor dem Auftreten der ersten anatomischen Veränderungen [17, 18, 36, 37]. Hiermit erhofft man sich neben neuen Erkenntnissen über pathologische Zusammenhänge auch die Optimierung von therapeutischen Strategien und die frühe Beurteilung über Erfolg bzw. Versagen von Therapien. Gerade das Auge mit seinen einzigartigen optischen Eigenschaften und einfachem Zugang zu tief gelegenen anatomischen Strukturen stellt ein vielversprechendes Organ zur In-vivo-Visualisierung von molekularen Prozessen im Inneren des Körpers dar.

Apoptose steht für „programmierten Zelltod“ und beschreibt ein streng reguliertes zelluläres Suizidprogramm, das einen lebenswichtigen Mechanismus für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus darstellt. Ein weit verbreiteter Apoptosemarker ist das Protein Annexin 5 [4]. In Gegenwart von Ca^{2+} weist dieses Molekül eine hohe Affinität gegenüber Phosphatidylserin auf. Phosphatidylserin, ein anionisches Phospholipid, befindet sich normalerweise auf

der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Bereits in frühen Apoptosestadien und noch vor DNA-Fragmentation und Zellkernkondensierung wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran transloziert und kann so von Annexin 5 gebunden werden. In mehreren Studien wurde Annexin 5 mittels radiologischer Markierung oder Fluoreszenztechniken bereits zur Darstellung von Apoptose sowohl in vivo als auch in vitro angewendet [39, 40].

Die konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie (cSLO) erlaubt die In-vivo-Visualisierung von großen Netzhautarealen bei gleichzeitig hoher Sensitivität und hohem Bildkontrast und so verbesserter Signalauflösung [35]. Somit gelingt mit dieser Technik u. a. auch die Darstellung der Fundusautofluoreszenz, deren Signalintensität im Vergleich zu Fundusreflektion oder Fluoreszeinangiographie um einige Größenordnungen geringer ist und deren Darstellung darüber hinaus auch besonders durch die Eigenfluoreszenz von nichtretinalen Strukturen wie der Linse erschwert wird [3, 34, 16]. In vorangegangenen Arbeiten konnten wir in verschiedenen Tiermodellen die Vorteile der cSLO-Technik in Kombination mit der intravitrealen Gabe von fluoreszierenden Sonden zur molekularen Bildgebung von retinaler Zellapoptose demonstrieren [9, 13, 14]. Diese Technik, die mit dem Akronym DARC (*Detection of Apoptosing Retinal Cells*) bezeichnet wird, ermöglichte die Identifikation von individuellen apoptotischen Zellen in der Ganglienzell-

schicht im Glaukommodell. Vor kurzem konnten wir zusätzlich auch die Entstehung von programmiertem Zelltod in der inneren Körnerschicht nach Laseranwendung im Rattenmodell nachweisen [31]. Dagegen steht ein Nachweis der In-vivo-Darstellung von apoptotischen Prozessen in der äußeren Netzhaut bisher aus.

Die Entstehung von retinaler Apoptose wird bei vielen retinalen Pathologien diskutiert und ist nicht nur auf innere Netzhautschichten limitiert. Histopathologisch konnte u. a. bei Nagern der programmierte Zelltod von Photorezeptorzellen nach akuter Lichtexposition oder in Gegenwart von Mutationen im „retinal degeneration (rd) gene“, „retinal degeneration slow/peripheren (rds) gene“ oder im Rhodopsin nachgewiesen werden [6, 15, 24, 25, 29, 30]. Beim Menschen wurde Apoptose bei Erblindung verursachenden Erkrankungen wie der Retinitis pigmentosa, der altersabhängigen Makuladegeneration, der pathologischen Myopie, der diabetischen Retinopathie und der Netzhautablösung demonstriert [1, 2, 8, 10, 21]. Bei diesen Erkrankungen treten apoptotische Prozesse in mehreren Netzhautschichten auf, einschließlich der Ganglienzellschicht, der inneren und äußeren Körnerzellschicht, im retinalen Pigmentepithel und in der inneren Choroidea [11, 32, 33].

Die akute Exposition bei Nagern mit kurzweiligem Licht stellt ein relativ einfach zugängliches und fest etabliertes Modell zur Untersuchung von Zellapoptose in der äußeren Netzhaut dar [12, 38]. Hier-

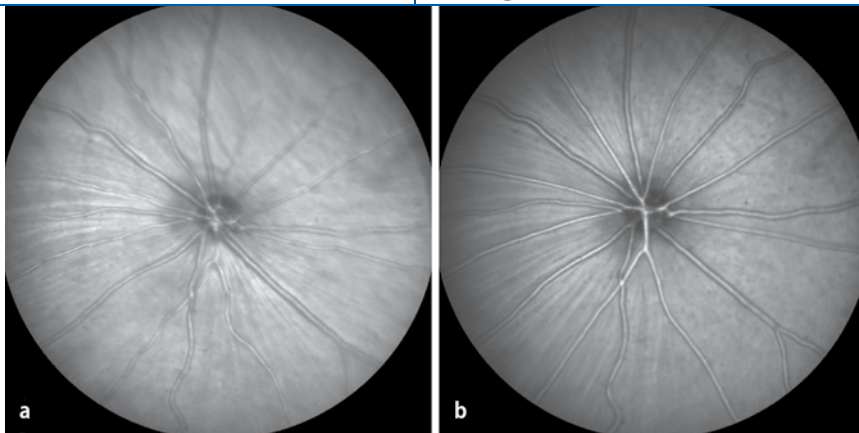


Abb. 1 ▲ In-vivo-Bildgebung mit konfokaler Scanning-Laser-Ophthalmoskopie im Nahinfrarotreflektionsmodus vor (a) und direkt nach (b) 2 h Lichtexposition zeigte keine Netzhautveränderungen

mit konnten einzelne biochemische Stoffwechselwege der Photorezeptorapoptose entschlüsselt sowie die Modulation von apoptotischen Prozessen mit verschiedenen Substanzen demonstriert werden [5, 28]. Weitere Studien weisen daraufhin, dass die Apoptose von Photorezeptoren nach akuter Lichtexposition von der Wellenlänge abhängig ist und durch Rhodopsin vermittelt wird [12]. Diese Untersuchungen basieren alle auf Post-mortem-Analysen und erlauben daher kein Monitoring von apoptotischen Effekten in vivo. Darüber hinaus bleibt unbekannt, wie weit möglicherweise Veränderungen durch intrinsische Aktivität nach Gewebefixierung und Verarbeitung auftreten. Die Visualisierung von Apoptose in vivo und in Echtzeit in der äußeren Netzhaut oder eine detaillierte Untersuchung von apoptotischen Prozessen am lebendigen Auge nach akuter Lichtexposition ist bisher nicht möglich.

Unter Verwendung der DARC-Technik mit fluoreszenzmarkiertem Annexin 5 wird in dieser Studie die Entstehung von retinaler Apoptose am Rattenaugen in vivo untersucht.

Methoden

Tiere

Die Tierversuche erfolgten unter Einhaltung von entsprechenden nationalen (UK Home Office) und internationalen Richtlinien (ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research). Vier adulte männliche, dunkle Agouti-Ratten (Gewicht 200–250 g) wur-

den durch intraperitoneale Injektion mit Ketamin/Domitor-Lösung (37,5%/25%, Pfizer Animal Health, Exton, PA, USA) nach Dunkeladaptation über Nacht anästhesiert (0,2 ml/100 g KG). Die Pupillen wurden mit 2,5% Phenylephrinehydrochlorid und 1,0% Tropicamide (Chauvin Pharmaceuticals Ltd. Surrey, UK) dilatiert. Zur In-vivo-Apoptosedarstellung wurde 5 µl Alexa-Fluor-488-markiertes Annexin 5 nach der kürzlich beschriebenen DARC Technik mittels Mikropumpensystem in den Glaskörperraum appliziert [9, 19].

Lichtexposition

Die akute Lichtexposition erfolgte in Anlehnung an den von Grimm et al. publizierten Versuchsaufbau [12]. Nach Fixierung über eine Bissklemme und Befeuchtung der Kornea mit Augengel (Viscotears, Novartis Pharma Schweiz AG, Bern) wurde das rechte Auge mit blauem Licht über 120 min bestrahlt. Die Lichtexposition erfolgte unter Narkose und unter Aufrechterhalten einer Körpertemperatur von 37 °C, die mit Heizmatte und gleichzeitig rektaler Sonde sichergestellt wurde. Als Lichtquelle diente eine Xenon Bogenreflektor Lampe (175 W; Spektrum 300–700 nm). Zur Erzeugung der blauen Lichtbande wurde ein Bandbreitenfilter (405 nm±5 nm) in den Strahlengang eingesetzt. Die Unterdrückung von ultraviolettem Licht und Infrarotlicht wurde zusätzlich mit einem vorgeschalteten Interferenzfilter sichergestellt. Mittels Fiberoptik (Durchmesser 8 mm) wurde die Lichtstrahlung auf das Rattenaugen ausge-

richtet. Die Lichtintensität, gemessen auf Hornhautlevel, betrug 3,2 mW/cm². Nach Lichtexposition und Unterbrechung der Narkose mit Atipamezol-Lösung (20%, Pfizer Animal Health, Exton, PA; 0,1 ml/100 g KG) wurden die Tiere 24 h in Dunkelheit gehalten.

In-vivo-Imaging

Die In-vivo-Bildgebung wurde mit einem modifizierten konfokalen Laser-Scanning-System durchgeführt (cSLO, Heidelberg Retina Angiograph 2, Heidelberg Engineering, Dossenheim, Germany). Als Lichtquelle dient eine Festkörperlaser ($\lambda=488$ nm) und zur Erzeugung von Fluoreszenzaufnahmen ein Sperrfilter (500–700 nm). Zusätzlich wurden Nahinfrarotreflektionsaufnahmen ($\lambda=830$ nm) angefertigt. Zur Verbesserung des Bildsignals und der Unterdrückung des Hintergrundrauschens wurden jeweils 100 Einzelbilder gemittelt. Aufnahmen (ohne Annexin-5-Injektion) wurden direkt vor und direkt nach Lichtexposition sowie am 1. Tag nach Lichtexposition und unmittelbar nach 24-h-Dunkeladaptation angefertigt. Nach der letzten dieser Aufnahmeserie erfolgte direkt anschließend die intravitreale Gabe von Annexin 5 mittels DARC-Technik. Zwei Stunden nach dieser Injektion wurde im Fluoreszenzmodus die Entwicklung von retinaler Zellapoptose in vivo evaluiert.

Bildanalyse

Mittels Bildverarbeitungssoftware wurde die Verteilung der Pixelwerte innerhalb eines Bildes durch Veränderung der Helligkeit und des Kontrasts optimiert (Adobe Photoshop 7.0, Adobe Systems, Inc, San Jose, CA, USA). Dank der konfokalen Optik ist es möglich, sektionelle Schnitte durch die lebendige Rattennetzhaut zu legen, wobei nVach Schätzung eine Veränderung von 1 Dioptr der konfokalen Optiken des cSLO eine Veränderung der Fokusebene von etwa 20 µm entsprechen [31]. Auch wenn die Tiefenaufklärung des detektierten Signals eingeschränkt ist, erlaubt dieses Vorgehen die Unterscheidung von Nervenfaserschicht, innerer und äußerer Netzhaut im Reflektionsmodus. Bei Vergleich von Reflektionsaufnahmen

und korrespondierenden Fluoreszenzaufnahmen ist so auch die Lokalisation von hyperfluoreszierenden, apoptotischen Zellen innerhalb der Netzhaut mittels DARC-Technik möglich [31]. Die Optiken des hier verwendeten cSLO sind für Nahinfrarotreflektionsaufnahmen optimiert. Im Gegensatz dazu ist die Bildqualität von blauen Reflektionsbildern deutlich durch Spiegelungen, den Tränenfilm und ungleichmäßige Signalausbeute eingeschränkt. Daher werden in dieser Studie Nahinfrarotbilder den blauen Fluoreszenzbildern zur Tiefenlokalisierung des Signals gegenübergestellt. Hierbei ist es zu beachten, dass bei gleicher Fokuseinstellung der Geräteoptiken – bedingt durch die stärkere Brechung von kurzwelligem im Vergleich zu langwelligem Licht – die Fokusebene von Nahinfrarotscans tiefer als die Fokusebene von Fluoreszenzaufnahmen mit blauer Anregungswellenlänge liegt. Bei jedem Versuchstier wurde sowohl zunächst im Nahinfrarotreflektionsmodus als auch im blauen Reflektionsmodus auf die Nervenfaserschicht fokussiert. Der direkte Vergleich der jeweiligen Gerätefokuseinstellungen für die Nervenfaserschicht in beiden Modi erlaubte so die Berechnung eines groben Korrekturfaktors, der anschließend für die Gegenüberstellung von Nahinfrarotreflektionsaufnahmen zu korrespondierenden Fluoreszenzaufnahmen mit blauem Licht herangezogen wurde.

Histologische Untersuchungen

Nach der In-vivo-Bildgebung retinaler Zellapoptose am ersten Tag nach Lichtbestrahlung wurden alle Tiere direkt getötet und die Augen sofort enukleiert. Die Bulbi wurden über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend histologische Schnitte durch die Netzhaut (Dicke 20 µm) mittels Kryostattechnik angefertigt (ausführliche Beschreibung s. [31]). Daraufhin erfolgte bei einigen Präparaten die Anfärbung mit 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, 1:2,500) zur Darstellung von Zellkernen und der besseren Identifikation der einzelnen Netzhautschichten. Alle Schnitte wurden mit einem konfokalen Scanning-Laser-Mikroskop (LSM 510 UV, Zeiss) mit LSM-Software untersucht.

Ophthalmologie 2009 DOI 10.1007/s00347-009-1952-y
© Springer Medizin Verlag 2009

S. Schmitz-Valckenberg · L. Guo · W. Cheung · S.E. Moss · F.W. Fitzke · M.F. Cordeiro
In-vivo-Imaging retinaler Zellapoptose nach akuter Lichtexposition

Zusammenfassung

Hintergrund. Bisher war der Nachweis von retinaler Apoptose in der äußeren Körnerschicht nach akuter Lichtexposition auf histologische Untersuchungen [12] beschränkt. In dieser Studie untersuchen wir, ob programmierter Zelltod mittels der DARC-Technik (Detection-of-Apoptosing-Retinal-Cells-Technik) in vivo dargestellt werden kann.

Methoden. Die Augen von schwarzen Agouti-Ratten wurden mit blauem Licht ($\lambda=405$ nm; 3,2 mW/cm²) über 2 h bestrahlt. In-vivo-Imaging mittels konfokaler Scanning-Laser-Ophthalmoskopie wurde vor und direkt nach Lichtexposition sowie 24 h nach Dunkeladaptation durchgeführt. Anschließend wurde die Entwicklung von retinaler Zellapoptose unter Einsatz der DARC-Technik nach intravitrealer Gabe von fluoreszenzmarkiertem Annexin 5 untersucht.

Ergebnisse. Direkt nach Lichtexposition waren keine pathologischen Veränderungen durch In-vivo-Imaging zu erkennen. Hingegen wurde eine Netzhautverdünnung und

die Entwicklung von retinaler Zellapoptose nach Dunkeladaptation einen Tag später im Bereich des vorher bestrahlten Areals nachgewiesen. Mittels konfokalem Live-Scanning durch die bestrahlte Netzhaut wurden die hyperfluoreszenten apoptotischen Zellen in der äußeren Netzhaut lokalisiert. Histologische Untersuchungen bestätigten die Entwicklung von Photorezeptorapoptose und Zellschäden im Bereich der äußeren Netzhaut.

Diskussion. Die DARC-Technik erlaubt die In-vivo-Darstellung von Photorezeptorzellapoptose in der äußeren Netzhaut. Hiermit eröffnen sich neue, vielsprechende Möglichkeiten zur Untersuchung des programmierten Photorezeptorzelltods, welcher bisher nur post mortem nachgewiesen werden konnte.

Schlüsselwörter

Akuter Lichtschaden · Retinale Zellapoptose · Annexin 5 · Scanning-Laser-Ophthalmoskopie · Molekulare Bildgebung

In vivo imaging of retinal cell apoptosis following acute light exposure

Abstract

Purpose. Outer nuclear apoptosis following acute light exposure has previously only been shown histologically. This study investigated whether in vivo detection with DARC (detection of apoptosing retinal cells) technology could identify cells undergoing apoptosis.

Methods. Acute blue light damage ($\lambda=405$ nm; 3.2 mW/cm²) was applied to eyes of dark Agouti rats over 2 h. In vivo retinal imaging using confocal scanning laser ophthalmoscopy was performed before and directly after light exposure as well as after 24 h of dark adaptation. Development of retinal cell apoptosis was then assessed using intravitreal fluorescent-labeled annexin-5 with DARC technology in vivo.

Results. Directly after light exposure, no pathological retinal changes were observed by in vivo imaging. However, retinal flattening and the development of apoptosis within

the irradiated retina occurred 1 day later and following dark adaptation. Confocal live scanning through the exposed retina revealed hyperfluorescent apoptotic cells at the level of the outer retina. Histological analysis confirmed the occurrence of photoreceptor cell death and the development of cellular damage at the outer retina.

Discussion. This study confirms acute light-induced outer nuclear apoptosis using in vivo DARC technology. This may open new and promising ways to assess programmed cell death of the photoreceptor cells, which – until now – was possible only with postmortem analysis.

Keywords

Acute light damage · Retinal cell apoptosis · Annexin-5 · Scanning laser ophthalmoscopy · Molecular imaging

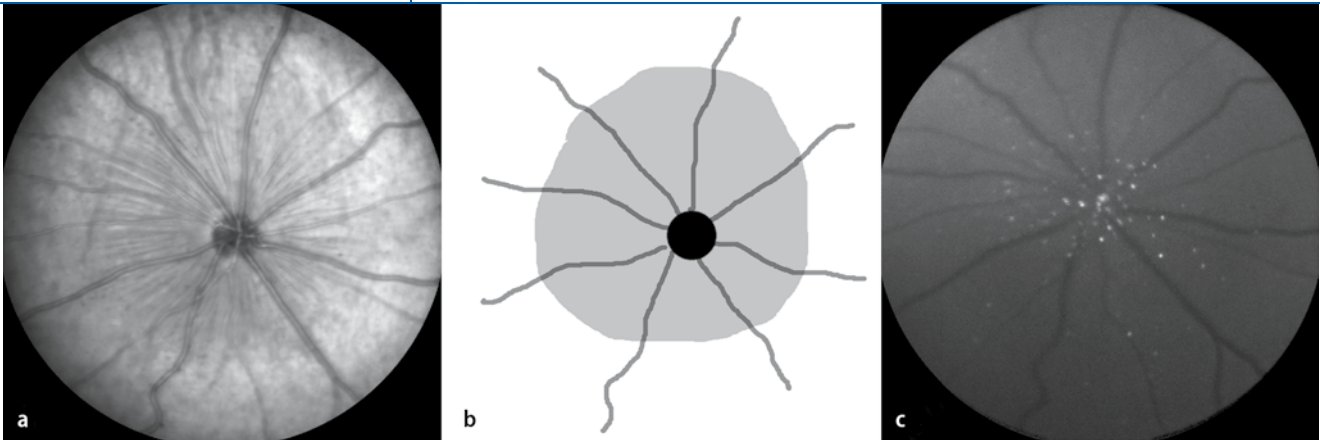


Abb. 2 ▲ Die In-vivo-Bildgebung mit konfokaler Scanning-Laser-Ophthalmoskopie nach 2 h Lichtexposition und nachfolgend 24 h Dunkeladaptation gibt Hinweise auf eine Verdünnung der Netzhaut und Apoptoseentwicklung. Im Nahinfrarotreflektionsmodus (a) ist der Bereich der bestrahlten, zentralen Netzhaut von der peripheren nichtbehandelten Retina deutlich durch das unterschiedliche Reflektionssignal abzugrenzen. Im Bereich der zentralen Netzhaut sind deutlich radiär verlaufende Nervenfasern zu sehen (Fokusebene Nervenfaserschicht). Dagegen zeigt das Signal im Bereich der peripheren Netzhaut das charakteristische Signal der äußeren Netzhautschichten. Die Grenze zur nichtbehandelten Netzhaut ist nochmals im Schema (b) verdeutlicht. Nach intravitrealer Gabe von fluoreszenzmarkiertem Annexin 5 und 2 h später erkennt man im Fluoreszenzmodus, dass die Entwicklung von hyperfluoreszenten apoptotischen Zellen (c) topographisch mit den Veränderungen im Nahinfrarotreflektionsmodus korreliert

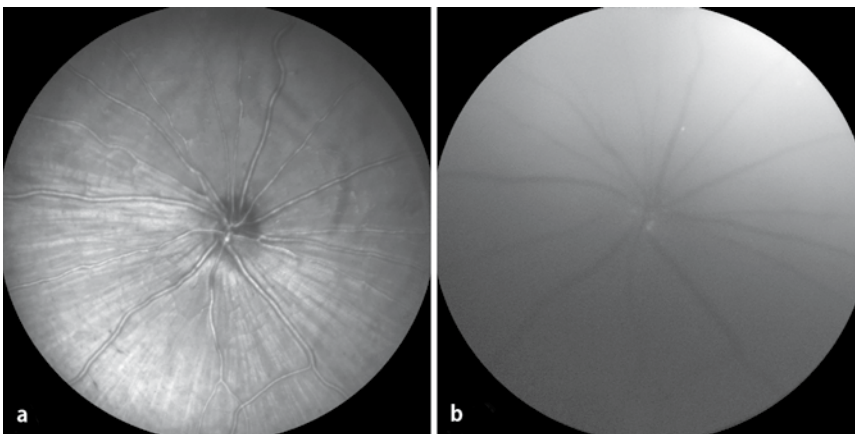


Abb. 3 ▲ Die In-vivo-Bildgebung mit konfokaler Scanning-Laser-Ophthalmoskopie eines Kontrollauges ohne Lichtexposition, aber nach 24 h Dunkeladaptation ergibt keine Hinweise auf Netzhautverdünnung im Nahinfrarotreflektionsmodus (a). Nach intravitrealer Gabe von fluoreszenzmarkiertem Annexin 5 und 2 h später ist ein diffuses Signal im Fluoreszenzmodus (b) zu erkennen, was durch ungebundenes, fluoreszenzmarkiertes Annexin 5 im Glaskörperraum bedingt ist. Hingegen kann bis auf vereinzelt hyperfluoreszente Punkte keine Entwicklung von retinaler Apoptose beobachtet werden

Ergebnisse

In-vivo Bildgebung vor und direkt nach Lichtexposition

Direkt vor und unmittelbar nach akuter Lichtexposition konnten bei allen untersuchten Augen keine Netzhautveränderungen mit In-vivo-cSLO-Imaging festgestellt werden (▣ Abb. 1). Zu beiden Untersuchungszeitpunkten, konnten zwischen den lichtexponierten Augen im Vergleich zu den Kontrollaugen

keine wesentlichen Unterschiede dargestellt werden.

In-vivo-Bildgebung 24 h nach Dunkeladaptation

Nach 24 h Dunkeladaptation und erneuter Narkose konnte eine Netzhautverdünnung bei den behandelnden Augen im Bereich der Lichtexposition festgestellt werden. Zirkulär um den Sehnervenkopf war die Fokusebene der inneren Netzhautschicht nach posterior verlagert. Bei Fo-

kussierung auf die Nervenfaserschicht im Bereich der zentralen Netzhaut lag daher die Bildebene der peripheren Netzhaut in der äußeren Retina, während dagegen bei Fokussierung der peripheren Netzhaut auf die Nervenfaserschicht die Fokusebene der zentralen Netzhaut im Glaskörperraum war. Die leicht unscharfe, ringförmige Grenze zwischen zentraler exponierter und peripher nichtbehandelter Netzhaut war am besten im Nahinfrarotreflektionsmodus zu erkennen (▣ Abb. 2). Bedingt durch dezente Abweichung in der Ausrichtung der Faseroptik und des Hornhautabstands zwischen den einzelnen Augen konnten leichte Unterschiede in Bezug auf Größe und Zentrierung dieser ringförmigen Grenze festgestellt werden. In den Kontrollaugen wurden hingegen keine Veränderungen oder Hinweise auf eine zentrale Netzhautverdünnung beobachtet (▣ Abb. 3).

In-vivo-Bildgebung retinaler Zellapoptose

Nach intravitrealer Gabe von Annexin 5 und weiteren 2 h erfolgte die In-vivo-Bildgebung von retinaler Zellapoptose. Im Bereich der zentralen Netzhaut und innerhalb der im Reflektionsmodus festgestellten Netzhautverdünnung waren hyperfluoreszente, apoptotische Zellen zu erkennen (▣ Abb. 2). Dagegen wurden außer-

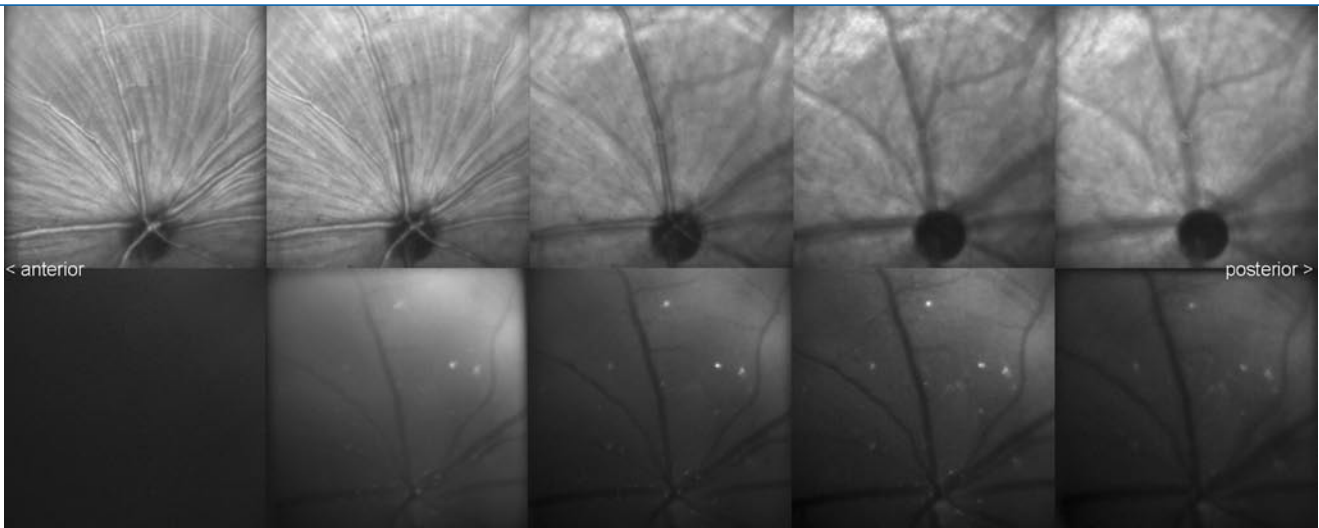


Abb. 4 ▲ Die In-vivo-Tomographie mit konfokaler Scanning-Laser-Ophthalmoskopie nach Lichtexposition, Dunkeladaptation und Annexin-5-Gabe erlaubt die genauere Tiefenauflösung retinaler Zellapoptose. Die Fokussierung auf einzelne Netzhautschichten und die Grenze zur nichtbehandelnden Netzhaut (s. auch [Abb. 2](#)) sind im Nahinfrarotreflektionsmodus (obere Reihe) zu erkennen. Die jeweils korrespondierenden Fluoreszenzaufnahmen (untere Reihe) demonstrieren, dass das maximale Signal für hyperfluoreszente apoptotische Zellen in der äußeren Netzhaut lokalisiert ist. Bei der Anordnung der Bildpaare von Reflektions- und Fluoreszenzbildern wurde die Brechung der unterschiedlichen Anregungswellenlängen berücksichtigt. Der Abstand zur Fokalebene des Nachbarbildpaars ist etwa jeweils gleich

halb der lichtexponierten Netzhaut und bei den Kontrolleaugen keine oder vereinzelt (<5 pro Bildausschnitt) hyperfluoreszente Punkte beobachtet ([Abb. 3](#)).

Das konfokale Live-Scanning durch die bestrahlte Netzhaut bei den behandelten Augen erlaubte eine genauere Tiefenauflösung der retinalen Zellapoptose ([Abb. 4](#)). Im anterioren Bereich – auf der Ebene der Nervenfaserschicht – wurden keine hyperfluoreszenten Punkte nachgewiesen. Hinweise für apoptotische Zellen zeigten sich erst in den tieferen Netzhautschichten. Diese deutlich abgrenzbaren hyperfluoreszente Punkte waren mit maximaler Intensität in der äußeren Netzhaut darstellbar.

Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen konnten keine Veränderungen in der Zellmorphologie der inneren Netzhautschichten feststellen. Dagegen waren – vereinbar mit den In-vivo-Ergebnisse – bereits deutliche Schäden in der äußeren Netzhaut im Bereich der bestrahlten Retina zu beobachten. In der äußeren Körnerschicht war eine Auflockerung mit teilweise Zellkernverlust der Photorezeptoren, aber keine wesentliche Dickenabnahme im Vergleich zu Kontrollaugen zu sehen. Im Bereich der ursprünglichen Photorezeptorinnen-

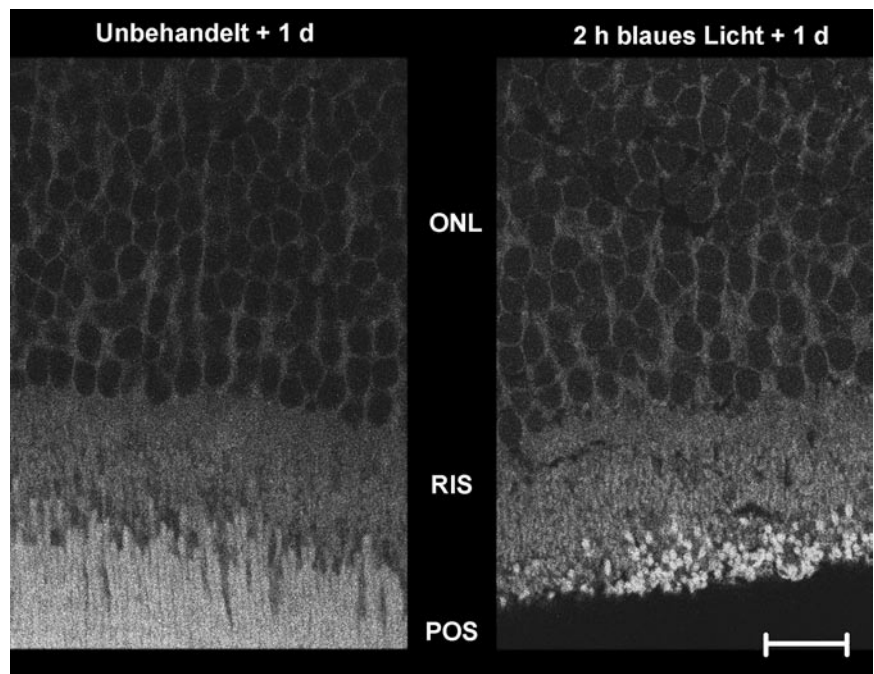


Abb. 5 ▲ Die histologische Querschnittsuntersuchung 1 Tag nach Lichtexposition zeigt Veränderungen der äußeren neurosensorischen Netzhaut der lichtexponierten Augen (links) im Vergleich zu den nichtbehandelnden Partneraugen (rechts). Im Bereich der äußeren Körnerschicht (ONL) ist ein Zellkernverlust aber ohne wesentliche Abnahme der Schichtdicke zu erkennen. Die normale Morphologie der Innensegmente (RIS) der Photorezeptoren ist aufgehoben. Weiterhin zeigt sich ein fast kompletter Verlust der Außensegmente (POS) mit Abhebung der neurosensorischen Netzhaut (Maßstab 10 µm)

segmente zeigte sich amorphes Material, Substanzverlust und eine fast vollständige Zerstörung der Zellstrukturen. Weiterhin zeigte sich ein fast kompletter Verlust der

Außensegmente (POS) mit Abhebung der neurosensorischen Netzhaut.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte anhand der histologischen Querschnitte

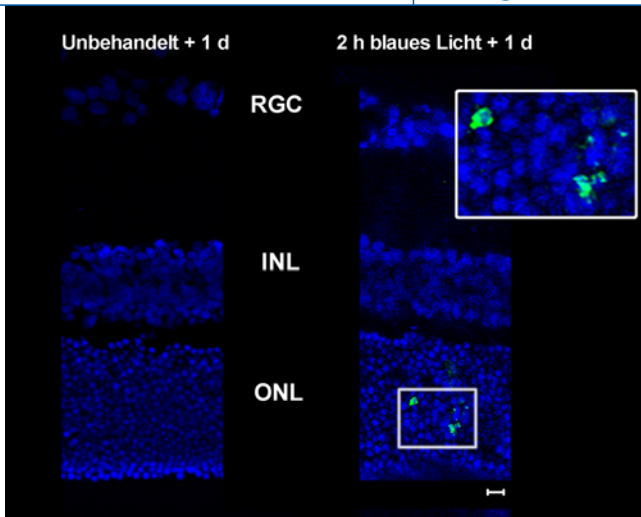


Abb. 6 ▲ Die histopathologische Querschnittsuntersuchung 1 Tag nach Lichtexposition mittels Fluoreszenzmikroskopie demonstriert die Anreicherung von fluoreszenzmarkiertem Annexin 5 (grün) in der äußeren Körnerschicht. Im Kontrollauge ist dagegen keine Anreicherung von Annexin 5 zu erkennen (Maßstab 10 µm). Zur Verdeutlichung der einzelnen Netzhautschichten (RGC Ganglienzellen, INL innere Körnerschicht, ONL äußere Körnerschicht) wurden Zellkerne mit DAPI-Färbung (blau) markiert. Hier erkennt man bei hoher Vergrößerung im Bereich der äußeren Körnerschicht die Kokalisation von Annexin-5-positivem Material um Zellkerne

auch die Verteilung Annexin-5-positiver Zellen untersucht werden. Hier konnten im Bereich der äußeren Körnerschicht vereinzelt hyperfluoreszente Punkte mit Kokalisation zu Zellkernen nachgewiesen werden (■ **Abb. 6**). Hingegen war keine Bindung von Annexin 5 in den inneren Netzhautschichten zu erkennen.

Diskussion

In dieser Studie gelingt erstmalig die In-vivo-Visualisierung von individueller Zellapoptose in der äußeren Netzhaut. Bisher wurde die DARC-Technik zur Untersuchung von programmiertem Zelltod in der Ganglienzellschicht und inneren Körnerschicht im Glaukommodell und nach Laseranwendung verwendet [9, 31].

Weiterhin wird gezeigt, dass mittels cSLO eine Tiefenauflösung der Apoptoseentstehung innerhalb der Netzhaut möglich ist.

Schädliche Effekte durch retinale Lichtexposition und resultierende toxische Mechanismen wurden in der Vergangenheit in zahlreichen Studien untersucht [23, 38]. Die akute Lichtexposition im blauen Wellenbereich führt durch photochemische Prozesse im Rhodopsinstoffwechsel zur Schädigung der äußeren Netzhaut [12]. Unter Verwendung eines etablierten Mo-

dells werden in der vorliegenden Studie diese Post-mortem-Analysen bestätigt, indem apoptotische Prozesse in der äußeren Körnerschicht mit ähnlichen Parametern (Wellenlänge, Lichtintensität) hervorgerufen werden [12]. Weiterhin stimmen die Ergebnisse mit anderen Studien hinsichtlich der Darstellung von Netzhautschäden erst 24 h nach Lichtexposition und gleichzeitiger Dunkeladaptation überein [22, 23, 29]. Die charakteristischen beobachteten Veränderungen in der äußeren Retina sind auch im Einklang mit Ex-vivo-Studien zu Netzhautschäden nach akuter Lichtexposition, einschließlich Auflockerung und teilweise Zellkernverlust der Photorezeptoren und das Vorkommen von amorphem Material und Substanzverlust bei Außen- und Innensegmenten. Im Gegensatz zu der Mehrzahl der vorangegangenen Untersuchungen wurden allerdings keine Albinotiere verwendet, für die niedrigere Lichtintensitäten zur Erzeugung von toxischen Effekten gezeigt worden sind [26, 27]. Der In-vivo-Nachweis von beginnender retinaler Zellapoptose auch bei pigmentierten Tieren mit vergleichbaren Parametern unterstreicht die kürzlich diskutierten Bedenken hinsichtlich etablierter Sicherheitsstandards. So konnten Cideciyan et al. akute Netzhautschäden nach Anwendung von moderaten Lichtintensi-

täten in einem Hundemodell zur Retinitis pigmentosa demonstrieren [7]. Weiterhin konnten kürzlich Morgan et al. toxische Effekte auf der Ebene des retinalen Pigmentepithels nach hochauflösenden Netzhautaufnahmen mit einem „adaptive optics cSLO“ am Affen zeigen [20]. Hierbei lagen die verwendeten Lichtintensitäten unter bzw. in der Nähe von etablierten Sicherheitslevels. Im Hinblick der anhaltenden Diskussionen hinsichtlich eines möglichen Einflusses von erhöhter Lichtexposition auf die Entstehung und das Fortschreiten von bekannten retinalen Erkrankungen wie Netzhautdystrophien oder der altersabhängigen Makuladegeneration erscheinen genauere Untersuchungsmethoden zur Identifikation von Frühschäden erforderlich. Auch sind bessere Kenntnisse über Grenzwerte zur Erzeugung von Netzhautschäden für augenärztliche Untersuchungsmethoden und intraokuläre Eingriffe essenziell, um mögliche Risiken zu minimieren. Hier könnte die In-vivo-Detektion von zellulärer Apoptose mittels DARC-Technik einen wichtigen Beitrag leisten.

Die Möglichkeit einer zusätzlichen geringen Markierung von Annexin 5 an nekrotische Zellen wurde in der Vergangenheit mehrfach diskutiert, besonders im Hinblick auf eine daraus resultierende limitierte Aussagekraft hinsichtlich der Apoptosedetektion von Annexin 5 [4]. Eine teilweise Bindung an nekrotische Netzhautzellen kann auch in dieser Arbeit nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dagegen sprechen aber der zeitliche Verlauf der Entstehung von hyperfluoreszenten Punkten und die Verwendung eines etablierten Modells zur Induktion von Photorezeptorapoptose.

Neben der In-vivo-Darstellung von apoptotischen Prozessen kann in dieser Studie auch erstmals eine Netzhautverdünnung durch akute Lichtexposition bereits direkt am lebendigen Auge im Reflektionsmodus demonstriert werden. Dies unterstreicht zusätzlich die potenziellen Möglichkeiten von hochauflösender In-vivo-Diagnostik und könnte für zukünftige Untersuchungen von Netzhautschäden und Therapieeffekten hilfreich sein. Im Gegensatz zu Post-mortem-Analysen ist hier die Untersuchung von strukturellen Veränderungen und zellulären Pro-

zessen am lebendigen Organismus nicht nur direkt in Echtzeit möglich, sondern kann auch am gleichen Tier über Stunden oder Tage beobachtet werden. Hiermit könnte auch die erforderliche Anzahl von Tieren reduziert werden.

Fazit für die Praxis

In dieser Studie gelingt erstmalig die In-vivo-Visualisierung von individueller Zellapoptose in der äußeren Netzhaut und eine Netzhautverdünnung nach akuter Lichtexposition. Bisher wurde die DARC-Technik zur Untersuchung von programmiertem Zelltod in der Ganglienzellschicht und inneren Körnerzellschicht im Glaukommodell sowie nach Laseranwendung verwendet. Die Möglichkeit der In-vivo-Darstellung von einzelnen, apoptotischen Zellen in der äußeren Netzhaut eröffnet neue, vielsprechende Möglichkeiten zu einem besseren Verständnis der dynamischen apoptotischen Prozesse von Photorezeptoren und könnte auch zur Evaluierung von Therapieeffekten von Bedeutung sein.

Korrespondenzadresse

Dr. S. Schmitz-Valckenberg

Universitäts-Augenklinik Bonn

Ernst-Abbe-Str. 2, 53127 Bonn

steffen.schmitz-valckenberg@ukb.uni-bonn.de

Danksagung. Die Autoren danken Dr. Anthony Vugler, Dr. Carlos Gias und Vy Luong für wissenschaftliche und technische Unterstützung.

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Arroyo JG, Yang L, Bula D, Chen DF (2005) Photoreceptor apoptosis in human retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 139:605–610
2. Barber AJ, Lieth E, Khin SA et al (1998) Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 102:783–791
3. Bellmann C, Holz FG, Schapp O et al (1997) Topography of fundus autofluorescence with a new confocal scanning laser ophthalmoscope. *Ophthalmologie* 94:385–391
4. Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM et al (2005) Past, present and future of annexin A5: From protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 46:2035–2050
5. Bush RA, Reme CE, Malnoe A (1991) Light damage in the rat retina: The effect of dietary deprivation of N-3 fatty acids on acute structural alterations. *Exp Eye Res* 53:741–752
6. Chang GQ, Hao Y, Wong F (1993) Apoptosis: Final common pathway of photoreceptor death in rd, rds and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 11:595–605
7. Cideciyan AV, Swider M, Aleman TS et al (2005) ABCA4-associated retinal degenerations spare structure and function of the human parapapillary retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:4739–4746
8. Cook B, Lewis GP, Fisher SK, Adler R (1995) Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:990–996
9. Cordeiro MF, Guo L, Luong V et al (2004) Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13352–13356
10. Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, Milam AH (2002) The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 120:1435–1442
11. Ferrington DA, Tran TN, Lew KL et al (2006) Different death stimuli evoke apoptosis via multiple pathways in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 83:638–650
12. Grimm C, Wenzel A, Williams T et al (2001) Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: Effect of photoreversal of bleaching. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:497–505
13. Guo L, Salt TE, Maass A et al (2006) Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:626–633
14. Guo L, Salt TE, Luong V et al (2007) Targeting amyloid- β in glaucoma treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13444–13449
15. Harada T, Harada C, Nakayama N et al (2000) Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron* 26:533–541
16. Holz FG, Schmitz-Valckenberg S, Spaide RF, Bird AC (2007) Atlas of fundus autofluorescence imaging. Springer, Berlin
17. Kerr JN, Denk W (2008) Imaging in vivo: Watching the brain in action. *Nat Rev Neurosci* 9:195–205
18. Luker GD, Luker KE (2008) Optical imaging: Current applications and future directions. *J Nucl Med* 49:1–4
19. Maass A, Lundt von Leithner P, Luong V et al (2007) Assessment of rat and mouse RGC apoptosis imaging in-vivo with different scanning laser ophthalmoscopes. *Curr Eye Res* 32:851–861
20. Morgan JJ, Hunter JJ, Masella B et al (2008) Light-induced retinal changes observed using high-resolution autofluorescence imaging of the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3715–3729
21. Nakazawa T, Hisatomi T, Nakazawa C et al (2007) Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2425–2430
22. Noell WK (1980) Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes. *Vision Res* 20:1163–1171
23. Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S (1966) Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 5:450–473
24. Perche O, Doly M, Ranchon-Cole I (2007) Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2753–2759
25. Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R (1994) Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:974–978
26. Rapp LM, Williams TP (1979) Damage to the albino rat retina produced by low intensity light. *Photochem Photobiol* 29:731–733
27. Rapp LM, Williams TP (1980) The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage. *Vision Res* 20:1127–1131
28. Reme C, Federspiel-Eisenring E, Hoppeler T et al (1988) Chronic lithium damages the rat retina, acute light exposure potentiates the effect. *Clin Vision Sci* 3:157–172
29. Reme CE, Grimm C, Hafezi F et al (1998) Apoptotic cell death in retinal degenerations. *Prog Retin Eye Res* 17:443–464
30. Sanges D, Comitato A, Tammaro R, Marigo V (2006) Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17366–17371
31. Schmitz-Valckenberg S, Guo L, Maass A et al (2008) Real-time in-vivo imaging of retinal cell apoptosis after laser exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2773–2780
32. Sparrow JR, Nakanishi K, Parish CA (2000) The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1981–1989
33. Suter M, Reme C, Grimm C et al (2000) Age-related macular degeneration. The lipofuscin component N-retinyl-N-retinylidene ethanalamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 275:39625–39630
34. von Ruckmann A, Fitzke FW, Bird AC (1995) Distribution of fundus autofluorescence with a scanning laser ophthalmoscope. *Br J Ophthalmol* 79:407–412
35. Webb RH, Hughes GW, Delori FC (1987) Confocal scanning laser ophthalmoscope. *Appl Opt* 26:1492–1499
36. Weber WA, Grosu AL, Czernin J (2008) Technology insight: Advances in molecular imaging and an appraisal of PET/CT scanning. *Nat Clin Pract Oncol* 5:160–170
37. Weissleder R (1999) Molecular imaging: Exploring the next frontier. *Radiology* 212:609–614
38. Wenzel A, Grimm C, Samarzija M, Reme CE (2005) Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 24:275–306
39. Zhao M, Beauregard DA, Loizou L et al (2007) Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent. *Nature Med* 7:1241–1244
40. Blankenberg FG, Strauss HW (2001) Will imaging of apoptosis play a role in clinical care? A tale of mice and men. *Apoptosis* 6:117–123