

Aus der Forschungsstelle für Experimentelle Ophthalmologie  
der Augenlinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

„Biologische Verträglichkeit von Implantatmaterialien  
für Netzhautzellen *in vitro*“

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Bianca Ulrich

Gießen 2000



Aus der Forschungsstelle für Experimentelle Ophthalmologie  
der Augenklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Betreuer : Prof. Dr. med. Eberhart Zrenner / PD Dr. Elke Günther

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Martin Diener

„Biologische Verträglichkeit von Implantatmaterialien  
für Netzhautzellen *in vitro*“

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Bianca Ulrich  
Tierärztin aus Neuhausen a.d.F.

Gießen 2000

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan : Prof. Dr. Dr. h.c. Hartwig Bostedt

1. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Eberhart Zrenner

2. Berichterstatter : Prof. Dr. Martin Diener

Tag der mündlichen Prüfung : 01.02.2000

---

## INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG .....	1
1.1 Netzhautdegenerationen .....	1
1.2 Histologischer Aufbau der Netzhaut .....	3
1.3 Aufbau und Wirkungsweise eines Mikrophotodioden-Arrays .....	6
1.4 Biokompatibilität und retinale Zellkultur als in-vitro-Modell.....	8
1.5 Zelltypspezifizierung mittels Immuncytochemie .....	9
1.6 Hemmung der Gliaproliferation durch den Mitosehemmer Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) .....	10
2. MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1 Primärkultur retinaler Zellen .....	12
2.1.1. Vorbereitung .....	12
2.1.2 Lösungen und Medien für die Präparation .....	12
2.1.3 Präparation der retinalen Zellkultur.....	13
2.1.4 Aufrechterhaltung der retinalen Zellkultur.....	14
2.2 Fixation und Sichtbarmachung der retinalen Zellen.....	14
2.2.1 Lösungen und Farbstoffe .....	14
2.2.2 Fixation .....	15
2.2.3 Anfärbung der retinalen Zellen.....	15
2.3 Immuncytochemie .....	16
2.3.1 Lösungen und Antikörper .....	16
2.3.2 Immuncytochemische Sichtbarmachung.....	17
2.4 Verwendete Mikrophotodioden-Arrays (MPDAs) und Einzelwerkstoffe.....	18
2.5 Hemmung der Gliaproliferation .....	18
2.6 Erfassung und Auswertung der Daten .....	19

---

3. ERGEBNISSE.....	20
3.1 Adhäsion retinaler Einzelzellen in vitro .....	20
3.1.1 Unterscheidung von Glia- und Nervenzellen.....	20
3.1.2 Adhäsion retinaler Zellen auf Deckgläschen über den Zeitraum von 28 Tagen .....	23
3.2 Evaluierung der Adhäsion retinaler Zellen auf Mikrophotodioden-Arrays (MPDAs) und deren Einzelwerkstoffen .....	23
3.2.1 Adhäsion retinaler Zellen auf den Einzelwerkstoffen Siliziumdioxid (SiO <sub>2</sub> ), Siliziumnitrid (Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> ) und Polyimid.....	23
3.2.2 Adhäsion retinaler Zellen auf den Einzelwerkstoffen Iridium (Ir) und Titanitrid (TiN).....	27
3.2.3 Adhäsion retinaler Zellen auf amorphen und intrinsischen Silizium und Photolack .....	30
3.2.4 Adhäsion retinaler Zellen auf den Mikrophotodioden-Arrays .....	30
3.2.5 Wirkung von Titanitrid (TiN) und Siliziumnitrid (Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> ) auf die Adhäsion retinaler Zellen auf Deckgläschen (Kontrolle).....	32
3.2.6 Adhäsion retinaler Zellen auf Titanitrid (TiN) mit kovalent gebundenem Poly-L-Lysin (PLL).....	33
3.3 Zelltypspezifizierung der adhärierenden Zellen .....	35
3.3.1 Adhäsion Anti-Gamma-Aminobuttersäure (GABA) markierter Zellen auf Titanitrid (TiN) und Iridium (Ir).....	36
3.3.2 Adhäsion Anti-Calretinin markierter Zellen auf Titanitrid (TiN) und Iridium (Ir) .....	37
3.4 Konzentrationsabhängige Hemmung der Gliazellproliferation durch Zugabe von Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) in die Poly-L-Lysin-Beschichtung .....	38

---

4. DISKUSSION.....	41
4.1 Biokompatibilität der Einzelwerkstoffe.....	41
4.1.1 Siliziumdioxid (SiO <sub>2</sub> ) und Siliziumnitrid (Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> ).....	41
4.1.2 Polyimid .....	42
4.1.3 Iridium (Ir).....	42
4.1.4 Titannitrid (TiN).....	43
4.2 Biokompatibilität der Mikrophotodioden-Arrays (MPDAs).....	45
4.3 Immuncytochemische Spezifizierung retinaler Zellen und Anteile der Zelltypen in der Netzhaut .....	46
4.4 Wirkung des Mitosehemmers Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) auf die Gliaproliferation und die Lebensfähigkeit der Nervenzellen.....	49
4.5 Ausblick.....	50
5. ZUSAMMENFASSUNG .....	52
6. SUMMARY.....	54
7. LITERATURVERZEICHNIS .....	56
8. DANKSAGUNG .....	64

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ARAC	Arabinosylecytosin-Hydrochlorid
Au	Gold
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol-2HCl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrixproteine
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoroisothiocyanat
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-Ethansulfonsäure)
IMS	Institut für Mikroelektronik Stuttgart
Ir	Iridium
MEM+I+S	Minimal Essential Medium mit Insulin und Serum
MEM-HEPES	Minimal Essential Medium mit HEPES
MPDA	Mikrophotodioden-Array
NMI	Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut Reutlingen
PBS-CMF	Phosphat-gepufferte Salzlösung, Ca- und Mg-frei
PBS-CMF-BSA	Phosphat-gepufferte Salzlösung, Ca- und Mg-frei mit Bovinem Serumalbumin
PBS-NGS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, Ca- und Mg-frei mit Ziegenserum
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	Siliziumnitrid
SiO <sub>2</sub>	Siliziumdioxid
SSS	Standard Salzlösung
TiN	Titannitrid
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
$\bar{x} \pm SD$	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung
ZNS	Zentralnervensystem



## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Netzhautdegenerationen

Degenerationen der Netzhaut beim Menschen werden u.a. durch die Retinitis pigmentosa und die altersbedingte Maculadegeneration verursacht.

#### *Retinitis pigmentosa*

Retinitis pigmentosa ist die Bezeichnung für eine Gruppe von erblich bedingten Augenerkrankungen, die eine Zerstörung der Photorezeptoren zur Folge haben. Je nach Erkrankungsform treten erste Symptome im Jugendalter oder in den mittleren Lebensjahren auf und enden nach schleichendem Verlauf mit vollständiger Erblindung. Es sind immer beide Augen gleichermaßen betroffen. Durch den Verlust zunächst der Stäbchen, später auch der Zapfen kommt es zur Einengung und Ausfällen des Gesichtsfeldes (Tunnelblick), gestörtem Dämmerungssehen und Nachtblindheit, Störungen des Farben- und Kontrastsehens und Blendungsempfindlichkeit. Neben der primären Retinitis pigmentosa werden noch weitere Unterformen unterschieden. Bei der assoziierte Retinitis pigmentosa weisen neben dem Auge auch andere Organe Krankheitssymptome auf, z.B. beim Usher-Syndrom tritt die Retinitis pigmentosa mit einer angeborenen Hörschädigung auf. Von Pseudo-Retinitis pigmentosa spricht man, wenn nicht erblich erworbene Ursachen, z.B. Entzündungen oder Vergiftungen zur Symptomatik der Retinitis pigmentosa führen. Außerdem kommen sehr seltene, aber behandelbare Sonderformen der Retinitis pigmentosa vor, die auf einem Stoffwechseldefekt zurückzuführen sind, z.B. Atrophia gyrata, Bassen-Kornzweig-Syndrom.

Man unterscheidet drei Vererbungsformen : autosomal-dominant (ca.25% aller Retinitis pigmentosa -Fälle), autosomal-rezessiv (ca.20%), x-chromosomal-rezessiv (ca.8%), in 47 % der Fälle ist keine Heredität nachweisbar (Zrenner et al, 1995).

#### *Altersbedingte Maculadegeneration*

Die Maculadegeneration ist altersbedingt und führt nicht zur völligen Erblindung, da die Photorezeptoren nur im Bereich der Macula durch Verminderung der Stoffwechselprozesse degenerieren. Allerdings treten je nach Fortschreitungsgrad erhebliche Sehbeeinträchtigungen auf, so daß teilweise nur noch schemenhafte Umrisse erkannt werden können.

Bisher ist die Retinitis pigmentosa und die altersbedingte Maculadegeneration nicht therapierbar. Neben medikamentösen Therapieansätzen, z.B. Vitamin A (Berson et al, 1993), wird auch der Ersatz des Gewebes durch Transplantation (Bergstrom et al, 1992; Schuschereba & Silverman, 1992; Adolph et al, 1994; Seiler et al, 1995; Lund et al, 1997), der Ersatz defekter Gene (Jones et al, 1993; Li et al, 1993) oder der körpereigenen Mechanismen durch eine Neuroprothese in subretinaler (Chow & Chow, 1997; Zrenner et al, 1997; Peyman et al, 1998) oder epiretinaler Position (Eckmiller, 1997) angestrebt.

Im Rahmen des Verbundprojektes „Subretinale Netzhautimplantate: Mikrophotodioden zur Wiederherstellung des Sehens bei Netzhautdegenerationen“ werden Implantate in Form einer Matrix hochempfindlicher Mikrophotodioden mit extrazellulären Elektroden entwickelt. Nach Implantation zwischen Pigmentepithel und Netzhaut in den subretinalen Spalt soll das einfallende Licht in elektrische Impulse umgewandelt und diese über Elektroden an die intakten Nervenzellen weitergeleitet werden. Diese Impulsübermittlung ist abhängig von der unmittelbaren Anbindung der Nervenzellen an die Elektroden.

## 1.2 Histologischer Aufbau der Netzhaut

Der Aufbau der Netzhaut ist bei den Wirbeltieren sehr ähnlich. Die Netzhaut läßt sich in die lichtempfindliche Pars optica und die optisch nicht reizbare Pars caeca, welche Ziliarkörper und Iris an ihrer inneren Oberfläche überzieht, einteilen. Die Pars optica kleidet den Augenhintergrund von der Ora serrata bis zum blinden Fleck, Discus n. optici, aus und wird in ihrer gesamten Ausdehnung von der Aderhaut, Chorioidea, unterlagert. Die Abb. 1.1 zeigt in schematischer Darstellung den histologischen Aufbau der Netzhaut. Das der Aderhaut anliegende Pigmentepithel schiebt Plasmafortsätze zwischen die Außensegmente der Photorezeptoren. Die Außen- und Innensegmente bilden die Photorezeptorschicht, die Zellkörper der zwei Photorezeptortypen -Stäbchen und Zapfen- bilden die äußere Körnerschicht. Die äußere retikuläre Schicht wird von den Neuriten der Photorezeptoren und den Dendriten der nachgeschalteten Bipolar- und Horizontalzellen gebildet. Deren Zellkörper und die der Amakrinzellen werden als innere Körnerschicht bezeichnet. Die Neuriten der Bipolar- und der Amakrinzellen verästeln als innere retikuläre Schicht und übertragen ihre Signale auf die Dendriten der Ganglienzellen, deren Zellkörper die Ganglienzellschicht bilden. Die Neuriten der Ganglienzellen ziehen als Nervenfaserschicht aus dem gesamten Bereich der Pars optica zum Discus n. optici und bilden nach dem Durchtritt durch die Lamina cribrosa den Sehnerv. Neben den Nervenzellen befinden sich in der Netzhaut Stützzellen, sogenannte Gliazellen. Die Müllerschen Gliazellen haben mit den Nervenzellen gemeinsame neuroectodermale Vorläuferzellen und durchziehen vertikal die gesamte Netzhaut. Ihre Zellkörper liegen im mittleren Bereich der inneren Körnerschicht und mit ihren Fortsätzen bilden sie die begrenzenden Membranen. Die äußere begrenzende Membran liegt zwischen Pigmentepithel und Photorezeptoren und die innere begrenzende Membran grenzt die Netzhaut zum Glaskörper hin ab. Die Astrocyten wandern am Ende der embryonalen Entwicklung über den Sehnerv in die Netzhaut ein und sind nur in der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht zu finden. Die als Mikroglia bezeichneten Zellen sind mesodermalen Ursprungs, kommen nur vereinzelt vor und werden den mononukleären Makrophagen zugeteilt.

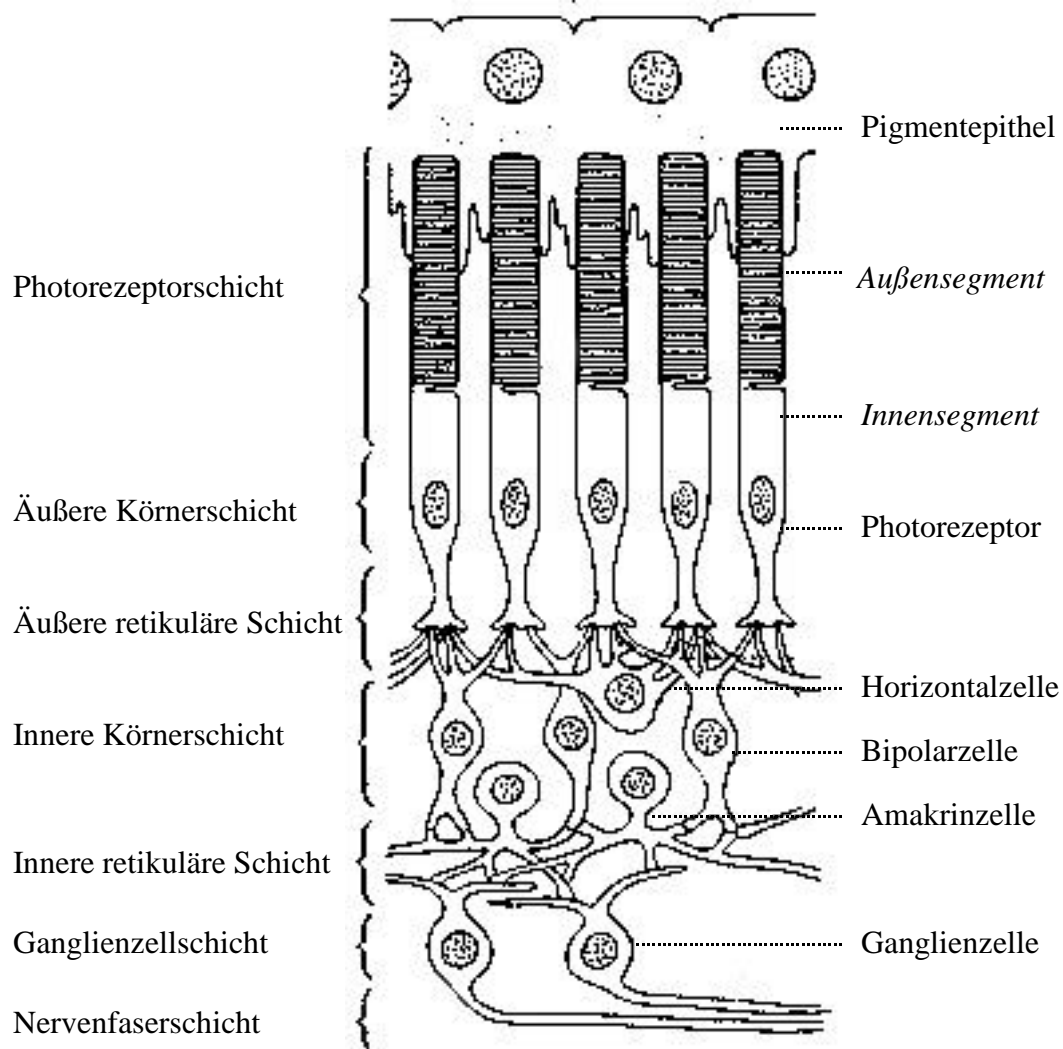


Abb. 1.1 : Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der Säugetiernetzhaut (modifiziert nach Dowling aus Benninghoff)

---

Das Pigmentepithel ist, neben seiner lichtabsorbierenden und nutritiven Funktion, für den Abtransport von Stoffwechsel- und Abstoßungsprodukten zuständig. Die Photorezeptoren wandeln den Lichtstimulus in einen elektrischen Reiz um, der dann über die nachgeschalteten Nervenzellen bis in das Gehirn weitergeleitet wird. Dabei sind die Stäbchen für das Dämmerungssehen, die Zapfen für das Farbsehen zuständig. Die Bipolarzellen leiten den Reiz vertikal an die Ganglienzellen weiter, die Horizontalzellen und Amakrinzellen bilden die Querverschaltungen. Morphologisch, biochemisch, elektrophysiologisch und funktionell lassen sich die einzelnen Zelltypen in weitere Subtypen einteilen, so daß man neben den verschiedenen Photorezeptortypen mindestens vier Bipolarzelltypen, zwei Horizontalzelltypen, 10-12 Amakrinzelltypen und drei Ganglienzelltypen unterscheidet. Aufgrund der Vielzahl der Zelltypen und deren komplexen Verschaltung findet bereits ein beträchtlicher Teil der Reizverarbeitung im visuellen System auf der Netzhautebene statt.

### 1.3 Aufbau und Wirkungsweise eines Mikrophotodioden-Arrays

Die Prototypen der Mikrophotodioden-Arrays (MPDAs) wurden im Institut für Mikroelektronik (IMS) in Stuttgart entwickelt und hergestellt. Sie haben eine Größe von 3 mm im Durchmesser, sind 50  $\mu\text{m}$  dick und tragen 7600 Mikrophotodioden von  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ . Die Dichte der Mikrophotodioden entspricht der Dichte der Photorezeptoren an der Netzhautperipherie. Am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI) in Reutlingen wurde jeder Mikrophotodiode eine Elektrode aufgesetzt. Sie bestehen aus Gold (Au), Iridium (Ir) oder Titanitrid (TiN) und haben eine Größe von  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ . Diese Elektroden sollen die Nervenzellen stimulieren. Die Oberfläche der MPDAs ist mit  $\text{SiO}_2$  oder  $\text{Si}_3\text{N}_4$  überzogen. Diese Materialien sind lichtdurchlässig und haben gleichzeitig isolierende Funktion. Die Mikrophotodioden bestehen aus Silizium und können so dotiert werden, daß sie entweder einen positiven oder einen negativen Stromfluß liefern, um entweder „on“- oder „off“-Nervenzellen reizen zu können. In der zweiten Generation von MPDAs wurden alternierend positiv und negativ dotierte Mikrophotodioden angeordnet, um so eine selektive Stimulierung von „light-on“- und „light-off“-Bipolarzellen erreichen zu können. Die dritte Generation von MPDAs soll in Form einer Netzstruktur die nötige Flexibilität erhalten, um eine physiologischen Lage im subretinalen Spalt zu erreichen und die nutritive Versorgung des Nervenzellgewebes durch das Pigmentepithel zu gewährleisten.

Nach Implantation in den subretinalen Spalt befindet sich das MPDA an der physiologischen Position der Photorezeptoren (s.a. Abb. 1.2). Das einfallende Licht wird von den Mikrophotodioden in einen elektrischen Impuls umgewandelt, der über die Elektroden an die Nervenzellen weitergeleitet werden soll. Das Netzwerk der den Photorezeptoren nachgeschalteten Nervenzellen (Bipolar-, Horizontal-, Amakrin-, und Ganglienzellen) gewährleistet eine Vorverarbeitung des Reizes, bevor die eigentliche Verarbeitung im Gehirn zum Seheindruck stattfindet. Diese Vorverarbeitung kann bei der subretinalen Positionierung ausgenutzt werden. Außerdem werden nicht-degenerierte Photorezeptoren durch das MPDA nicht abgedeckt und können ihre Funktion weiterhin wahrnehmen.

Bei frühdegenerierter Netzhaut kommen vor allem Bipolar- und Horizontalzellen, bei

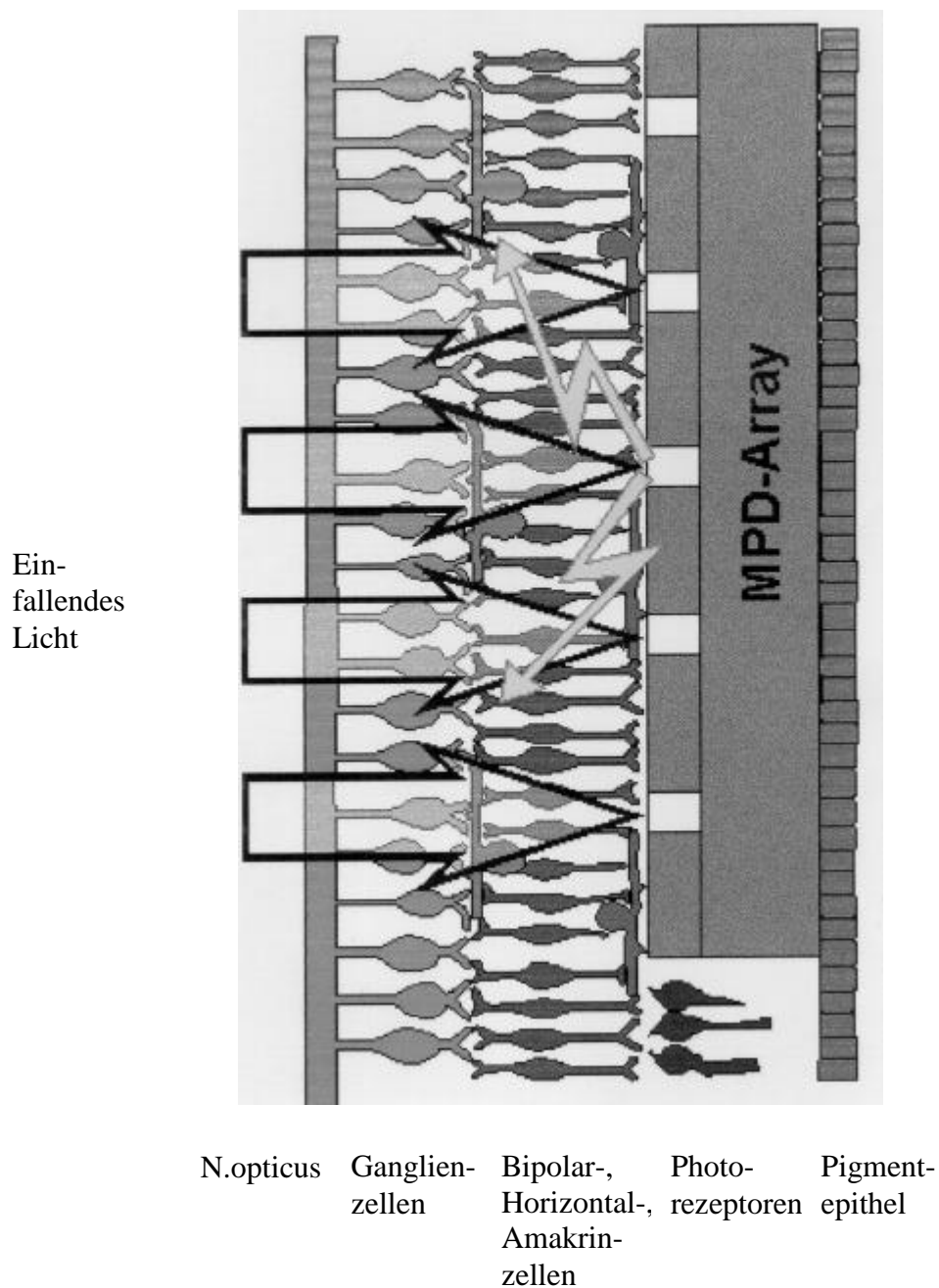


Abb. 1.2 : Schematische Darstellung der Netzhautschichten mit einem Mikrophotodioden-Array (MPD-Array) in subretinaler Position

stark degenerierter auch Amakrinzellen mit dem Implantat in Kontakt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine immunocytochemische Spezifizierung kultivierten Zelltypen bezüglich der Verträglichkeit der verwendeten Materialien vorgenommen.

#### 1.4 Biokompatibilität und retinale Zellkultur als *in-vitro*-Modell

Neben der technischen Funktionsfähigkeit des Implantats im Gewebe und den operativen Möglichkeiten der Installierung, ist vor allem die biologische Verträglichkeit der eingesetzten Werkstoffe und das Weiterleben des kontaktierten Gewebes für den dauerhaften Erfolg ausschlaggebend. Die Beurteilung der Bioverträglichkeit im *in-vitro*-Verfahren hat sich als Screening bewährt und kann eine Vielzahl von Tierversuchen vermeiden. Ein klarer Vorteil für die Humanmedizin ist außerdem, daß in vielen Fällen Zellen homologen Ursprungs verwendet werden können.

Im *in-vitro*-Verfahren werden entweder Primärkulturen, d.h. *in-vitro*-Züchtungen von Zellen, Geweben oder Organen, die direkt aus dem Organismus entnommen wurden, oder etablierte bzw. transformierte Zelllinien verwendet.

Zur Beurteilung der Bioverträglichkeit (Kirkpatrick et al, 1998) werden verschiedene Kriterien herangezogen, so z.B. neben Zellzahl und Zellwanderung auch die Adhäsion, die Überlebensrate, die Proliferationsrate, die Morphologie bzw. die Fähigkeit zur Differenzierung der Zellen. Zur Beurteilung zytotoxischer Effekte wurden verschiedene Methoden etabliert. Lebende und/oder proliferierende Zellen können u.a. mit folgenden Tests quantifiziert werden: Inkorporation von radioaktiven Nukleotiden, z.B. [<sup>3</sup>H] Thymidin, Reduktion von Tetrazolium-Salz mit dem MTT-Test (Mosmann, 1983), Neutral Rot- bzw. Amido Black-Anfärbung (Ciapetti et al, 1996), Hydrolyse von Fluorescein-diacetat mit der Fluorescent probe response (FPR)-technik (Patel et al, 1991), Nachweis von Enzymaktivitäten, z.B. Succinyldehydrogenase (Wataha et al, 1994) bzw. Alkalische Phosphatase (Naji & Harmand, 1991)

Mit verschiedenen Farbstoffen, z.B. Trypan-Blau (Sumbilla & Lakowicz, 1983; Ruiz et al, 1991) oder Erythrosin, sind tote oder nekrotische Zellen nachweisbar. Während der Farbstoff bei toten Zellen durch die durchlässige Zellmembran intrazellulär gelangt, wird der Farbstoff von gesunden Zellen ausgeschlossen.

Biokompatibilitätsprüfungen von Metallen (in Reinform oder Verbindungen bzw. Legierungen) werden vor allem im zahnmedizinischen und orthopädischen Bereich durchgeführt. Dabei werden entweder Fibroblasten-/Fibrocyten-Zelllinien und /oder homologes Zielgewebe verwendet. Der Einsatz von Netzhautzellen zur Prüfung der



Bioverträglichkeit von Metallen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Da aber Fragen der Biokompatibilität bei einer so hochkomplexen, technischen Struktur wie einer künstlichen Sehprothese idealerweise an den betroffenen Zellen untersucht werden sollte, war es Ziel der vorgelegten Arbeit, die Zelladhäsion und das Überleben von Säugetier-Netzhautzellen sowohl auf den Mikrophotodioden-Arrays (MPDAs) als auch auf den verschiedenen Einzelmaterialien der Mikrophotodioden und der Elektroden *in vitro* zu evaluieren. Zusätzlich wurde eine Zelltypspezifizierung der auf den Elektrodenwerkstoffen adhärierenden Zellen vorgenommen.

### 1.5 Zelltypspezifizierung mittels Immunocytochemie

In der Histologie ist eine Zelltypspezifizierung oft anhand der Morphologie und der Lokalisation der Zellen möglich. In der lebenden Zellkultur mit einer gemischten, dissoziierten Zellpopulation gehen diese Informationen weitgehend verloren und eine Identifizierung der Zelltypen gelingt nur in Einzelfällen, z.B. anhand der Zellgröße (Guenther et al, 1993).

Mit monoklonalen Antikörpern können sowohl in histologischen Schnitten als auch in fixierten Monolayer-Kulturen der Rattennetzhaut verschiedene Zelltypen identifiziert und charakterisiert werden (Barnstable, 1980; Akagawa & Barnstable, 1986). In der vorliegenden Arbeit wurden die Antikörper Anti-Protein Kinase C, Anti-Gamma-Aminobuttersäure, Anti-Calbindin, Anti-Parvalbumin, Anti-Calretinin und Anti-Neurofilament 200 verwendet um Nervenzellen, Anti-Vimentin und Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein um Gliazellen zu identifizieren.

Protein Kinase C ist ein Phospholipid und seine Wirkung als intrazellulärer Messenger  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Von den verschiedenen Isoenzymen sind  $\alpha$  und  $\beta$  in der Netzhaut der Ratte nachweisbar (Osborne et al, 1992). Gamma-Aminobuttersäure (GABA) dient im ZNS als Neurotransmitter und ist in der Rattennetzhaut in Amakrin- und Horizontalzellen nachweisbar (Osborne et al, 1986; Versaux et al, 1989; Lake, 1994). Parvalbumin, Calretinin und Calbindin werden der Gruppe der kalziumbindenden

Proteine zugeordnet und können in Ganglien-, Amakrin- und Horizontalzellen nachgewiesen werden (Bastianelli et al, 1994; Baimbridge et al, 1992; Hamano et al, 1990; Uesugi et al, 1991). Anti-Neurofilament 200 reagiert mit der 200-kDa Untereinheit der Neurofilamente und markiert in der Netzhaut Ganglienzellen und einen Subtyp der Horizontalzellen (Akagawa & Barnstable, 1986).

Vimentin und Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) sind Proteine der intermediären Filamente des Cytoskeletts und können bei der Ratte ab der Geburt nachgewiesen werden. Vimentin ist spezifisch für Müllersche Gliazellen (Shaw & Weber, 1983; Moyer et al, 1990) und Fibroblasten, GFAP für Astrocyten. GFAP kann allerdings auch in reaktiven Müllerzellen, z.B. bei degenerativen Prozessen in der Netzhaut, nachgewiesen werden (Eisenfeld et al, 1984; Bjorklund & Dahl, 1985; Huxlin et al, 1995; Bähr, 1991).

Die Anteile der verschiedenen Zelltypen wurden für Monolayer-Zellkulturen von 2-5 Tage alten Kaninchen (Möckel et al, 1993) und für die mature Netzhaut der Maus (Young, 1985) angegeben. Eine Übersicht über die Anteile der verschiedenen Zelltypen in der Rattennetzhaut ist nicht verfügbar.

## 1.6 Hemmung der Gliazellproliferation durch den Mitosehemmer Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC)

Ein spezielles Problem stellten die nicht-neuronalen Zellen der Netzhaut, die Gliazellen, dar. Diese Zellen sind im Gegensatz zu den Nervenzellen zur Teilung fähig und nicht elektrisch erregbar. Überwachsen diese Zellen die Oberfläche eines Mikrophotodioden-Arrays, wird die Signalübertragung zwischen Elektroden und Nervenzellen verhindert. Da eine Beschichtung des MPDAs mit Poly-L-Lysin (PLL) zur regelrechten Adhäsion der Nervenzellen zumindest *in vitro* notwendig ist, entstand der Versuch, durch Zugabe des Mitosehemmers Arabinosylcytosin-Hydrochlorid in verschiedenen Konzentrationen in die Poly-L-Lysin-Beschichtung die Gliaproliferation zu reduzieren.

Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) ist ein Pyrimidin-Analogue und wirkt nach Umwandlung in das Nukleosidtriphosphat ARA-CTP als Antimetabolit in der DNA-Synthese. Neben einer kompetitiven Hemmung der DNA-Polymerase, wird es auch in die DNA eingebaut und ist deshalb in sehr geringen Konzentrationen wirksam (Forth et al, 1992). Die Wirkung bezieht sich besonders auf mitotische Zellen, deren Zellteilung in der empfindlichen S-Phase gehemmt wird. ARAC findet medizinische Anwendung in der Tumormedizin, dort vor allem in der Behandlung der Leukämie.

Die Wirkung von ARAC auf Gliazellen bzw. Nervenzellen wurde *in vivo* (Politis & Houle, 1985) und *in vitro* (Wallace & Johnson, 1989; Martin et al, 1990; Oorschot & Jones, 1991; Takeshima et al, 1994; Walter, 1996) untersucht.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Primärkultur retinaler Zellen

#### 2.1.1 Vorbereitung

Alle benötigten Glaswaren und das Präparierbesteck wurden 3 Stunden bei 160°C sterilisiert, Pipettenspitzen und Gummibälle autoklaviert (20 min, 121°C, 1,1 bar). Sterile Reagenzröhrchen und Petrischalen wurden von der Fa. Greiner bezogen.

Sowohl die Deckgläser als auch die Materialträger wurden über Nacht in Ethanol reinst eingelegt und nach 3-maligem Spülen mit Aqua bidest 3 Stunden bei 160°C sterilisiert. Neben der Präparation fanden alle Handgriffe mit sterilen Gegenständen und Lösungen unter der Sterilbank statt.

#### 2.1.2 Lösungen und Medien für die Präparation

- Poly-L-Lysin-Lösung (PLL) : 25mg Poly-L-Lysin ad 250 ml Aqua bidest
- Standard Salzlösung (SSS) : 7,89 g/l NaCl, 0,37 g/l KCl, 0,18 g/l CaCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, 0,10 g/l MgCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O, 0,12 g/l MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O, 0,08 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 4,90 g/l Glucose \* 1H<sub>2</sub>O, 2,38 g/l N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N´-(2-Ethansulfonsäure) (HEPES), 10 ml/l Antibiotic/Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) 100x ad 1000ml Aqua bidest
- Phosphat-gepufferte Salzlösung, Ca- und Mg-frei mit bovinem Serumalbumin (PBS-CMF-BSA) : 3,57 g/l HEPES, 3,96 g/l Glucose-Monohydrat, 10 ml/l Antibiotic/Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) 100x, 3 g/l Bovines Serumalbumin, 100 ml/l Phosphat-gepufferte Salzlösung (Ca- und Mg-frei, 10x) ad 500 ml Aqua bidest

- Minimal Essential Medium Hanks mit Insulin und Serum (MEM+I+S) : 2,86 g/l HEPES, 6,72 g/l Glucose-Monohydrat, 2,02 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 0,29 g/l L-Glutamin, 37,5 mg/l Insulin, 10 ml/l Antibiotic/Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) 100x, 40 ml/l Pferdeserum, 40 ml/l fetales Kälberserum, 100 ml/l Minimal Essential Medium (Eagle, with Hank`s salts, 10x) ad 500 ml Aqua bidest
  - Papain-Verdauungslösung : 1,4 ml PBS-CMF-BSA, 0,2 ml 5 mM EDTA, 0,2 ml 11 mM DL-Cystein, 0,2 ml Papain (100U/ml)
  - DNase-Ovomucoid : 30,0 mg DNase, 150,0 mg Ovomuroid, 62,5 mg MgSO<sub>4</sub> ad 50 ml MEM-HEPES
  - MEM-HEPES : 0,8 g Glucose-Monohydrat, 14,6 mg L-Glutamin ad 200 ml Minimal Essential Medium (25mM HEPES, without glutamine)
  - ARAC : 25 mg Arabinosylcytosin-Hydrochlorid ad 90 ml Aqua bidest
- Alle Lösungen wurden auf pH= 7,3 eingestellt, steril filtriert (0,22 µm Filter) und bei 4°C längstens 4 Wochen bzw. als Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

### 2.1.3 Präparation der retinalen Zellkultur

In sterile Petrischälchen (d=35 mm , Fa. Greiner) wurden jeweils 2 Deckgläser oder 2 Materialträger verbracht, mit jeweils 2 ml PLL-Lösung überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor der Präparation wurde die PLL-Lösung abgezogen und einmal mit SSS-Lösung gespült.

Zur Organentnahme wurden Ratten des Stammes Brown Norway (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld) verwendet. Drei bis zehn Tage alte Tiere wurden mit einer Schere dekapitiert, beide Augäpfel mit einer gebogenen Schere aus der Augenhöhle gelöst und in eisgekühlte SSS-Lösung überführt. Unter einem Binokular wurden die Augäpfel nacheinander präpariert. Zunächst wurde das Bindegewebe stumpf mit zwei Pinzetten entfernt. Mit einer feinen Kanüle wurde nahe der Ora serrata ein Loch gestochen und mit einer Augenschere äquatorial entlang der Ora serrata aufgeschnitten. Die Hornhaut konnte nun vorsichtig abgenommen und Linse und Glaskörper herausgezogen werden. Mit zwei Pinzetten wurde am Rand des Augenbeckers nahe beieinander gegriffen und

vorsichtig auseinandergezogen bis die Netzhaut sich vollständig abgelöst hat. Mit einem Augenlöffel wurde die Netzhaut in eisgekühlte SSS-Lösung überführt. Nun wurden die Netzhäute gemeinsam weiterbehandelt. Die SSS-Lösung wurde abgezogen, und die Papain-Verdaulösung aufpipettiert und im Wasserbad bei 37°C 13-15 min inkubiert. Die Papain-Verdaulösung wurde abgezogen, die Netzhäute zweimal mit PBS-CMF-BSA gewaschen und 1ml DNase-Ovomucoid aufpipettiert um den Verdauprozess zu stoppen. Die Netzhäute wurden in dieser Lösung mit feuerpolierten Glaspipetten (abnehmender Öffnungsdurchmesser) mechanisch dissoziiert. Von dieser Zellsuspension wurden 10µl 1:16 mit SSS-Lösung verdünnt und in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt. Die Zellsuspension wurde so in dem Medium (MEM+I+S) verdünnt, daß eine Zelldichte von circa 1 Million Zellen/ml Medium erreicht wurde. Es wurden jeweils 2 ml der Zellsuspension in die mit PLL beschichteten Kulturschälchen ausgesät.

#### 2.1.4 Aufrechterhaltung der retinalen Zellkultur

Die Kulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Jeden dritten Tag wurde in jedem Petrischälchen 1ml des Mediums abgezogen und 1 ml frisches Medium zugesetzt. Nach 4 Tagen wurden 10 µl des Mitosehemmers ARAC/ml Medium eingemischt, um eine Überwucherung durch Gliazellen und damit eine Verdrängung der Nervenzellen zu vermeiden. Am darauf folgenden Tag wurde das gesamte Medium getauscht. Bei jedem Medientausch wurden stichprobenartig verschiedene Petrischälchen mikroskopisch untersucht und die Entwicklung der Zellkultur beobachtet.

## 2.2 Fixation und Sichtbarmachung der retinalen Zellen

### 2.2.1 Lösungen und Farbstoffe

- Phosphat-gepufferte Salzlösung, Ca- und Mg-frei (PBS-CMF) : 3,57 g/l HEPES, 3,96 g/l Glucose-Monohydrat, 10 ml/l Antibiotic/Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) 100x, 100 ml/l Phosphat-gepufferte Salzlösung (Ca- und Mg-frei, 10x) ad 500 ml Aqua bidest
- Trypan-Blau : 0,8%
- Fixationslösung (PFA4%) : 2 g Paraformaldehyd, 0,5 ml 2mM CaCl<sub>2</sub>, 0,68 g Sucrose, 5 ml Phosphat-gepufferte Salzlösung (Ca- und Mg-frei, 10x) ad 50 ml Aqua bidest
- Beide Lösungen wurden auf pH=7,4 eingestellt, steril filtriert (0,22 µm Filter) und bei 4°C längstens 4 Wochen aufbewahrt.
- Triton X : 0,1%ig
- Phalloidin-TRITC : *Ansatz* : 0,1 mg Phalloidin-Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (-TRITC) in 1ml Methanol lösen, 10µl-Aliquots bilden und Methanol unter dem Abzug verdampfen lassen, *Lösung (1µg/ml)* : Phalloidin-TRITC-Aliquot mit 10 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) lösen und mit 990 µl PBS-CMF verdünnen
- 4,6-diamidino-2-phenylindol-2HCl (DAPI) : *Ansatz* : 5 mg DAPI in 1 ml Methanol lösen, Aliquots bilden, *Lösung (1µg/ml)* : 1:5000 mit PBS-CMF verdünnen
- Mowiol : 10 g Mowiol in 40 ml PBS-CMF 16 Stunden rühren, 20 ml Glycerin einrühren, 15 min bei 4000U/min zentrifugieren

### 2.2.2 Fixation

Das Medium wurde aus den Petrischälchen abgezogen und 37°C warmes PBS-CMF vorsichtig aufpipettiert und wiederum abgezogen, um Zelltrümmer und lose anheftende Zellen zu entfernen. Nun wurden pro Petrischälchen 2 ml PFA4%-Fixationslösung

aufpipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abziehen der Fixationslösung wurde 3 x 10 min mit PBS-CMF gewaschen.

Zur Testung der Vitalität der adhärenenden Zellen wurden Zellkulturen auf Deckgläsern vor der Fixierung mit Trypan-Blau 0,8% 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

### 2.2.3 Anfärbung der retinalen Zellen

Die PBS-CMF wurde aus den Petrischälchen abgezogen und mit je 2 ml Triton X 0,1% 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Deckgläser bzw. Materialträger herausgenommen und auf Parafilm „M“ gelegt, mit je 100 µl Phalloidin-TRITC-Lösung überschichtet und für 1 Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach 2 x 10 min waschen mit PBS-CMF wurden je 100 µl DAPI-Lösung aufgetragen und für 5 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach 3 x 10 min waschen mit PBS-CMF wurden die Deckgläser bzw. Materialträger auf Objektträger positioniert, mit Mowiol überschichtet und Deckgläsern eingedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur und Dunkelheit getrocknet.

## 2.3 Immuncytochemie

### 2.3.1 Lösungen und Antikörper

- Fixationslösungen : PFA 4%, PFA 2%; PFA4% + Glutaraldehyd 0,1% (s. 2.2.1.)
- Blockierungslösung : PBS-CMF mit 0,1% Triton X, 2% Bovinem Serumalbumin, 20% Ziegen Serum
- PBS-CMF mit Ziegen Serum (PBS-NGS) : PBS-CMF mit 5% Normal Goat Serum
- Primäre Antikörper : (*Antikörper, Verdünnung mit PBS-NGS, Wirt, Hersteller*)
  - Anti-Protein Kinase C, 1:250, Maus, Amersham
  - Anti-Gamma-Aminobuttersäure (GABA), 1:500, Kaninchen, Biotrend
  - Anti-Calretinin, 1:300, Kaninchen, Chemicon
  - Anti-Parvalbumin, 1:300, Maus, Sigma



- Anti-Calbindin, 1:200, Maus, Sigma
- Anti-Neurofilament 200, 1:100, Maus, Cymbus
- Anti-Vimentin, 1:50, Maus, Dako
- Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), 1:500, Kaninchen, Dako
- Sekundäre Antikörper : (*Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffkopplung, Verdünnung mit PBS-CMF, Hersteller*)
  - Anti-IgGMouse, Cy3<sup>TM</sup>-gekoppelt, 1:3000, Biotrend
  - Anti-IgGRabbit, Cy3<sup>TM</sup>-gekoppelt, 1:3000, Biotrend
  - Anti-IgGRabbit, Fluoroisothiocyanat(FITC)-gekoppelt, 1:1000, Biotrend

### 2.3.2 Immuncytochemische Sichtbarmachung

Aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeit und Bindungsfähigkeit der Antikörper waren verschiedene Fixationslösungen notwendig. Für die Reaktion mit Anti-Protein Kinase C wurde mit PFA2%, für die Reaktion mit Anti-Gamma-Aminobuttersäure mit PFA4%+Glutaraldehyd0,1% und für die Reaktion mit Anti-Calretinin, Anti-Parvalbumin, Anti-Calbindin, Anti-GFAP und Anti-Vimentin mit PFA4% nach der in 2.2.2. beschriebenen Vorgehensweise fixiert. Die Deckgläser und die Materialträger mit den darauf fixierten retinalen Zellen wurden auf Objektträger gelegt, jeweils 80 µl Blockierungslösung aufpipettiert und bei 4°C in einer feuchten Kammer 24 Stunden inkubiert. Nach Abzug der Blockierungslösung wurden jeweils auf ein Deckglas und ein Materialträger 80 µl eines primären Antikörpers in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen. Als Kontrolle der unspezifischen Bindung der sekundären Antikörper dienten zwei Deckgläser, auf die PBS-NGS aufgetragen wurde. Nach 24 Stunden Inkubation in der feuchten Kammer bei 4°C wurden die primären Antikörper abgezogen und 3 x 10 min mit PBS-NGS gewaschen. Danach wurden jeweils 80µl des passenden sekundären Antikörpers aufpipettiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach 3 x 10 min waschen mit PBS-CMF wurden jeweils 80 µl DAPI (1 µg/ml) aufgetragen und 5 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Es wurde wiederum 3 x 10 min mit PBC-CMF gewaschen und dann mit Mowiol und Deckgläsern eingedeckt.

## 2.4 Verwendete Materialträger und Mikrophotodioden-Arrays (MPDAs) und Einzelwerkstoffe

- Einzelwerkstoffe :
  - Siliziumdioxid auf Silizium ( $\text{SiO}_2$ )
  - Iridium auf Silizium mit Titan als Haftvermittler (Ir)
  - Titannitrid auf Glas (TiN)
  - Titannitrid auf Glas mit kovalent gebundenem Epoxysilan und Poly-L-Lysin (TiN)
  - Siliziumnitrid auf Glas ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )
  - Polyimid auf Glas (Polyimid)
  - Amorphes Silizium auf Glas
  - Intrinsisches Silizium auf Glas
  - Photolack auf Glas
  
- Mikrophotodioden-Arrays :
  - Mikrophotodioden-Arrays (MPDA) mit TiN-Elektroden
  - Mikrophotodioden-Arrays (MPDA) mit Ir-Elektroden

## 2.5 Hemmung des Gliaproliferation

In die Beschichtungslösung Poly-L-Lysin wurde der Mitosehemmer Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) in den Konzentrationen 10, 20, 40 und  $160\mu\text{M}$  eingemischt und jeweils zwei Deckgläser pro Petrischale damit beschichtet und eine Präparation nach 2.1.3 vorgenommen. Die Zellkulturen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert und es wurde alle 3 Tage 1ml Medium durch frisches Medium ersetzt. Jeweils nach 3, 7 und 14 Tagen wurde nach 2.2.2 fixiert und nach 2.2.3 angefärbt.

## 2.6 Erfassung und Auswertung der Daten

Unter einem Fluoreszenzmikroskop (Fa. Olympus) wurden bei einer Vergrößerung von 1000x jeweils 10 Gesichtsfelder pro Deckglas bzw. Materialträger ausgewertet. Es wurde sowohl die Anzahl der Gliazellkerne als auch der Nervenzellkerne erfaßt und zur Gesamtzellzahl/Gesichtsfeld summiert. Nach Prüfung der Varianzhomogenität (F-Test) wurden die Mittelwerte (jeweils  $n=10$ ) der zwei Kontrollsubstrate, die aus einem Kulturschälchen stammten bzw. der zwei Materialträger, die aus einem Kulturschälchen stammten, zu einem Gesamtmittelwert ( $n=20$ ) zusammengefaßt. Lag keine Varianzhomogenität vor, wurden maximal 2 „Extremwerte“ herausgenommen, so daß in allen Fällen Varianzhomogenität erreicht werden konnte.

Die Zellzahlen auf den Materialträgern wurden zu den Zellzahlen auf den Kontrollsubstraten in Relation gesetzt und in „%“ angegeben. Die Prozentwerte von 3 Versuchen wurden gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $\bar{x} \pm SD$ ) in % an der Kontrolle im Diagramm dargestellt.

Mittels der Immuncytochemie wurden die Zellen auf jeweils zwei Deckgläsern bzw. Materialträger mit je einem Antikörper markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Bei einer Vergrößerung von 400x wurden in jeweils 5 Gesichtsfeldern sowohl die Anzahl der immuncytochemisch markierten Zellen als auch die Gesamtzellzahl ermittelt. Der prozentuale Anteil der immuncytochemisch markierten Zellen an der Gesamtzellzahl wurde errechnet, die Prozentwerte gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $\bar{x} \pm SD$ ) angegeben.

Die Signifikanz der Mittelwertunterschiede wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student t-Tests für unabhängige Stichproben geprüft. Es wurde die Überschreitungswahrscheinlichkeit auf einem Signifikanzniveau von 10% errechnet. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit von  $p<0,05$  wurde als signifikant, von  $p<0,01$  als sehr signifikant und von  $p<0,001$  als hochsignifikant angesehen (Sachs, 1988). Die statistischen Berechnungen wurden auf einem Computer mit Hilfe des Programms Excel 97 durchgeführt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Adhäsion retinaler Zellen *in vitro*

##### 3.1.1 Unterscheidung von Glia- und Nervenzellen

Zur Auswertung wurden die Zellen nach 2 Stunden, 1,7,14,21 und 28 Tagen auf den Proben fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten kleine, hellblaue und große, dunklere Zellkerne unterschieden werden. Mittels immunocytochemischer Reaktion mit Vimentin und GFAP konnten wie in Abb. 3.1 gezeigt, die großen, dunklen Kerne den Gliazellen zugeordnet werden. Mit Vimentin sind allerdings auch Fibroblasten nachweisbar, so daß bei der folgenden Verwendung der Begriffe Gliazellen bzw. Gliazellzahl diese Fibroblasten mit einbezogen sind. Die kleinen hellblauen Zellkerne sind die Zellkerne der Nervenzellen.

Mit der Phalloidin-TRITC-Anfärbung ist die Darstellung des Cytoskeletts möglich. Nach 2 Stunden und einem Tag war neben dem prominenten Cytoskelett der Gliazellen das filigrane Cytoskelett der Nervenzellen erkennbar, später beherrschte das Cytoskelett der Gliazellen das Bild und überlagerte das der Nervenzellen.

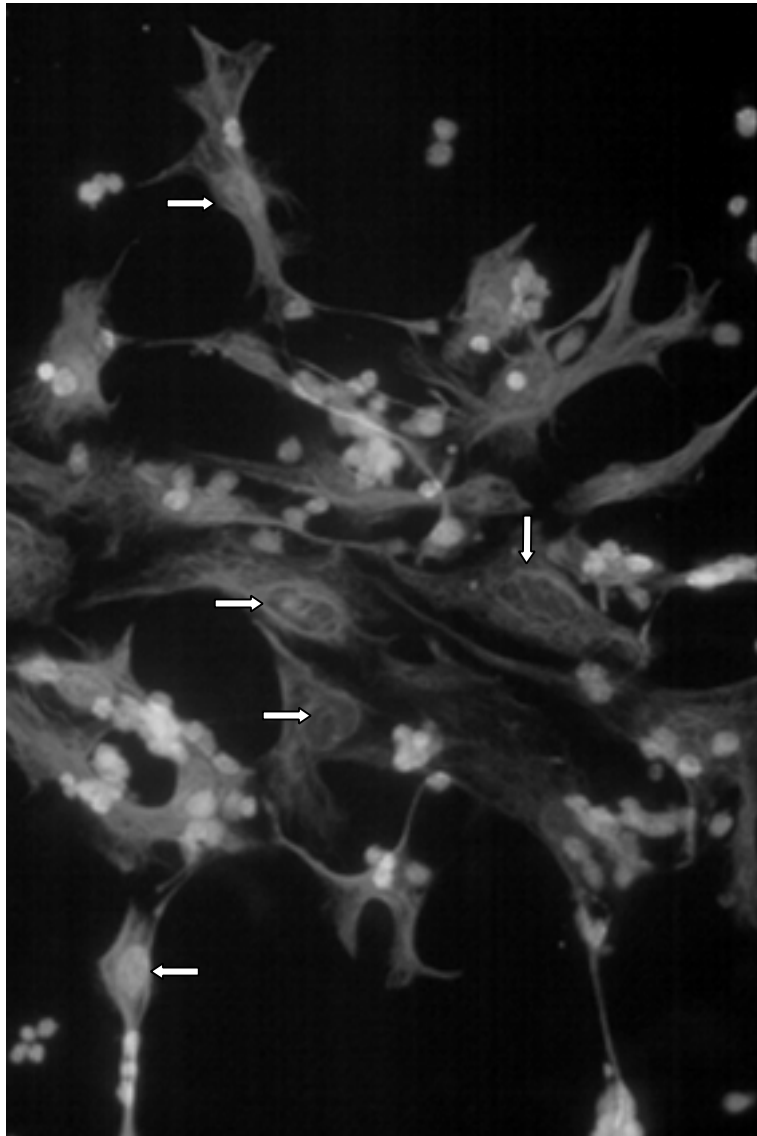


Abb. 3.1 : Immuncytochemische Sichtbarmachung von Gliazellen mit Anti-GFAP und Anti-Vimentin; sekundäre Antikörper : Cy3 und FITC; Zellkernfärbung mit DAPI; weiße Pfeile : Gliazellkerne

### 3.1.2 Adhäsion retinaler Zellen auf Deckgläsern (Kontrollsubstrat) über den Zeitraum von 28 Tagen

Eine eindeutige Unterscheidung der Zellkerne von adhätierenden Glia- und Nervenzellen war nach 2 Stunden und einem Tag noch nicht möglich. Daher wurde in diesem Stadium nur die Gesamtzellzahl ermittelt. Nach 7,14,21 und 28 Tagen wurde die Anzahl der Nervenzellkerne und die der Gliazellkerne getrennt ausgezählt und zur Gesamtzellzahl summiert.

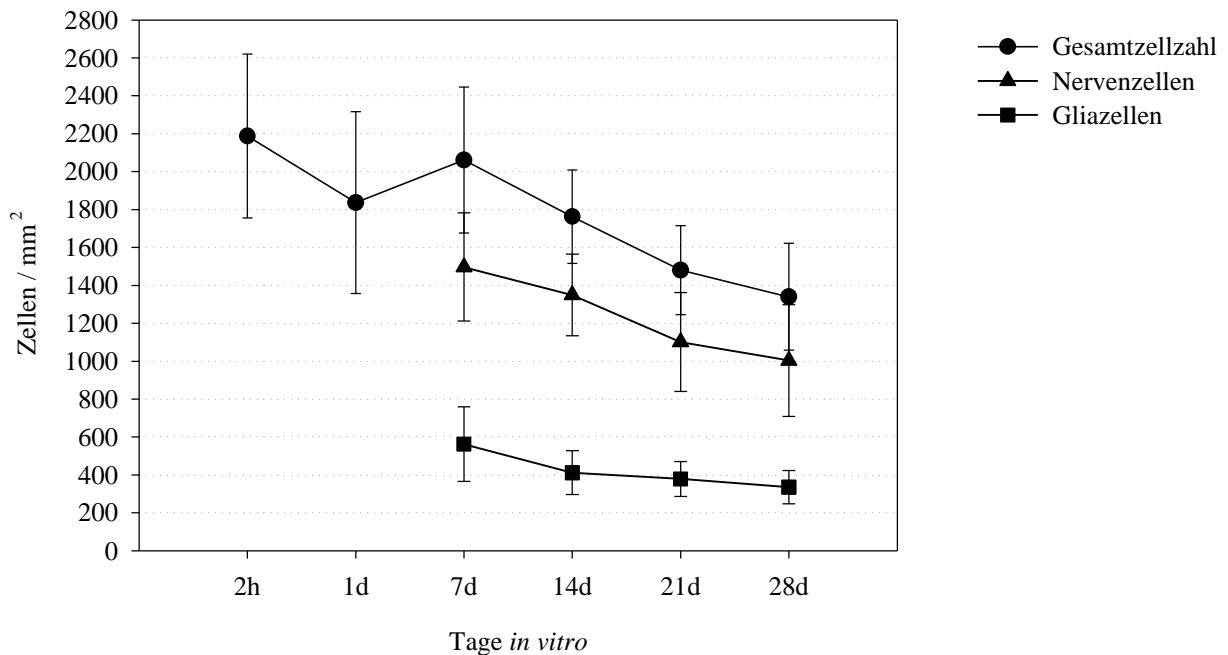


Abb. 3.2 : Zellzahl/mm<sup>2</sup> auf Kontrollsubstrat nach 2 Stunden (N=6) und 1, 7, 14, 21 und 28 Tagen (jeweils N=9) *in vitro*;  $\bar{x} \pm SD$

Abb. 3.2 zeigt den Verlauf der Zelladhäsion auf den Kontrollsubstraten von 2 Stunden bis 28 Tage. Zunächst kam es im Zeitraum zwischen 2 Stunden und 1 Tag zu einer rapiden Zellreduktion um 16%. Die Zunahme um 14% bis zum Tag 7 ist durch die Gliazellproliferation in den ersten 4 Tagen vor Zugabe des Mitosehemmers zu erklären.

Im weiteren Verlauf nahm die Zellzahl sukzessive ab, wobei Nerven- und Gliazellen gleichermaßen betroffen waren. Über den Gesamtzeitraum von 2 Stunden zu 28 Tagen lag der Verlust der Gesamtzellzahl bei 39%.

Mit dem Trypan-Blau-Test wurde zu allen genannten Zeitpunkten nachgewiesen, daß 97-99% der Zellen vital waren. Man kann also davon ausgehen, daß abgestorbene Zellen ihre Adhäsion aufgegeben und sich vom Substrat abgelöst haben bzw. beim Spülen mit PBS-CMF entfernt wurden. Die 1-3% der abgestorbenen, aber adhärierenden Zellen wurden allerdings durch Fixierung und Anfärbung in der Auswertung mit erfaßt.

### 3.2 Evaluierung der Adhäsion retinaler Zellen auf Mikrophotodioden-Arrays (MPDAs) und deren Einzelwerkstoffen

Die Testung der Adhäsion retinaler Einzelzellen über einen Zeitraum von 4 Wochen wurde auf Mikrophotodioden-Arrays (MPDAs) und den Einzelwerkstoffen vorgenommen. Als Kontrollsubstrat dienten Deckgläser.

Die ermittelten Zellzahlen auf den MPDAs bzw. Einzelwerkstoffen wurden zu den auf den jeweiligen Deckgläsern (Kontrollen  $\square$  100%) in Relation gesetzt, die Werte gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $\bar{x} \pm SD$ ) angegeben.

#### 3.2.1 Adhäsion retinaler Zellen auf den Einzelwerkstoffen Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ), Siliziumnitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) und Polyimid

Die Zelladhäsion auf  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Si}_3\text{N}_4$  und Polyimid ist in Abb. 3.3 dargestellt.

Auf  $\text{Si}_3\text{N}_4$  adhärerten im Vergleich zur Kontrolle nach 2 Stunden  $100 \pm 6\%$ , nach einem Tag  $97 \pm 6\%$ , nach 7 Tagen  $97 \pm 1\%$ , nach 14 Tagen  $104 \pm 6\%$ , nach 21 Tagen  $101 \pm 6\%$  und nach 28 Tagen  $98 \pm 3\%$  der Zellen.

Auf SiO<sub>2</sub> lagen die Werte im Vergleich zur Kontrolle bei 91±1% nach 2 Stunden, 98±5% nach einem Tag, 96±3% nach 7 Tagen, 103±4% nach 14 Tagen, 97±9% nach 21 Tagen und bei 99±2% nach 28 Tagen.

Die Zellzahl und damit die Zelladhäsion sowohl auf Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> und als auch auf SiO<sub>2</sub> wichen gegenüber dem Kontrollsubstrat über den gesamten Zeitraum von 4 Wochen nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) ab.

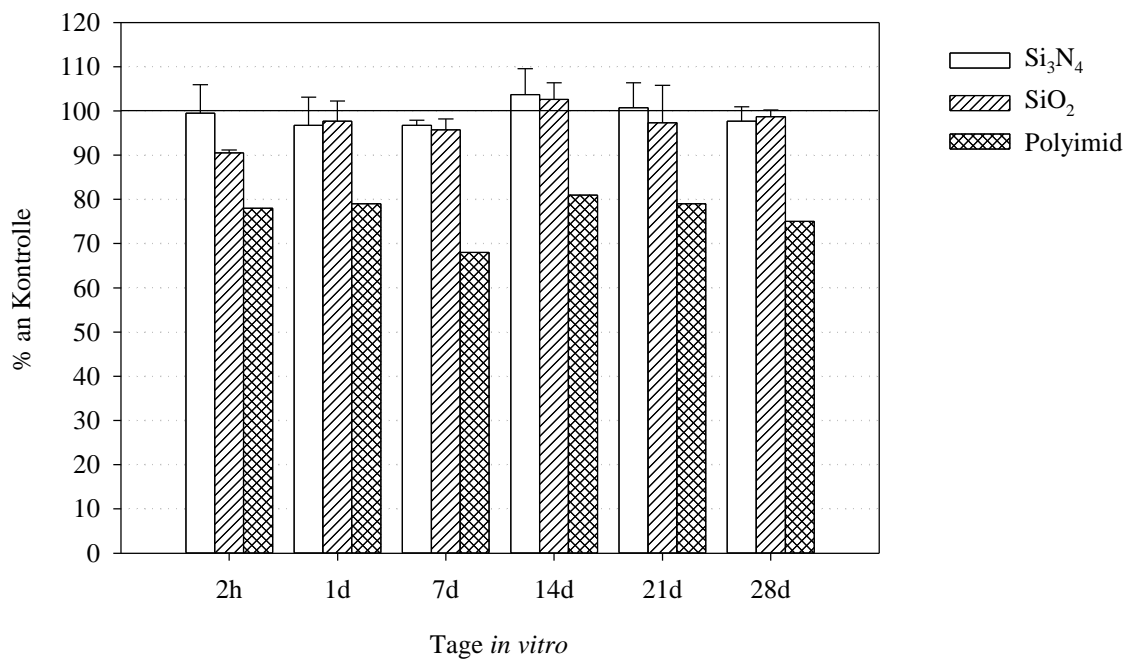


Abb. 3.3 : Zelladhäsion auf Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (N=3, n=6), SiO<sub>2</sub> (N=3, n=6) und Polyimid (N=1, n=2) in Relation zum Kontrollsubstrat:  $\bar{x} \pm SD$

Die Adhäsion der Zellen auf Polyimid war gegenüber der Kontrolle von Anfang an hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) reduziert. Dies setzte sich über die 4 Wochen fort. Im Vergleich zur Kontrolle wurden nach 2 Stunden 78%, nach einem Tag 79%, nach 7 Tagen 68 %, nach 14 Tagen 81% nach 21 Tagen 79% und nach 28 Tagen 75% erreicht.



In Abb. 3.4 und Abb. 3.5 ist der Anteil der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl auf  $\text{Si}_3\text{N}_4$  bzw.  $\text{SiO}_2$  im Vergleich zu den Kontrollsubstraten gezeigt. Auf  $\text{Si}_3\text{N}_4$  betrug der Anteil der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl im Zeitraum von Tag 7 bis Tag 28  $71\pm 8\%$ ,  $76\pm 5\%$ ,  $76\pm 6\%$  und  $76\pm 8\%$ , auf dem Kontrollsubstrat  $71\pm 9\%$ ,  $77\pm 6\%$ ,  $76\pm 8\%$  und  $76\pm 9\%$ .

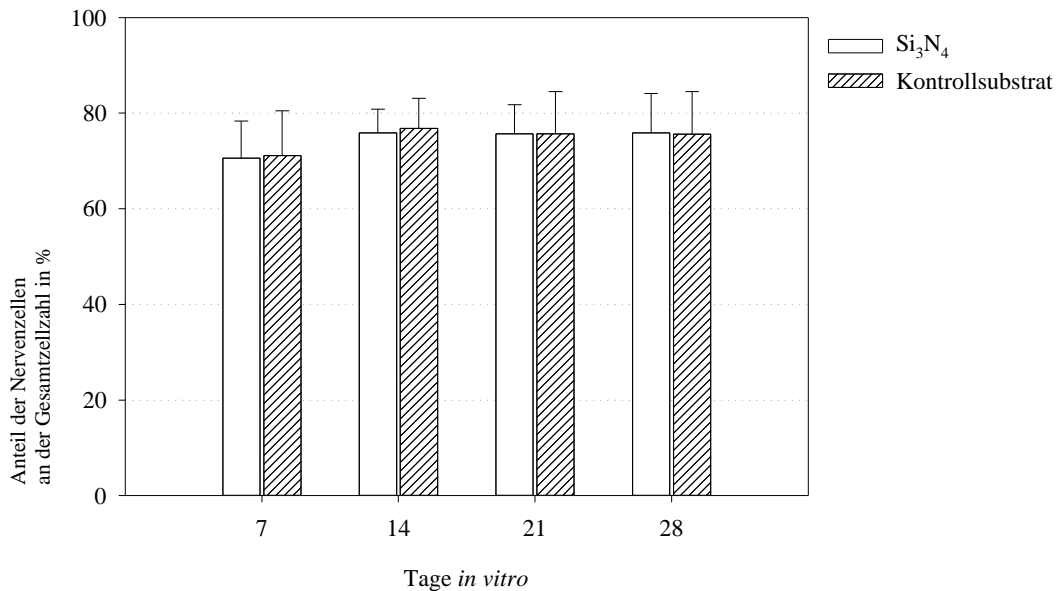


Abb. 3.4 : Anteil der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl auf  $\text{Si}_3\text{N}_4$  und dem Kontrollsubstrat;  $\bar{x} \pm \text{SD}$

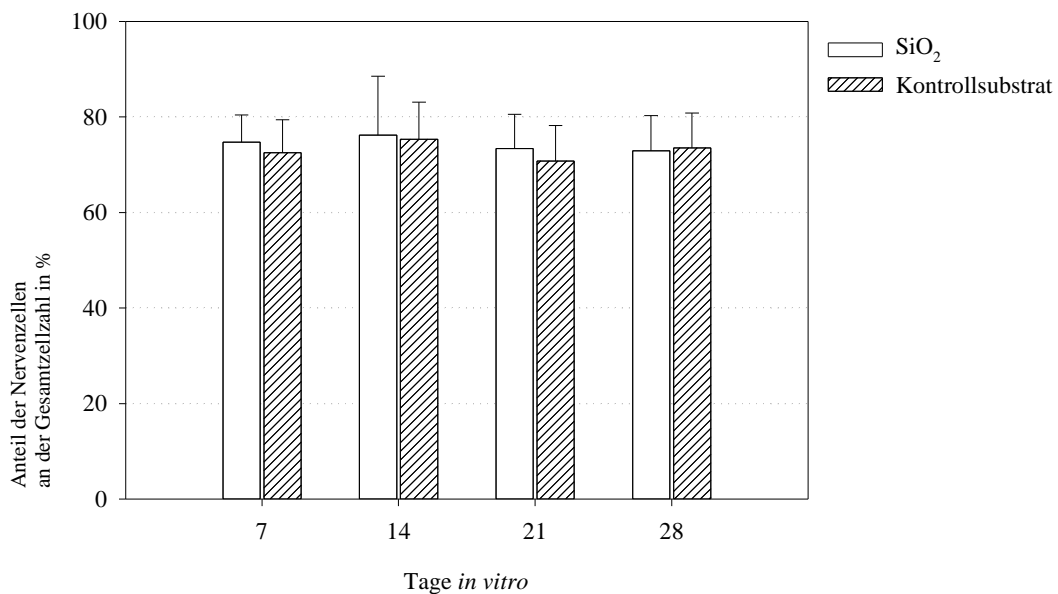


Abb. 3.5 : Anteil der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl auf  $\text{SiO}_2$  und dem Kontrollsubstrat;  $\bar{x} \pm \text{SD}$

Auf  $\text{SiO}_2$  lagen die Anteilswerte der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl bei  $75\pm 6\%$ ,  $76\pm 12\%$ ,  $73\pm 7\%$  und  $73\pm 7\%$ , auf dem Kontrollsubstrat bei  $73\pm 7\%$ ,  $75\pm 8\%$ ,  $71\pm 7\%$  und  $74\pm 7\%$ .

Über den Zeitraum von 28 Tagen bleibt das Verhältnis Nervenzellen zu Gliazellen auf beiden Materialträgern sowie auf den Kontrollsubstraten auf annähernd gleichem Niveau. Der Vergleich von Materialträgern und Kontrollsubstraten ergab sowohl bei  $\text{Si}_3\text{N}_4$  als auch bei  $\text{SiO}_2$  keine signifikante Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Auch auf Polyimid (Abb. 3.6) wurde das Verhältnis Nervenzellen zu Gliazellen über den Zeitraum von Tag 7 zu Tag 28 auf annähernd gleichem Niveau beibehalten. In diesem Zeitraum lagen die Anteilswerte der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl auf Polyimid bei  $81\pm 5\%$ ,  $82\pm 5\%$ ,  $84\pm 3\%$  und  $81\pm 5\%$ , auf dem Kontrollsubstrat bei  $83\pm 3\%$ ,  $85\pm 2\%$ ,  $85\pm 4\%$  und  $86\pm 5\%$ . Nach einer Woche und nach drei Wochen war zwischen Polyimid und dem Kontrollsubstrat kein signifikanter ( $p > 0,05$ ) Unterschied feststellbar. Dagegen war der Anteilswert der Nervenzellen auf Polyimid im Vergleich zum Kontrollsubstrat nach zwei Wochen signifikant ( $p < 0,05$ ) und nach vier Wochen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) reduziert.

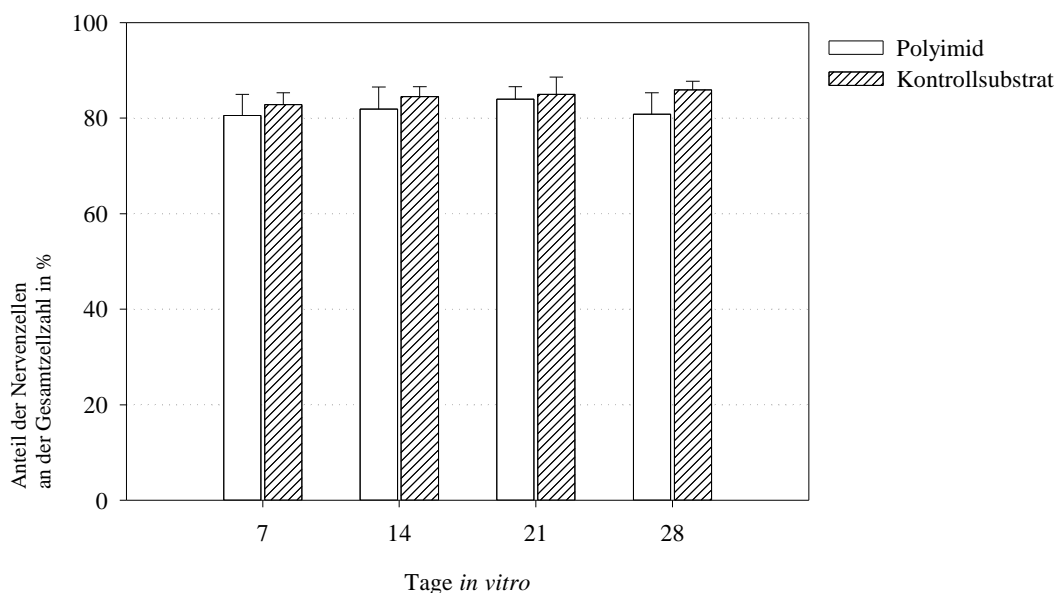


Abb. 3.6 : Anteil der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl auf Polyimid und dem Kontrollsubstrat;  $\bar{x} \pm \text{SD}$

### 3.2.2 Adhäsion retinaler Zellen auf den Einzelwerkstoffen Iridium (Ir) und Titanitrid (TiN)

Die Zelladhäsion auf den Elektrodenwerkstoffen Ir und TiN ist in Abb. 3.7 dargestellt.

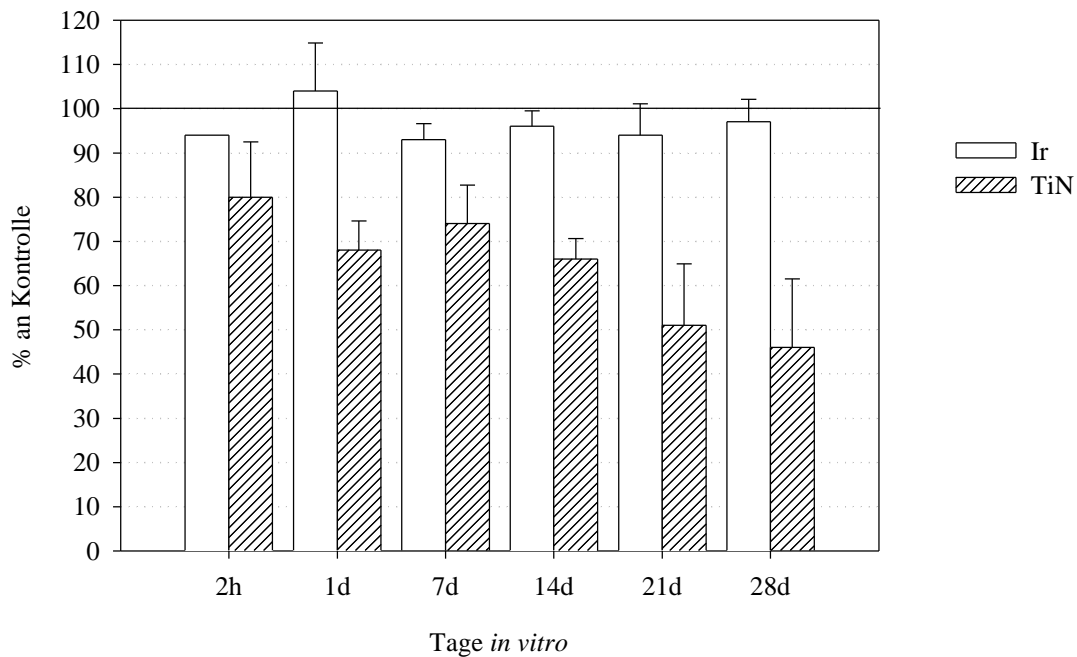


Abb. 3.7 : Zelladhäsion auf Ir (N=3, n=6) und TiN (N=3, n=6) in Relation zum Kontrollsubstrat; ( $\bar{x} \pm SD$ )

Zwischen den Zellzahlen auf Ir und auf der Kontrolle zeigte sich über den Zeitraum der 28 Tage kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ). Nach 2 Stunden adhärten im Vergleich zur Kontrolle 94%, nach einem Tag  $104 \pm 11\%$ , nach 7 Tagen  $93 \pm 4\%$ , nach 14 Tagen  $96 \pm 4\%$ , nach 21 Tagen  $94 \pm 7\%$  und nach 28 Tagen  $97 \pm 5\%$  der Zellen.

Die Zellzahl auf TiN war von Beginn der Kultivierungsperiode an hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) reduziert. Im Vergleich zur Kontrolle hafteten auf TiN nach 2 Stunden  $80 \pm 13\%$ , nach einem Tag  $68 \pm 7\%$ , nach 7 Tagen  $74 \pm 9\%$ , nach 14 Tagen  $66 \pm 5\%$ , nach 21 Tagen  $51 \pm 14\%$  und nach 28 Tagen  $46 \pm 16\%$  der Zellen.

In Abb. 3.8 wird der Anteil der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl auf Ir und dem Kontrollsubstrat gezeigt. Sowohl auf Ir als auch auf dem Kontrollsubstrat blieb das Verhältnis Nervenzellen zu Gliazellen nahezu stabil. In dem Zeitraum von Tag 7 bis Tag 28 *in vitro* wurden auf Ir Anteilswerte von  $73\pm 6\%$ ,  $76\pm 7\%$ ,  $73\pm 7\%$  und  $76\pm 7\%$  und auf dem Kontrollsubstrat Anteilswerte von  $73\pm 7\%$ ,  $75\pm 8\%$ ,  $71\pm 7\%$  und  $74\pm 7\%$  ermittelt. Zwischen dem Anteil der Nervenzellen auf Ir und dem auf dem Kontrollsubstrat wurde kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) festgestellt.

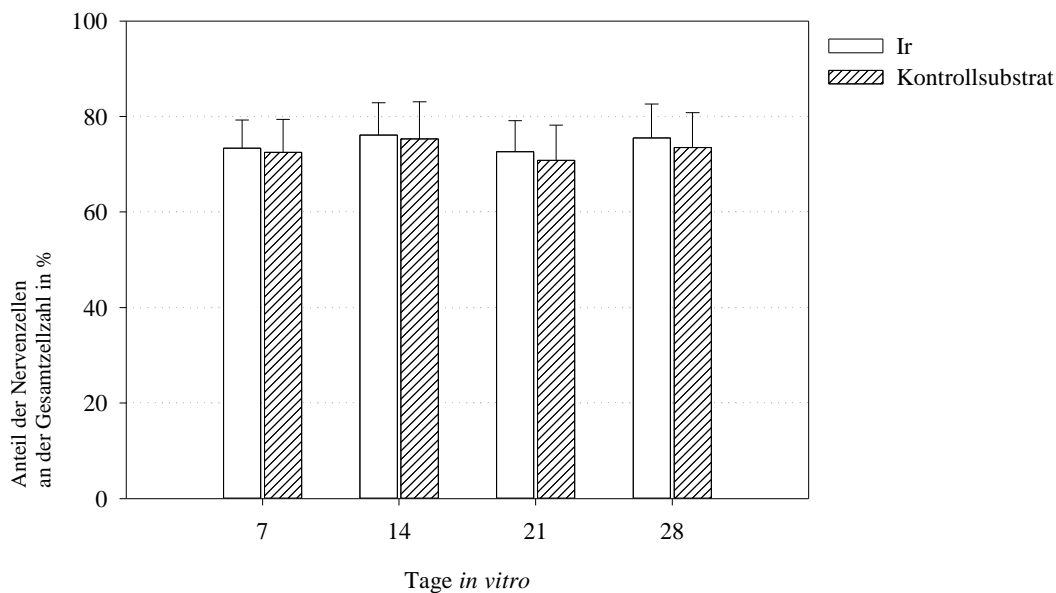


Abb. 3.8 : Anteil der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl auf Ir und dem Kontrollsubstrat:  $\bar{x} \pm SD$

Abb.3.9 zeigt den Anteil der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl auf TiN und dem Kontrollsubstrat. Auf TiN ergaben sich Anteilswerte von  $72\pm 5\%$ ,  $81\pm 7\%$ ,  $79\pm 11\%$  und  $82\pm 8\%$ , auf dem Kontrollsubstrat von  $73\pm 6\%$ ,  $77\pm 5\%$ ,  $75\pm 8\%$  und  $73\pm 9\%$ . Während nach 7 Tagen kein signifikanter ( $p>0,05$ ) Unterschied zwischen TiN und dem Kontrollsubstrat festzustellen war, sind die Anteilswerte der Nervenzellen auf TiN gegenüber denen auf dem Kontrollsubstrat nach 14, 21 und 28 Tagen signifikant ( $p<0,001$ ) erhöht.

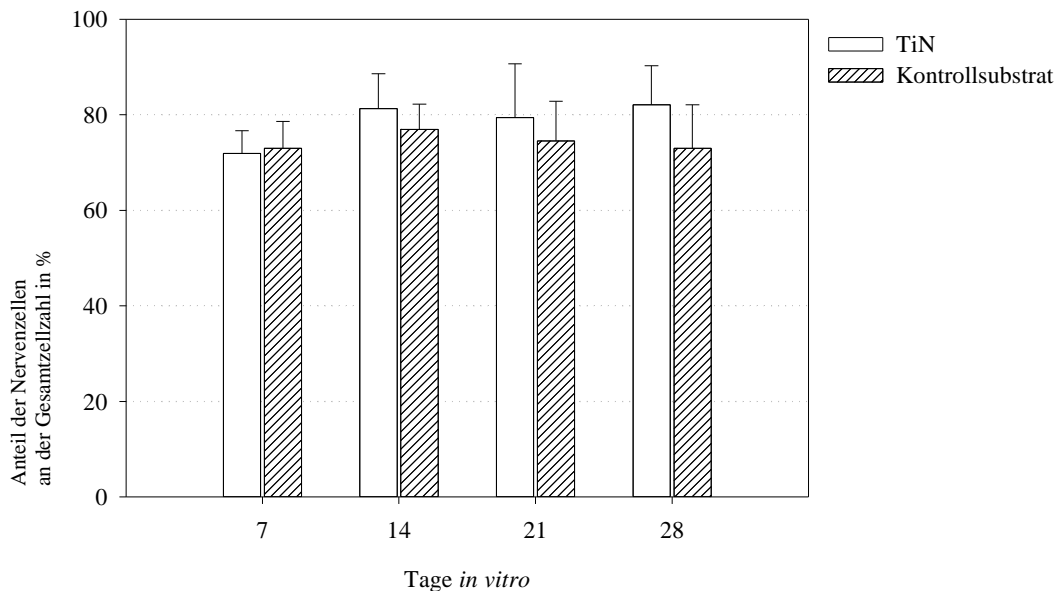


Abb. 3.9 : Anteil der Nervenzellen an der Gesamtzellzahl auf TiN und dem Kontrollsubstrat;  $\bar{x} \pm SD$

Auf TiN zeigte sich eine im Vergleich zum Kontrollsubstrat signifikante Verschiebung des Nervenzell-Gliazell-Verhältnisses zugunsten der Nervenzellen. Die Gliazellen geben auf TiN in stärkerem Maß die Adhäsion auf als auf dem Kontrollsubstrat.

### 3.2.3 Adhäsion retinaler Zellen auf amorphen und intrinsischen Silizium und Photolack

Amorphes und intrinsisches Silizium auf Glas veränderte die Farbe innerhalb der ersten Woche *in vitro*, nach 2 Wochen war das ursprünglich bräunliche Material nicht mehr zu erkennen. Der Photolack löste sich innerhalb der ersten Tage *in vitro* vom Glas ab und schwamm auf. Das Material kam daher nicht für die Herstellung stabiler Mikrophotodioden-Arrays in Frage. Diese Adhäsionsversuche wurden deshalb abgebrochen und nicht weiter ausgewertet.

### 3.2.4 Adhäsion retinaler Zellen auf den Mikrophotodioden-Arrays (MPDAs)

Neben der Zelladhäsion auf den Einzelwerkstoffen wurde auch die auf gefertigten, funktionstüchtigen Mikrophotodioden-Arrays evaluiert. In Abb. 3.10 ist der Verlauf der Adhäsion auf MPDAs mit Ir- bzw. TiN-Elektroden dargestellt. Da diese MPDAs nur in geringer Stückzahl zur Verfügung standen, konnte nur eine Präparation mit jeweils 2 MPDAs pro Fixationsstadium durchgeführt werden.

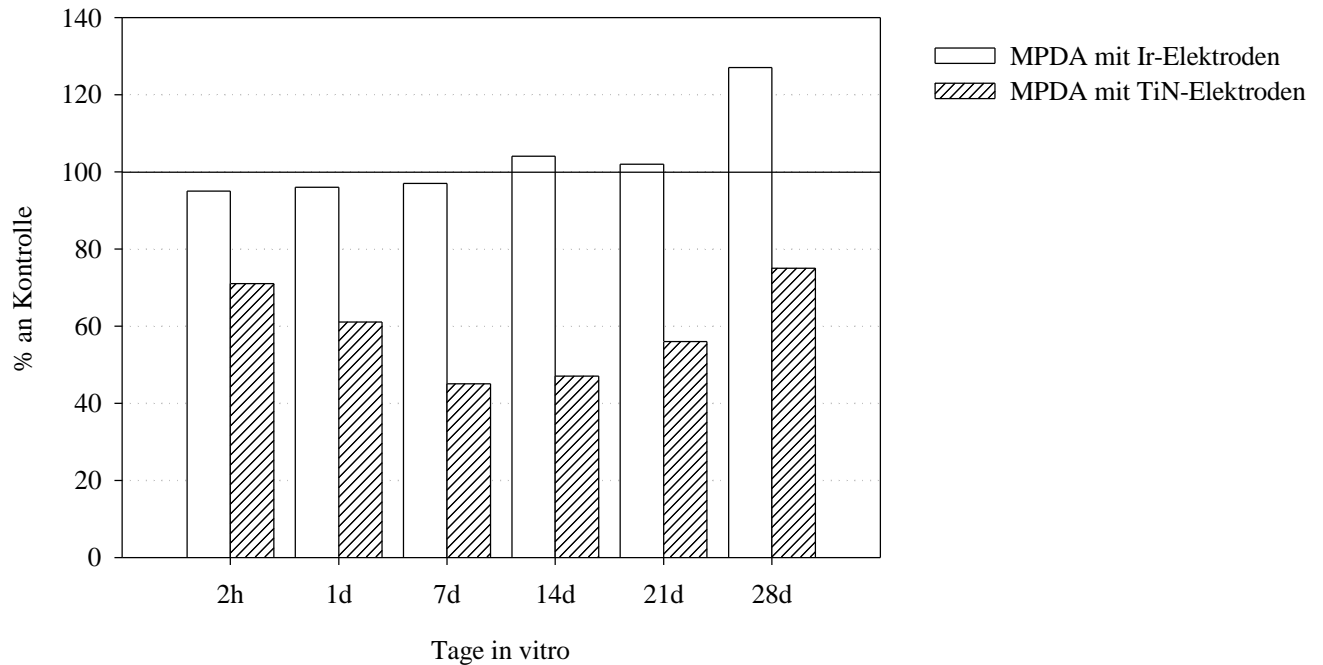


Abb. 3.10 : Zelladhäsion auf MPDAs mit Ir- bzw. TiN-Elektroden (N=1, n=2) in Relation zum Kontrollsubstrat

Auf den MPDAs mit Ir-Elektroden hafteten im Vergleich zum Kontrollsubstrat nach 2 Stunden 95%, nach einem Tag 96%, nach 7 Tagen 97%, nach 14 Tagen 104%, nach 21 Tagen 102% und nach 28 Tagen 127% der Zellen an.

Auf den MPDAs mit TiN-Elektroden lag die Zahl der adhärierenden Zellen dagegen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger als auf dem Kontrollsubstrat. Nach 2 Stunden sind 71%, nach einem Tag 61%, nach 7 Tagen 45%, nach 14 Tagen 47%, nach 21 Tagen 56% und nach 28 Tagen 75% der Zellen nachweisbar.

### 3.2.5 Wirkung von Titannitrid (TiN) und Siliziumnitrid (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) auf die Adhäsion retinaler Zellen auf Deckgläsern (Kontrollsubstrat)

Sowohl auf MPDAs mit TiN-Elektroden als auch auf reinem TiN adhärten signifikant weniger Zellen als auf den Kontrollsubstraten. Zur Prüfung, ob diese Reduktion ein Kontaktproblem ist oder die TiN-Träger lösliche, toxische Produkte in das Medium abgeben, wurden TiN-Träger und Kontrollsubstrat in ein Petrischälchen gelegt, beschichtet und in Kultur genommen. Zum Vergleich wurde dieser Versuch auch mit Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> durchgeführt.

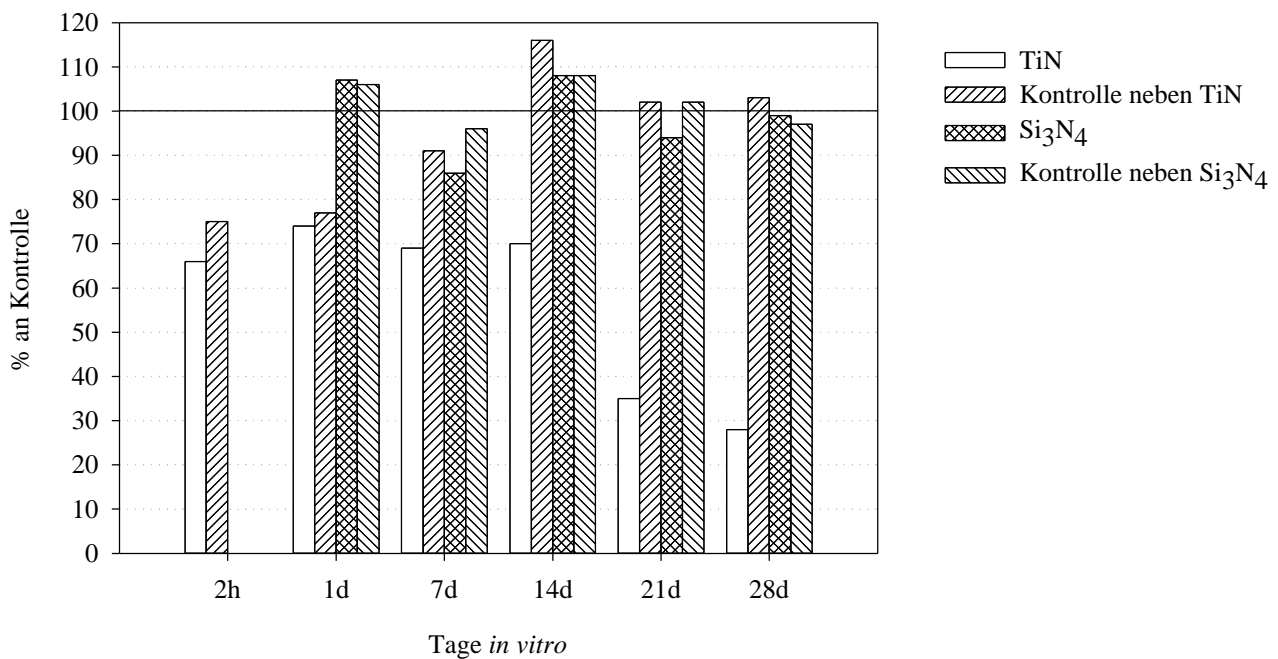


Abb. 3.11 : Zelladhäsion auf TiN und Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> und den jeweiligen Kontrollsubstraten neben den Materialträgern (N=1, n=2)

Wie Abb. 3.11 zeigt, lag auf TiN die Zellzahl im Vergleich zum Kontrollsubstrat bis zum Tag 14 bei 66, 74, 69 und 70%, bis zum Tag 28 nahm sie bis auf 28 % ab. Auf dem Kontrollsubstrat im gleichen Petrischälchen war die Zelladhäsion innerhalb des ersten Tages signifikant ( $p < 0,001$ ) geringer im Vergleich zum Kontrollsubstrat in einem



separaten Petrischälchen. Ab dem Tag 7 allerdings lag die Adhäsion mit 91%, 116%, 102% und 103% jedoch im Bereich der Kontrolle ( $p > 0,05$ ). Die deutliche Reduktion der Zellzahl auf TiN wurde daher nicht durch diffundible Faktoren verursacht.

Die Zellzahl auf  $\text{Si}_3\text{N}_4$  und dem Kontrollsubstrat neben  $\text{Si}_3\text{N}_4$  wurde erst ab Tag 1 erfaßt. Nach einem Tag wurden im Vergleich zum Kontrollsubstrat in separaten Petrischälchen 107 bzw. 106%, nach 7 Tagen 86 bzw. 96%, nach 14 Tagen in beiden Fällen 108%, nach 21 Tagen 94 bzw. 102 % und nach 28 Tagen 99 bzw. 97% der Zellen nachgewiesen. Zwischen der Zellzahl auf dem Kontrollsubstrat neben  $\text{Si}_3\text{N}_4$  und der Zellzahl auf dem Kontrollsubstrat in separaten Petrischälchen bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.6 Adhäsion retinaler Zellen auf Titannitrid (TiN) mit kovalent gebundenem Poly-L-Lysin (PLL)

Der Grund für eine verminderte Adhäsion auf TiN könnte auch eine geringere Haftungsfähigkeit des Poly-L-Lysins am TiN-Substrat und damit eine suboptimale Beschichtung sein. Daher wurden am NMI/Reutlingen TiN-Träger mit kovalent gebundenem Epoxysilan/Poly-L-Lysin hergestellt. Zur Sterilisation wurden die Proben über Nacht in Ethanol reinst gelegt, mit sterilem Aqua bidest gespült und unter der Sterilbank getrocknet. Zum Vergleich wurden auch herkömmliche mit Poly-L-Lysin beschichtete TiN-Träger verwendet.

Auffallend war nach einem Tag in vitro die Bildung von Zellinseln, die sich bis zum Tag 28 noch verstärkte. Die Nervenzellen siedelten sich auf den Gliazellen an, einzelne Nervenzellen oder Nervenzellverbände ohne Gliabeteiligung waren auf dem Substrat nicht anzutreffen.

Abb. 3.12 stellt vergleichend die Mittelwerte der Gesamtzellzahlen  $\pm$  Standardabweichung ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) /  $\text{mm}^2$  auf Deckgläsern (Kontrollsubstrat), TiN-Trägern, die über Nacht mit Poly-L-Lysin (PLL) inkubiert wurden und auf TiN-Trägern mit kovalent gebundenem PLL dar. Der Verlauf der Zelladhäsion auf dem Kontrollsubstrat entspricht dem in Abb. 3. 2. Im Zeitraum von 2h bis 28 Tagen nahm die Gesamtzellzahl auf dem Kontrollsubstrat um 38% ab.

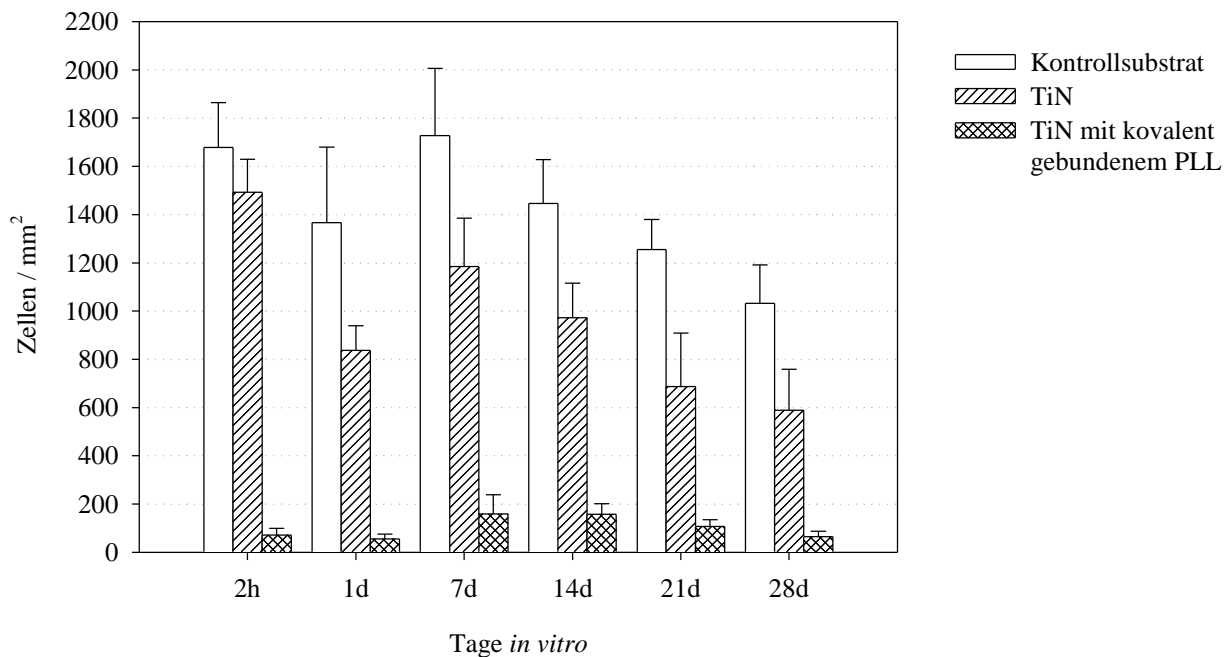


Abb. 3.12 : Gesamtzellzahl / mm<sup>2</sup> auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern (Kontrollsubstrat) und TiN-Trägern und auf TiN-Trägern mit kovalent gebundenem Poly-L-Lysin (PLL);  $\bar{x} \pm SD$  (N=1, n=2)

Im Vergleich zum Kontrollsubstrat adhärten auf PLL-beschichtetem TiN nach 2 Stunden 89%, nach einem Tag 61%, nach 7 Tagen 69%, nach 14 Tagen 67%, nach 21 Tagen 58% und nach 28 Tagen 57% der Zellen.

Auf den TiN-Trägern mit kovalent gebundenem PLL war die Zelladhäsion im Vergleich sowohl zum Kontrollsubstrat als auch zu den mit PLL beschichteten TiN-Trägern signifikant reduziert (jeweils  $p < 0,001$ ). In dem Zeitraum von 2 Stunden zu 28 Tagen lag die Adhäsion im Vergleich zum Kontrollsubstrat bei 4, 3, 9, 11, 9 und 6% und im Vergleich zu den mit PLL beschichteten TiN-Trägern bei 5, 7, 13, 16, 16, und 11%.

### 3.3 Zelltypspezifizierung der adhärierenden Zellen

Um den Anteil der verschiedenen Netzhautzelltypen in einer Kultur zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst auf Deckgläsern kultiviert, nach einem Tag fixiert, immunocytochemisch angefärbt und ausgewertet. Es wurden Tiere im Alter von 10 Tagen verwendet, da zu diesem Zeitpunkt alle Retinazelltypen morphologisch identifizierbar sind. Die jeweiligen Mittelwerte aus zwei Ansätzen wurden zu einem Gesamtmittelwert zusammengefaßt und es ergab folgende Anteilswerte der immunreaktiven Zellen an der Gesamtzellzahl :

Antikörper	Anteilswerte	Identifizierbare Zelltypen
Anti-Protein Kinase C	9,0 ± 2,2%	Stäbchen-Bipolarzellen
Anti-Gamma-Aminobuttersäure	7,2 ± 2,9%	Amakrinzellen
Anti-Parvalbumin	1,1 ± 0,2%	Amakrinzellen
Anti-Calretinin	2,6 ± 0,5%	Amakrin- und Ganglienzellen
Anti-Calbindin	< 0,1%	Amakrin-, Horizontal- und Ganglienzellen
Anti-Neurofilament 200	0 %	Ganglienzellen

Tab. 3.1 : Anteil der immunocytochemisch markierten Zellen an der Gesamtzellzahl in % ( $\bar{x} \pm SD$ )

Den größten Anteil der Zellen in Kultur stellen die Photorezeptoren dar, die aber *in vitro* nicht immunocytochemisch identifiziert werden konnten.

Da bei Verwendung von 10 Tage alten Tieren die Primärkulturen im Laufe der ersten Woche zugrunde gehen, mußten, um eine Evaluierung über einen längeren Zeitraum durchführen zu können, jüngere Tiere verwendet werden. In diesen Kulturen lassen sich die Bipolarzellen allerdings nicht durch eine Immunreaktion mit Anti-Protein Kinase C darstellen.

Aufgrund der begrenzten Menge an Materialträgern wurde eine Zellspezifizierung nur auf den beiden Elektrodenwerkstoffe TiN und Ir und nur mittels Anti-Gamma-Aminobuttersäure und Anti-Calretinin vorgenommen.

Im ersten Versuch wurde ein 9 Tage altes Tier (P9) zur Herstellung einer Zellkultur verwendet. Nach 7 Tagen war der Zellverlust sowohl auf der Kontrolle als auch auf den Testsubstraten allerdings so hoch, daß der Versuch nicht fortgesetzt wurde. In zwei weiteren Versuchen wurden 5 Tage alte Tiere (P5) verwendet, und die Kultur konnte über 4 Wochen erfolgreich aufrecht erhalten werden. Die Zellen auf den Kontrollen bzw. Testsubstraten wurden nach 1, 7, 14, 21 und 28 Tagen fixiert, immunocytochemisch spezifiziert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

Nach einem Tag war eine deutliche Markierung vereinzelter Zellen mit Anti-Gamma-Aminobuttersäure (GABA) bzw. mit Anti-Calretinin erkennbar. Der Hintergrund war wie in der Kontrolle des sekundären Antikörpers sehr schwach angefärbt. Nach 7 und 14 Tagen zeigten ca. 80% der Nervenzellen und die Gliazellen unterschiedlich starke Signale, nach 21 und 28 Tagen war eine deutliche Immunreaktion nicht mehr erkennbar. Der Grund liegt vermutlich in der Dedifferenzierung der Zelltypen in Kultur. Daher konnte eine quantitative Erfassung der immunocytochemisch markierten Zellen nur nach dem ersten Tag vorgenommen werden. Es wurden pro Gesichtsfeld die Gesamtzellzahl und die Anzahl der immunocytochemisch markierten Zellen ermittelt und in Relation gesetzt (Gesamtzellzahl=100%). Die Anteilswerte der markierten Zellen aus 10 Gesichtsfeldern / 2 Deckgläsern bzw. 2 Materialträgern wurden gemittelt und sind in den Tab. 3.2 und Tab. 3.3 angegeben.

### 3.3.1 Adhäsion Anti-Gamma-Aminobuttersäure (GABA) markierter Zellen auf Titanitrid (TiN) und Iridium (Ir)

Auf TiN war der Anteil GABAerger Zellen im Vergleich zum Kontrollsubstrat in allen Versuchen vermindert, auf Ir lag der Anteil in allen Versuchen höher als auf dem Kontrollsubstrat. Bei P9 zeigte der Vergleich zwischen Kontrollsubstrat und TiN bzw. Ir keinen signifikanten Unterschied. Bei P5 zeigte der Vergleich von Kontrollsubstrat und TiN einen sehr signifikanten ( $p < 0,01$ ) Unterschied, der Anteil auf Ir war im Vergleich zur Kontrollsubstrat sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht (s.a. Tab. 3.2).

Altersstadium	Kontrollsubstrat	TiN	Ir
P 9	5,51 ± 1,1	5,09 ± 1,7	5,81 ± 1,0
P 5	3,44 ± 0,6	2,87 ± 0,6	4,17 ± 1,0

Tab. 3.2 : Anteil der mit **Anti-Gamma-Aminobuttersäure** markierten Zellen an der Gesamtzellzahl nach 24 Stunden in % ( $\bar{x} \pm SD$ )

### 3.3.2 Adhäsion Anti-Calretinin markierter Zellen auf Titannitrid (TiN) und Iridium (Ir)

Aus Tab. 3.3 wird ersichtlich, daß in allen Versuchen der Anteil der Anti-Calretinin-positiven Zellen im Vergleich zum Kontrollsubstrat auf TiN vermindert und auf Ir erhöht war. Bei P9 waren die Unterschiede zur Kontrolle nicht signifikant. Bei P5 war im Vergleich zum Kontrollsubstrat der Anteil auf TiN signifikant ( $p < 0,05$ ) vermindert, der Anteil auf Ir signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht.

Altersstadium	Kontrollsubstrat	TiN	Ir
P 9	2,74 ± 0,7	2,61 ± 0,7	2,91 ± 0,6
P 5	2,40 ± 0,4	2,10 ± 0,5	2,93 ± 0,7

Tab. 3.3 : Anteil der mit **Anti-Calretinin** markierten Zellen an der Gesamtzellzahl nach 24 Stunden in % ( $\bar{x} \pm SD$ )

Sowohl GABAerge als auch Anti-Calretinin-positive Subtypen der Amakrinzellen zeigten nach einem Tag *in vitro* ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten auf den verschiedenen Substraten. Dabei bevorzugten diese Zelltypen in absteigender Reihenfolge Iridium, Deckgläschen (Kontrollsubstrat) und Titannitrid.

### 3.4 Konzentrationsabhängige Hemmung der Gliazellproliferation durch Zugabe von Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) in die Poly-L-Lysin-Beschichtung

In einem Kontrollversuch wurden je 2 Deckgläser mit Poly-L-Lysin (PLL) pur oder einer PLL-Lösung mit ARAC-Beimischung von 10 $\mu$ M beschichtet, für die Präparation verwendet und jeweils nach 3 und 7 Tagen fixiert. Die Dichte der Gliazellen / mm<sup>2</sup> wurde ermittelt und ist in Tab. 3.4 angegeben.

Tage <i>in vitro</i>	PLL pur	PLL + 10 $\mu$ M ARAC
3	263 $\pm$ 12	247 $\pm$ 20
7	553 $\pm$ 23	480 $\pm$ 12

Tab. 3.4 : Gliazellen / mm<sup>2</sup> auf PLL pur und PLL mit Zugabe von 10  $\mu$ M ARAC nach 3 bzw. 7 Tagen *in vitro* ( $\bar{x} \pm SD$ )

Beim Vergleich zwischen einer reinen PLL-Beschichtung und einer PLL-Beschichtung mit 10 $\mu$ M ARAC konnte nach 3 Tagen keine signifikante Veränderung, nach 7 Tagen jedoch eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion in der Zahl der Gliazellen ermittelt werden. In drei weiteren Versuchen wurden zusätzlich Beimischungen von 20,40 und 160  $\mu$ M ARAC verwendet, jeweils nach 3, 7 und 14 Tagen fixiert und wie oben ausgewertet. Abb. 3.10 zeigt den Verlauf des Gliawachstums auf der reinen PLL-Beschichtung und auf den PLL-Beschichtungen mit ARAC-Beimischungen in unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Gliazellzahl war mit steigender ARAC-Konzentration reduziert (Abb. 3.13). Nach 3 Tagen in Kultur war der Unterschied zwischen reinem PLL und den verschiedenen ARAC-Konzentrationen nicht signifikant. Nach sieben Tagen war die Reduktion der Gliazellzahl im Vergleich zur reinen PLL-Beschichtung in allen Fällen signifikant: 10 $\mu$ M ARAC :  $p \leq 0,05$ , 20 $\mu$ M ARAC :  $p \leq 0,01$ , 40 und 160  $\mu$ M ARAC :  $p \leq 0,001$ .

Über den Tag 7 hinaus kam es in allen Fällen zu einer Abnahme der Gliazellzahl. Ein weiterer Vergleich mit der reinen PLL-Beschichtung nach 14 Tagen ergab schon ab

einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ARAC eine hochsignifikante Reduktion ( $p \leq 0,001$ ) der Gliazellzahl.

In den Zellkulturen zur Evaluierung der Zelladhäsion auf den Deckgläsern (Kontrollsubstrat), MPDAs bzw. Einzelwerkstoffen wurde die Gliaproliferation durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ARAC/ml in das Medium nach 4 Tagen *in vitro* gehemmt. Die Gliazellzahl lag nach 7 Tagen bei  $563 \pm 67$  und nach 14 Tagen bei  $412 \pm 39$ . Das entspricht dem Versuch mit 40  $\mu\text{M}$  ARAC in der PLL-Beschichtung.

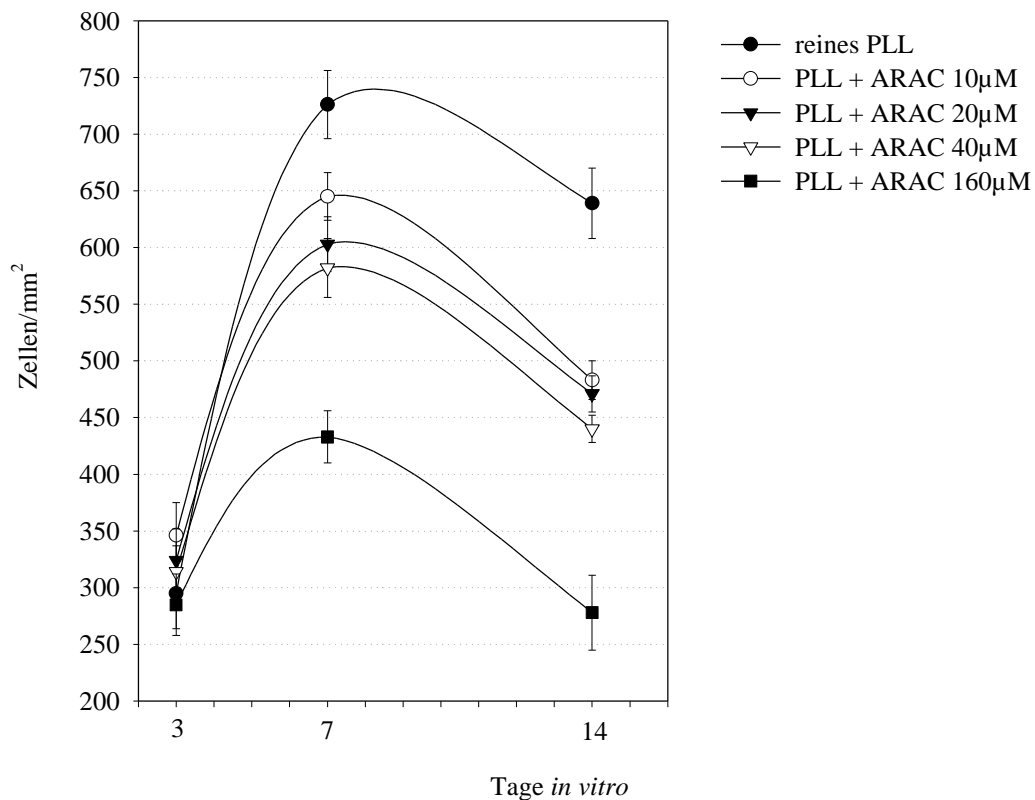


Abb. 3.13 : Reduktion der Gliaproliferation durch Zugabe des Mitosehemmers ARAC in die Poly-L-Lysin-Beschichtung;  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  (N=3, n=6  $\square$  30 Gesichtsfeldern)

### Effekt des Mitosehemmers Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) auf Nervenzellen

Während bis Tag 7 die Zelldichte der Gliazellen durch Zellteilung auch in Anwesenheit von ARAC noch anstieg, reduzierte sich die Nervenzellzahl von Anfang an sukzessiv. Bei Betrachtung der Verluste auf den einzelnen verschiedenen Beschichtungen ist festzustellen, daß im Zeitraum von Tag 3 zu Tag 7 mit Zunahme der ARAC-Konzentration die Verlustrate der Nervenzellen abnahm. So lag die Verlustrate der Nervenzellen auf der reinen PLL-Beschichtung bei 18 % und bei der Beschichtung mit 160µM ARAC bei 11 %. Auf der reinen PLL-Beschichtung kann es durch die ungehemmte Proliferation der Gliazellen zu einer Verdrängung der Nervenzellen (18 %) gekommen sein. Im Zeitraum von Tag 7 zu Tag 14 dagegen stand die Abnahme der Nervenzellen nicht mehr im Zusammenhang mit der ARAC-Konzentration in der Beschichtung. Die Verlustrate auf der reinen PLL-Beschichtung lag bei 11 %, auf 10µM bei 7 %, auf 20µM bei 9 %, auf 40µM bei 8 % und auf 160µM bei 19 %. Die hohe Verlustrate von 19 % Nervenzellen könnte auf einen toxischen Effekt von hohen ARAC-Konzentrationen hinweisen.



## 4. DISKUSSION

### 4.1 Biokompatibilität der Einzelwerkstoffe

#### 4.1.1 Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) und Siliziumnitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )

Auf den Isolatormaterialien  $\text{SiO}_2$  und  $\text{Si}_3\text{N}_4$  ist die Adhäsion retinaler Zellen *in vitro* über den Zeitraum von 4 Wochen vergleichbar mit der auf den Kontrollsubstraten (Deckgläsern). Die Prüfung der Bioverträglichkeit von  $\text{SiO}_2$  und  $\text{Si}_3\text{N}_4$  *in vivo* und *in vitro* wurde bisher vor allem in Pulver- bzw. Faserform unter dem Aspekt der Silikose bzw. Asbestose vorgenommen (Chen et al, 1991; Lesur et al, 1992; Driscoll et al, 1991; Svensson et al, 1997 ; Fisher et al, 1989). Die Zelladhäsion und das Wachstum von menschlichen Erythrocyten und Pheochromocytomazellen der Ratte ist auf  $\text{SiO}_2$  und Glas vergleichbar gut (Grattarola et al, 1988). Corey und Mitarbeiter (1997) stellten fest, daß B104 Neuroblastoma-Zellen unbeschichtete Deckgläser  $\text{SiO}_2$ -beschichteten Deckgläsern vorziehen. Sogawa (1981) konnte keinen ungünstigen Effekt von  $\text{SiO}_2$  auf Wachstum und Morphologie kultivierter Zellen nachweisen. Howlett und Mitarbeiter (1989) betrachteten  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , nach Prüfung mit Knochenmark-Stromazellen *in vitro* und nach Implantation in die Knochenmarkshöhle des Oberschenkels beim Kaninchen, als biokompatibel.

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit lassen für die Bioverträglichkeit dieser Materialien für retinale Zellen auf das gleiche Resultat schließen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensrate von Nerven- und Gliazellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

#### 4.1.2 Polyimid

Auf Polyimid ist die Adhäsion retinaler Zellen bereits nach 2 Stunden im Vergleich zur Kontrolle um 22% reduziert, wobei sich die Zellzahl im weiteren Verlauf im Vergleich zum Kontrollsubstrat allerdings nicht weiter verändert. Die Abnahme der Zellen auf Polyimid über den Zeitraum von 4 Wochen entspricht also dem Zellverlust auf der Kontrolle. Ein negativer Einfluß von Polyimid auf das Zellüberleben im Verlauf der 4 Wochen ist auszuschließen, allerdings scheinen sich insgesamt weniger Zellen anzuheften. Da Polyimide relativ hydrophob sind, könnte eine mangelnde Beschichtung mit Poly-L-Lysin die Erklärung für die reduzierte Zelladhäsion in der vorliegenden Arbeit sein. Richardson und Mitarbeiter (1993) testeten Polyimide *in vitro*. Auf Polyimid wuchsen sowohl Fibroblasten als auch „bovine aortic endothelial cells“ und es konnte kein schädlicher Effekt festgestellt werden. Schmidt und Mitarbeiter (1993) stellten nach Implantation von siliziumbasierenden Elektrodenarrays in den Cortex von Katzen bei Beschichtung mit Polyimid eine geringere Gliosis und Einkapselung im Vergleich zu unbeschichteten Arrays fest. In der vorliegenden Arbeit war das Verhältnis Nervenzellen zu Gliazellen auf Polyimid signifikant zugunsten der Gliazellen verschoben. Der Befund von Schmidt und Mitarbeitern (1993) ließ sich somit nicht bestätigen.

#### 4.1.3 Iridium (Ir)

Sowohl auf Iridium (Ir) als auch auf den MPDAs mit Ir-Elektroden wurde eine vergleichbar gute Zelladhäsion und Überlebensrate wie auf dem Kontrollsubstrat festgestellt. Auch das Verhältnis Nervenzellen zu Gliazellen liegt auf Ir im Bereich der Kontrollwerte. Ignatius und Mitarbeiter (1998) testeten die Zelladhäsion und das Wachstum embryonaler ZNS-Zellen des Huhnes *in vitro* auf verschiedenen Metallen, die mit Poly-D-Lysin bzw. Poly-D-Lysin/Laminin beschichtet waren. Unter anderem war auf Iridium eine gute Zelladhäsion und ein exzellentes Wachstum von Nervenzellen und Nicht-Nervenzellen im Vergleich zu Glas zu beobachten. In Implantationsversuchen wurden unterschiedliche Reaktionen auf Iridium festgestellt.

Woodford und Mitarbeiter (1996) implantierten Ir-Elektroden in das sakrale Rückenmark von Katzen und nach 2 Wochen bzw. 3 Monaten konnte durch histopathologische Auswertung axonale Degeneration in der weißen Substanz und Nervenzellverlust in der grauen Substanz mit aseptischem Entzündungsgeschehen rund um die Elektroden nachgewiesen werden. Agnew und Mitarbeiter (1986) implantierten Platin-30%Iridium-Elektroden bzw. Elektroden aus aktiviertem Iridium in den Cortex von Katzen. Bei Pulsung mit 10-80  $\mu\text{A}$  konnte bei beiden Elektroden-Typen nach 24 bzw. 162 Stunden keine Zellschädigung beobachtet werden. Bei einer Pulsung mit 320  $\mu\text{A}$  zeigte sich bei der Platin-30%Iridium-Elektrode im Gegensatz zur Ir-Elektrode eine Zellschädigung. Niparko und Mitarbeiter (1989) wiesen nach Implantation von Platin-Iridium-Elektroden in das ZNS von Meerschweinchen histologisch zwar eine verstärkte Gliaproliferation rund um die Elektroden nach, sie konnten jedoch weder einen Nervenzellverlust, einen Effekt auf die Morphologie der Zellen noch das Auftreten von reaktiven Zellen beobachten. Guarda und Mitarbeiter (1982) zeigten, daß Platin-Iridium-Elektroden im Endokard des Schafes nur schlecht fixiert werden können und zu einer chronischen Entzündung und dicken Kapselbildung führen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluß zu, daß Iridium als Elektrodenmaterial für eine Netzhautprothese verwendet werden kann.

#### 4.1.4 Titannitrid (TiN)

Die Zelladhäsion auf dem TiN-Substrat und auf den Mikrophotodioden-Arrays mit TiN-Elektroden ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Nach 28 Tagen adhärten auf den TiN-Trägern mit  $46\pm 16\%$  weniger als die Hälfte der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Suka (1986) ermittelte in Organkulturen und Tierexperimenten eine bessere Biokompatibilität von TiN-beschichtetem rostfreiem Stahl im Vergleich zu unbeschichtetem rostfreiem Stahl. Die Reaktionen auf subkutane Implantation in Ratten waren bei TiN und Hydroxylapatit weniger stark im Vergleich zu  $\text{TiO}_2$  und purem Titan. Nach 84 Tagen waren alle implantierten Materialien eingekapselt und es zeigte sich keine aktive Proliferation mehr. Im Vergleich zu Hydroxylapatit war die Dicke der Kapselmembran um TiN jedoch signifikant geringer (Satomi et al, 1988). Eine zu einem „Silicone elastomer“ vergleichbar gute Hämoverträglichkeit von TiN stellten Dion &

Roques (1992) und Dion & Rouais (1992) fest. Die hämolytische Aktivität von TiN ist so gering, daß TiN in diesen Versuchen als nicht toxisch betrachtet werden kann. Im Vergleich zu Ti-6Al-4V- und Ti-5Al-2.5Fe-Legierungen wurde bei den Legierungen mit „nitrogen implantation“ keine Reduktion, bei Beschichtung dieser Legierungen mit TiN durch „plasma diffusion treatment“ (PDT) bzw. durch „plasma-assisted chemical vapour deposition“ (PACVD) eine signifikante Reduktion von Zellproliferation und Lebensfähigkeit von humanen Fibroblasten und Osteoblasten *in vitro* festgestellt (Bordji et al, 1996). Die Ursache dafür sehen Bordji und Mitarbeiter in der rauheren und unregelmäßigeren Oberflächentopographie der mit der PDT- bzw. PACVD-Technik behandelten Legierungen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Einzelwerkstoff TiN wurde mit einer „chemical vapour deposition“-Technik hergestellt. Für die drei Versuchsansätze wurden TiN-Substrate aus drei verschiedenen Chargen verwendet. Die hohe Standardabweichung (s.3.2.2) ist daher mit einer eventuell variierenden Oberflächenstruktur zu erklären.

Das Verhältnis Nervenzellen zu Gliazellen zeigt auf TiN eine signifikante Verschiebung zugunsten der Nervenzellen im Vergleich zu dem Verhältnis auf dem Kontrollsubstrat. Die Gliazellen geben auf TiN ihre Adhäsion in stärkerem Maße auf und lösen sich ab. Da die Nervenzellen sich teilweise auf den Gliazellen ansiedeln, fehlt einerseits der direkte Kontakt zur Probe, andererseits werden sie mit den sich ablösenden Gliazellen aufgeschwemmt. Dadurch reduziert sich auch die Nervenzellzahl stärker als auf der Kontrolle. Ob TiN eine Gliose *in vivo* unterdrücken würde, ist mit Implantationsversuchen histologisch abzuklären.

Die Überführung von TiN und Kontrollsubstraten in dasselbe Petrischälchen zeigte, daß TiN aber keine löslichen Produkte in das Medium abgab. Wisbey und Mitarbeiter (1987) untersuchten die Korrosionseigenschaften von TiN-beschichteten Co-Cr-Mo-Legierungen und unbeschichteten Co-Cr-Mo-Legierungen *in vitro*. Nach 550 Stunden in 0,17 M NaCl +  $2,7 \times 10^{-3}$  M EDTA bei 37°C war zwar die Auslösung von Co-, Cr- und Mo-Ionen aus den beschichteten Legierungen geringer als aus den unbeschichteten, die TiN-Beschichtung selbst zeigte aber eine Auslösung von über  $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Titan-Ionen. Evans (1993) zeigte, daß Titan in einer Partikelgröße von 49  $\mu\text{m}$  auf Fibroblasten *in*

*vitro* keinen, in einer Partikelgröße von 14 µm einen signifikant zellschädigenden Einfluß hat. Sind die Partikel durch eine Mikroporenmembran von den Zellen getrennt, ist keine Zellschädigung erkennbar. In das Medium abgegebene Titan-Ionen führen also in unseren Kulturen zu keiner Zellschädigung.

Verantwortlich für die reduzierte Zellzahl auf TiN könnte auch eine ungenügende Beschichtung mit Poly-L-Lysin sein. Die kovalente Anbindung von Poly-L-Lysin über Epoxysilan konnte die Zelladhäsion retinaler Zellen *in vitro* nicht verbessern, vielmehr konnten nur bis zu 16% der Zellen, im Vergleich zur Poly-L-Lysin-Beschichtung durch Inkubation über Nacht, adhären. Allerdings wurde zur Beschichtung Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht von 70.000-150.000, zur kovalenten Anbindung Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht von 15.000-30.000 verwendet. Da die Adhäsion der Zellen an Poly-L-Lysin mit steigendem Molekulargewicht zunimmt, könnte die Verwendung des niedermolekularen Poly-L-Lysins zur kovalenten Anbindung für die geringe Adhäsion maßgeblich sein.

#### 4.2 Biokompatibilität der Mikrophotodioden-Arrays (MPDAs)

Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit der teuren, funktionstüchtigen Mikrophotodioden-Arrays konnte jeweils nur ein Versuchsansatz mit je zwei Mikrophotodioden-Arrays pro Untersuchungszeitpunkt (N=1, n=2) durchgeführt werden. Die Aussagekraft dieser Versuche ist daher kritisch zu betrachten. Im Vergleich mit den Ergebnissen auf den Einzelwerkstoffen Ir und TiN ist das Ergebnis allerdings interpretierbar. Die Zelladhäsion auf den Mikrophotodioden-Arrays zeigt eine Abhängigkeit vom Elektrodenmaterial. Auf Mikrophotodioden-Arrays mit Ir-Elektroden ist im Vergleich zum Kontrollsubstrat eine vergleichbar gute Adhäsion der retinalen Zellen beobachtet worden. Dies deckt sich mit dem Ergebnis auf dem Einzelwerkstoff Ir. Dagegen wurde auf Mikrophotodioden-Arrays mit TiN-Elektroden

eine signifikante Reduktion der Zelladhäsion (75% an Kontrolle nach 4 Wochen) festgestellt, die allerdings im Vergleich zum Einzelwerkstoff TiN ( $46\pm 16\%$  an Kontrolle nach 4 Wochen) nicht so stark ausfällt. Ein Grund dafür ist sicherlich die geringe Oberfläche der TiN-Elektroden im Vergleich zum TiN-Reinmaterial, so daß im ersten Fall weniger Zellen der Kultur mit TiN in Kontakt standen und daher auch weniger Zellen abstarben.

#### 4.3 Immuncytochemische Spezifizierung retinaler Zellen und Anteile der Zelltypen in der Netzhaut

Barnstable (1980) und Akagawa & Barnstable (1986) charakterisierten die Zellen der Rattennetzhaut sowohl in histologischen Schnitten als auch in Monolayer-Zellkulturen mit monoklonalen Antikörpern. In der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen ProteinKinase C, Gamma-Aminobuttersäure (GABA), Parvalbumin, Calretinin, Calbindin und Neurofilament 200 verwendet, um die Nervenzellen zu identifizieren, die den Photorezeptoren nachgeschaltet sind.

Mit Anti-ProteinKinase C können Stäbchen-Bipolarzellen ab dem Tag 10 postnatal nachgewiesen werden (Zhang & Bok, 1990).

Gamma-Aminobuttersäure (GABA) ist immunhistochemisch in einer Subpopulation der Amakrinzellen und in Horizontalzellen nachweisbar (Osborne et al, 1986; Versaux et al, 1989; Lake, 1994). Akagawa & Barnstable (1986) wiesen in einer kultivierten Zellpopulation der Rattennetzhaut GABA nur in Amakrinzellen nach.

Bastianelli und Mitarbeiter (1994) wiesen immunhistochemisch ab Tag 1 postnatal Calretinin in Ganglien- und Amakrinzellen, Calbindin in Ganglien- und Horizontalzellen in der Netzhaut der Ratte nach. Baimbridge und Mitarbeiter (1992) erwähnten im Zusammenhang mit Calbindin nur Horizontalzellen. Parvalbumin ist nach Hamano und Mitarbeiter (1990) in Amakrin- und in „displaced“ Amakrinzellen nachweisbar, Calbindin in kleinen Amakrinzellen und in Horizontalzellen. Uesugi und Mitarbeiter (1991) stellten in histologischen Schnitten der Rattennetzhaut eine

Calbindin-Immunreaktion ab Tag 16 embryonal fest. Um Tag 2 postnatal ist das Maximum der immunreaktiven Ganglienzellen, zwischen Tag 4 und 10 postnatal das der Amakrinzellen erreicht. Außerdem ist ab Tag 2 postnatal Calbindin in Horizontalzellen nachweisbar. Ab Tag 17 embryonal ist in der Ganglienzellschicht eine Parvalbumin-Immunreaktion sichtbar, Amakrinzellen werden ab Tag 2 postnatal erkennbar. Bei beiden Zelltypen kommt es zu einem Maximum um den Tag 10 postnatal. Calbindin und Parvalbumin sind in Amakrinzellen unterschiedlicher Lokalisation und Morphologie enthalten und lassen damit auf unterschiedliche Subtypen schließen.

Mit Anti-Neurofilament 200 lassen sich neben Ganglienzellen auch „axon-less“ Horizontalzellen nachweisen (Akagawa & Barnstable, 1986). Peichl und Mitarbeiter (1994) berichteten aber, daß dieser Typ Horizontalzellen in der Rattennetzhaut nicht vorkommt. Möckel und Mitarbeiter (1993) konnten in Monolayer-Kulturen keine Ganglienzellen nachweisen, Akagawa und Barnstable (1986) stellten Ganglienzellen nur vereinzelt in Zellklumpen fest. Nur durch besonders konditioniertes Medium (Raju & Bennet, 1986; Armson et al, 1986) oder durch Zusatz von Wachstumsfaktoren in das Medium, z.B. Nerve Growth Factor, kann das Überleben der Ganglienzellen *in vitro* erreicht werden (Taschenberger et al, 1995).

In Bezug auf die oben genannte Literatur kann in den Monolayer-Kulturen der vorliegenden Arbeit eine Zellverteilung von 9% Stäbchen-Bipolarzellen, ca.11% Amakrinzellen und 0,1% Horizontalzellen angenommen werden. Photorezeptoren, nicht spezifizierete Amakrinzellen, Zapfen-Bipolarzellen und Gliazellen entfallen auf die rund 80% der nicht charakterisierten Zellen. Zapfen-Bipolarzellen machen *in vivo* ca. 50% aller Bipolarzellen aus, obwohl in der Netzhaut der Ratte der Anteil der Stäbchen an den Photorezeptoren ca. 99% beträgt (Euler & Wässle, 1993). Ganglienzellen konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Anteile der verschiedenen Zelltypen in der Netzhaut werden in der Literatur nur für das Kaninchen und die Maus, jedoch nicht für die Ratte angegeben. In Monolayer-Zellkulturen von 2-5 Tage alten Kaninchenretzhäuten wiesen Möckel und Mitarbeiter (1994) mittels Immunocytochemie und Autoradiographie nach 7-14 Tagen *in vitro* folgende Verteilung der Nervenzellen nach : Photorezeptoren 73,0%, Bipolarzellen 4,0%, Amakrinzellen 25% (6,5% GABAerg, 18,5% glycinerg) und Horizontalzellen

1,3%. Der Anteil der Müllerschen Gliazellen an der Gesamtzellzahl betrug unter 10%. Ganglienzellen starben aufgrund fehlendem Zusatz von neurotrophen Wachstumsfaktoren *in vitro* ab. Young (1985) stellte folgende Zellverteilung in der murenen Netzhaut der Maus fest : Photorezeptoren 74,5%, Bipolarzellen 10,3%, Amakrinzellen 8,4%, Horizontalzellen 0,3%, Ganglienzellen 2,5%, Müllersche Gliazellen 2,7% und vasculäre und perivasculäre Zellen 1,3%. Nimmt man eine ähnliche Verteilung der Zelltypen in der Rattenretina an, entspräche die Zellverteilung der identifizierten Zelltypen in der Kultur derjenigen *in vivo*.

Aufgrund der nur begrenzt verfügbaren Menge an Materialträgern wurde eine Zellcharakterisierung nur auf den beiden Elektrodenwerkstoffen TiN und Ir mit Antikörpern gegen GABA und Calretinin durchgeführt. GABA ist in Ratten ab dem Tag 2 postnatal (P2) und Calretinin ab dem Tag 1 postnatal (P1) nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit wurde ein 9 Tage altes Tier (P9) und zwei 5 Tage alte Tiere (P5) verwendet um eine Zellkultur herzustellen.

Die Anteile Anti-GABA markierter Zellen ist auf TiN im Vergleich zum Kontrollsubstrat in allen Versuchen reduziert, jedoch ist die Reduktion nur bei P5 signifikant ( $p < 0,01$ ). Auch der Anteil Anti-Calretinin markierter Zellen ist im Vergleich zur Kontrollsubstrat auf TiN reduziert. Auch in diesem Fall ist nur bei P5 ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied feststellbar.

Auf Ir liegen die Anteilswerte von Anti-GABA und Anti-Calretinin markierter Zellen höher als auf der Kontrolle, bei P5 ist der Unterschied mit beiden Antikörpern signifikant ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,05$ ).

Für Amakrinzellen stellt also Iridium das bevorzugte Material zur Adhäsion dar.



#### 4.4 Wirkung des Mitosehemmers Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) auf die Gliazellproliferation und die Lebensfähigkeit der Nervenzellen

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß durch Zugabe von Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) in die Poly-L-Lysin (PLL)-Beschichtung eine konzentrationsabhängige Reduktion der Gliaproliferation *in vitro* möglich ist.

Martin und Mitarbeiter (1990) beschreiben die Wirkung von ARAC auf postmitotische, sympathische Nervenzellen *in vitro*. Dabei reagieren die Nervenzellen vom Mesencephalon der Ratte auf Konzentrationen von  $>10\mu\text{M}$  ARAC im Medium ähnlich wie auf eine Nerve Growth Factor-Deprivation und sterben ab, bei Konzentrationen von  $\leq 10\mu\text{M}$  bleiben sie gesund. Nervenzellen des Huhns sterben schon ab einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  (Wallace & Johnson, 1989).

Da in der vorliegenden Arbeit die Beschichtungslösungen wieder abgezogen und einmal mit PBS gewaschen wurde, blieb ein nicht meßbarer Bruchteil der eingesetzten ARAC-Menge als Beschichtung zurück.

Die starke Zunahme der Gliazellen zwischen Tag 3 und Tag 7 auf der reinen PLL-Beschichtung hatte eine Verdrängung der Nervenzellen zur Folge. Die Unterdrückung der Gliazellproliferation durch Einmischung des Mitosehemmers ARAC führte zu geringeren Nervenzellverlusten. Betrachtet man den Zeitraum zwischen Tag 7 und Tag 14, war der Nervenzellverlust besonders groß auf der PLL-Beschichtung mit  $160\mu\text{M}$  ARAC (19%). Einerseits kann mit  $160\mu\text{M}$  ARAC eine für Nervenzellen toxische Konzentration erreicht worden sein, andererseits kann auch eine zu geringe Gliazell-dichte für das Absterben bzw. Ablösen der Nervenzellen verantwortlich sein. Die wechselseitigen Wirkungen von Nervenzellen und Gliazellen *in vitro* sind in der Literatur vielfach beschrieben. Liesli und Mitarbeiter (1983; 1986) berichteten, daß Astrocyten die extrazellulären Matrixproteine (ECM) Fibronectin und Laminin produzieren. Tomaselli und Mitarbeiter (1986) beschrieben zwei verschiedene Interaktionen von Nervenzellen mit Gliazellen im ZNS : 1. adhäsive Proteine der ECM und ECM-Rezeptoren auf den Nervenzellen und 2. Makromoleküle auf Nicht-

Nervenzellen und nicht charakterisierte Rezeptoren auf Nervenzellen. Kljavin & Reh (1991) stellten fest, daß Photorezeptorzellen das stärkste Neuritenwachstum auf Müllerschen Gliazellen und Astrocyten im Vergleich zu Collagen, Laminin u.a. zeigen. Noble und Mitarbeiter (1984) zeigten, daß ZNS-Nervenzellen Gliazellen, andere Nervenzellen bzw. andere Nicht-Gliazellen in absteigender Reihenfolge zur Adhäsion bevorzugen.

Die Abnahme der Gliazellzahl im Zeitraum von Tag 7 bis Tag 14 spiegelt das beschränkte Proliferationspotential der Gliazellen wieder und wird ebenfalls von Bähr (1991) beschrieben. Er stellte eine Abnahme retinaler Gliazellen nach 9 Tagen *in vitro* fest. Rogister und Mitarbeiter (1990) wiesen nach, daß kultivierte Nervenzellen einen Hemmstoff für Astrocyten (Astrostatin) abgeben.

#### 4.5 Ausblick

Die Evaluierung der Zelladhäsion kultivierter Netzhautzellen der Ratte auf den Mikrophotodioden-Arrays und den Einzelwerkstoffen ist als ein Kriterium unter vielen zur Beurteilung der Biokompatibilität zu betrachten. Die Europäische Union hat zur Prüfung der Biokompatibilität von Medical- und Dentalprodukten und Werkstoffen die Europäische Norm EN 30993 : Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 1 bis 16 herausgegeben, die der Deutschen Industrienorm (DIN) ISO 10993-1-16 entspricht. Eine Prüfung des subretinalen Implantats nach dieser Norm wird noch durchzuführen sein.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß retinale Zellkulturen zur Testung der Materialverträglichkeit von Sehprothesen geeignet sind. Im Vergleich zum Kontrollsubstrat wurde auf den Isolatormaterialien Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) und Siliziumnitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) und dem Elektrodenwerkstoff Iridium (Ir) eine vergleichbar gute Zelladhäsion festgestellt. Dagegen zeigte sich eine reduzierte Zelladhäsion auf dem Isolatormaterial Polyimid und dem Elektrodenwerkstoff Titanitrid ( $\text{TiN}$ ). Da keine

zytotoxische Wirkung der Werkstoffe anzunehmen ist, könnte durch eine Optimierung der Oberflächenstruktur bzw. der Oberflächeneigenschaften die Anheftung der retinalen Zellen auch auf diesen Materialien verbessert werden.

Um eine Isolation zwischen Implantat und Nervengewebe durch Gliazellen zu unterbinden, müsste die Gliaproliferation *in vivo* unterdrückt werden. Eine mögliche Hemmung der Gliaproliferation *in vitro* durch Einmischung von Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) in die Poly-L-Lysin-Beschichtung wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Das Einbringen eines Mitosehemmers *in vivo* wird allerdings weitere klinische Tests notwendig machen.

Die von Gliazellen produzierte und für die Adhäsion der Nervenzellen notwendige extrazelluläre Matrix (ECM) müsste in Form einer Beschichtung auf das Implantat oder durch kovalente Anbindung an die Mikrophotodioden-Array-Materialien ersetzt werden. Die Weiterentwicklung einer optimalen organischen Matrix und deren Anbindung könnte die Zelladhäsion auf TiN und Polyimid ebenfalls optimieren.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Patienten mit einer progressiven Degeneration der Photorezeptorzellen der Netzhaut leiden an fortschreitender Erblindung. Mit der Implantation einer „Sehprothese“ in den subretinalen Spalt soll diesen Patienten zu einem brauchbaren Sehvermögen verholfen werden. Im Rahmen des Verbundprojektes „Subretinale Netzhautimplantate“ werden Mikrophotodioden entwickelt und hergestellt, die Licht in einen elektrischen Impuls umwandeln und über Elektroden an Nervenzellen weiterleiten können. Diese Impulsübermittlung ist abhängig von der unmittelbaren Anbindung der Nervenzellen an die Elektroden.

Ziel der vorgelegten Arbeit war 1.) die Evaluierung der Zelladhäsion und des Zellüberlebens von Säugetier-Netzhautzellen auf den Mikrophotodioden-Arrays und deren Einzelmaterialien *in vitro*, 2.) die Zellspezifizierung der adhärierenden Nervenzellen und 3.) die Prüfung des Einflusses des Mitosehemmers Arabinosylcytosin-Hydrochlorid auf die Gliazellproliferation. Dazu wurden dissoziierte Netzhäute neugeborener Ratten verwendet, als Monolayer-Kulturen angelegt und bis zu 4 Wochen erhalten. Durch Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen und immunocytochemischen Methoden wurden die Zellen spezifiziert und die Zellzahl jede Woche ermittelt.

Im Vergleich zur Zelladhäsion auf dem Kontrollsubstrat (Deckgläsern) wurde auf den Mikrophotodioden-Arrays mit Iridium-Elektroden sowie auf den Einzelwerkstoffen Iridium, Siliziumdioxid und Siliziumnitrid keine signifikante Reduktion der Zelladhäsion festgestellt.

Dagegen ist die Zelladhäsion auf Mikrophotodioden-Arrays mit Titanitrid-Elektroden und den Einzelwerkstoffen Titanitrid und Polyimid von Beginn an reduziert und die Zahl der überlebenden Zellen nimmt über einen Zeitraum von 4 Wochen signifikant ab.

Das Einbringen des Einzelwerkstoffes Titannitrid und des Kontrollsubstrats in dasselbe Petrischälchen führten zu keiner signifikanten Reduktion der Zellzahl auf dem Kontrollsubstrat nach 4 Wochen. Daraus läßt sich schließen, daß Titannitrid keine löslichen toxischen Produkte in das Medium abgibt.

Eine Verbesserung der Zelladhäsion durch kovalente Anbindung von Poly-L-Lysin über Epoxysilan an das Titannitrid-Substrat konnte nicht erreicht werden.

Amakrinzellen zeigten nach einem Tag *in vitro* ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten auf den verschiedenen Substraten. Dabei bevorzugten diese Zelltypen in absteigender Reihenfolge Iridium, Deckgläschen (Kontrollsubstrat) und Titannitrid.

Eine konzentrationsabhängige Reduktion der Gliazellproliferation durch Einmischung des Mitosehemmers Arabinosylcytosin-Hydrochlorid (ARAC) in die Poly-L-Lysin-Beschichtung ist möglich. Während nach drei Tagen *in vitro* noch keine signifikante Unterschiede erkennbar waren, wurde nach 7 Tagen *in vitro* mit steigender ARAC-Konzentration eine signifikante Reduktion der Gliazellproliferation und niedrigere Nervenzellverluste festgestellt.

Die Evaluierung der Zelladhäsion auf den Mikrophotodioden-Arrays und deren Einzelwerkstoffen ist als ein Kriterium unter vielen zur Beurteilung der Biokompatibilität *in vitro* anzusehen. Daher sind weitere Tests insbesondere im Hinblick auf die Europäische Norm „EN 30993 : Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ durchzuführen. Da die reduzierte Zelladhäsion auf dem Isolatormaterial Polyimid und dem Elektrodenwerkstoff Titannitrid nicht auf eine zytotoxische Wirkung zurück zu führen ist, könnte durch eine Optimierung der Oberflächenstruktur bzw. Oberflächeneigenschaften und durch eine Weiterentwicklung einer optimalen organischen Matrix die Anbindung der Nervenzellen und die Unterdrückung der Gliaproliferation verbessert werden.

## 6. SUMMARY

Patients with a degeneration of retinal photoreceptor cells suffer from progressive blindness. The implantation of a „visual prosthesis“ in the subretinal space should restore a useful vision for these patients. In the project „Subretinale Netzhautimplantate“ microphotodiode arrays are developed and produced, which transform light into an electrical stimulus and lead it to the nerve cells using electrodes. The nerve cell stimulation depends on the direct adherence of the nerve cells to the electrodes.

The aim of the present study was 1.) to evaluate cell adhesion and survival of mammalian retinal cells on microphotodiode arrays and their pure materials in vitro, 2.) to specify the adherent neurons and 3.) to test the influence of arabinosylcytosine-hydrochloride on the proliferation of glial cells. Using dissociated retinas of new-born rats monolayer cell cultures were made and kept for 4 weeks. The cells were specified by staining with fluorescent dyes and immunocytochemistry and cell numbers were counted every week.

In comparison to cell adhesion and survival on glass coverslips (control), no significant reduction of cell adhesion were found on the microphotodiode arrays with iridium electrodes and on the pure materials iridium, siliciumdioxide and siliciumnitride.

The cell adhesion, however, was significantly reduced on the microphotodiode arrays with titannitride electrodes and the pure materials titannitride and polyimide the number of surviving cells was significantly decreased during four weeks in vitro.

Culturing retinal cells on glass coverslips and pure titannitride in the same petridish did not result in a significant reduction of cells on the coverslips, indicating that titannitride did not release diffusible toxic factors into the medium.

It was not possible to improve the cell adhesion by covalent binding of poly-L-lysine and epoxysilane to the titannitride substrate.

Amacrine cells differed in behaviour of adhesion on different substrates after one day *in vitro*. These celltypes preferred in decreased ranks iridium, glass coverslip (control) and titannitride.

By addition arabinosylcytosine-hydrochloride into the poly-L-lysine-coating, a concentration-dependent reduction of glial proliferation was achieved. After three days *in vitro* no significant differences could be recognized, whereas after seven days *in vitro* a significant reduction of glial proliferation and a decreased nerve cell loss were seen dependent on concentration.

Evaluation of cell adhesion on microphotodiode arrays and the pure materials is one criterion of many to assess *in vitro* biocompatibility. Further experiments have to be carried out, particularly with regard to the European Norm “EN 30993 : Biological evaluation of medical devices”. As no cytotoxic effect is responsible for the decreased cell adhesion on polyimide and titannitride, an improvement of both the binding of nerve cells and the suppression of glial proliferation could be obtained by optimising the surface structure and properties and the development of an optimal organic coating.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Adolph, A.R., Zucker, C.L., Ehinger, B. and Bergstrom, A. (1994) Function and structure in retinal transplants, *J.Neural Transplant.Plast.*, 5: 147-161.
- Agnew, W.F., Yuen, T.G., McCreery, D.B. and Bullara, L.A. (1986) Histopathologic evaluation of prolonged intracortical electrical stimulation, *Exp.Neurol.*, 92: 162-185.
- Akagawa, K. and Barnstable, C.J. (1986) Identification and characterization of cell types in monolayer cultures of rat retina using monoclonal antibodies, *Brain Res.*, 383: 110-120.
- Akagawa, K. and Barnstable, C.J. (1987) Identification and characterisation of cell types accumulating GABA in rat retinal cultures using cell type specific monoclonal antibodies, *Brain Res.*, 408: 154-162.
- Armson, P.F., Bennett, M.R. and Raju, T.R. (1987) Retinal ganglion cell survival and neurite regeneration requirements: the change from Muller cell dependence to superior colliculi dependence during development., *Brain Res.*, 429: 207-216.
- Bahr, M. (1991) Adult rat retinal glia in vitro: effects of in vivo crush-activation on glia proliferation and permissiveness for regenerating retinal ganglion cell axons., *Exp.Neurol.*, 111: 65-73.
- Baimbridge, K.G., Celio, M.R. and Rogers, J.H. (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system, *Trends.Neurosci.*, 15: 303-308.
- Barnstable, C.J. (1980) Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina, *Nature*, 286: 231-235.
- Bastianelli, E., Takamatsu, K., Okazaki, K., Hidaka, H. and Pochet, R. (1995) Hippocalcin in rat retina. Comparison with calbindin-D28k, calretinin and neurocalcin, *Exp.Eye Res.*, 60: 257-266.
- Benninghoff (1985) Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen, Urban & Schwarzberg,
- Bergstrom, A., Ehinger, B., Wilke, K., Zucker, C.L., Adolph, A.R., Aramant, R. and Seiler, M. (1992) Transplantation of embryonic retina to the subretinal space in rabbits, *Exp.Eye Res.*, 55: 29-37.



- Berson, E.L., Rosner, B., Sandberg, M.A., Hayes, K.C., Nicholson, B.W., Weigel, D.C. and Willett, W. (1993) A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa [see comments], *Arch.Ophthalmol.*, 111: 761-772.
- Bjorklund, H. and Dahl, D. (1985) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the rodent eye. Comparison between peripheral glia of the anterior uvea and central glia of the retina, *J.Neuroimmunol.*, 8: 331-345.
- Bordji, K., Jouzeau, J.Y., Mainard, D., Payan, E., Netter, P., Rie, K.T., Stucky, T. and Hage, A.M. (1996) Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts, *Biomaterials*, 17: 929-940.
- Chen, J., Armstrong, L.C., Liu, S.J., Gerriets, J.E. and Last, J.A. (1991) Silica increases cytosolic free calcium ion concentration of alveolar macrophages in vitro, *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 111: 211-220.
- Chow, A.Y. and Chow, V.Y. (1997) Subretinal electrical stimulation of the rabbit retina, *Neurosci.Lett.*, 225: 13-16.
- Ciapetti, G., Granchi, D., Verri, E., Savarino, L., Cavedagna, D. and Pizzoferrato, A. (1996) Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials., *Biomaterials*, 17: 1259-1264.
- Corey, J.M., Brunette, A.L., Chen, M.S., Weyhenmeyer, J.A., Brewer, G.J. and Wheeler, B.C. (1997) Differentiated B104 neuroblastoma cells are a high-resolution assay for micropatterned substrates, *J.Neurosci.Methods*, 75: 91-97.
- Dion, I., Roques, X., More, N., Labrousse, L., Caix, J., Lefebvre, F., Rouais, F., Gautreau, J. and Baquey, C. (1993) Ex vivo leucocyte adhesion and protein adsorption on TiN., *Biomaterials*, 14: 712-719.
- Dion, I., Rouais, F., Trut, L., Baquey, C., Monties, J.R. and Havlik, P. (1993) TiN coating: surface characterization and haemocompatibility., *Biomaterials*, 14: 169-176.
- Driscoll, K.E., Lindenschmidt, R.C., Maurer, J.K., Perkins, L., Perkins, M. and Higgins, J. (1991) Pulmonary response to inhaled silica or titanium dioxide, *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 111: 201-210.
- Eckmiller, R. (1997) Learning retina implants with epiretinal contacts, *Ophthalmic Res.*, 29: 281-289.

- Eisenfeld, A.J., Bunt, M.A. and Sarthy, P.V. (1984) Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina, *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*, 25: 1321-1328.
- Euler, T. and Wassle, H. (1995) Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina., *J.Comp.Neurol.*, 361: 461-478.
- Evans, E.J. (1994) Cell damage in vitro following direct contact with fine particles of titanium, titanium alloy and cobalt-chrome-molybdenum alloy., *Biomaterials*, 15: 713-717.
- Fisher, G.L., McNeill, K.L. and Smith, J.T. (1989) In vitro effects of fibrous and nonfibrous silicon nitride on bovine pulmonary macrophages, *Environ.Res.*, 50: 279-288.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. and Starke, K. (1992) *Pharmakologie und Toxikologie*, BI-Wissenschaftsverlag,
- Grattarola, M., Tedesco, M., Cambiaso, A., Perlo, G., Giannetti, G. and Sanguineti, A. (1988) Cell adhesion to silicon substrata: characterization by means of optical and acoustic cytometric techniques, *Biomaterials*, 9: 101-106.
- Guarda, F., Galloni, M., Assone, F., Pasteris, V. and Luboz, M.P. (1982) Histological reactions of porous tip endocardial electrodes implanted in sheep, *Int.J.Artif.Organs*, 5: 267-273.
- Guenther, E., Schmid, S., Grantyn, R. and Zrenner, E. (1994) In vitro identification of retinal ganglion cells in culture without the need of dye labeling, *J.Neurosci.Methods*, 51: 177-181.
- Hamano, K., Kiyama, H., Emson, P.C., Manabe, R., Nakauchi, M. and Tohyama, M. (1990) Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the vertebrate retina, *J.Comp.Neurol.*, 302: 417-424.
- Howlett, C.R., McCartney, E. and Ching, W. (1989) The effect of silicon nitride ceramic on rabbit skeletal cells and tissue. An in vitro and in vivo investigation [see comments], *Clin.Orthop.*, 293-304.
- Huxlin, K.R., Dreher, Z., Schulz, M. and Dreher, B. (1995) Glial reactivity in the retina of adult rats, *Glia*, 15: 105-118.
- Ignatius, M.J., Sawhney, N., Gupta, A., Thibadeau, B.M., Monteiro, O.R. and Brown, I.G. (1998) Bioactive surface coatings for nanoscale instruments: effects on CNS neurons, *J.Biomed.Mater.Res.*, 40: 264-274.

- Jones, S.E., McHugh, J.D., Jomary, C., Shallal, A. and Neal, M.J. (1994) Assessment of liposomal transfection of ocular tissues in vivo, *Gene Ther.*, 1 Suppl 1: S61
- Kirkpatrick, C.J., Bittinger, F., Wagner, M., Kohler, H., van-Kooten, T.G., Klein, C.L. and Otto, M. (1998) Current trends in biocompatibility testing, *Proc.Inst.Mech.Eng.H.*, 212: 75-84.
- Kljavin, I.J. and Reh, T.A. (1991) Muller cells are a preferred substrate for in vitro neurite extension by rod photoreceptor cells., *J.Neurosci.*, 11: 2985-2994.
- Lake, N. (1994) Taurine and GABA in the rat retina during postnatal development, *Vis.Neurosci.*, 11: 253-260.
- Lesur, O., Cantin, A.M., Tanswell, A.K., Melloni, B., Beaulieu, J.F. and Begin, R. (1992) Silica exposure induces cytotoxicity and proliferative activity of type II pneumocytes, *Exp.Lung Res.*, 18: 173-190.
- Li, T., Adamian, M., Roof, D.J., Berson, E.L., Dryja, T.P., Roessler, B.J. and Davidson, B.L. (1994) In vivo transfer of a reporter gene to the retina mediated by an adenoviral vector, *Invest.Ophthalmol Vis Sci*, 35: 2543-2549.
- Liesi, P., Dahl, D. and Vaheri, A. (1983) Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture, *J.Cell Biol.*, 96: 920-924.
- Liesi, P., Kirkwood, T. and Vaheri, A. (1986) Fibronectin is expressed by astrocytes cultured from embryonic and early postnatal rat brain, *Exp.Cell Res.*, 163: 175-185.
- Lund, R.D., Coffey, P.J., Sauve, Y. and Lawrence, J.M. (1997) Intraretinal transplantation to prevent photoreceptor degeneration, *Ophthalmic Res.*, 29: 305-319.
- Martin, D.P., Wallace, T.L. and Johnson-EM, J. (1990) Cytosine arabinoside kills postmitotic neurons in a fashion resembling trophic factor deprivation: evidence that a deoxycytidine-dependent process may be required for nerve growth factor signal transduction, *J.Neurosci.*, 10: 184-193.
- Mockel, V., Lohrke, S. and Hofmann, H.D. (1994) Diversity of neuronal phenotypes expressed in monolayer cultures from immature rabbit retina., *Vis.Neurosci.*, 11: 629-642.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays., *J.Immunol.Methods*, 65: 55-63.

- Moyer, M., Bullrich, F. and Sheffield, J.B. (1990) Emergence of flat cells from glia in stationary cultures of embryonic chick neural retina, *In Vitro Cell Dev.Biol.*, 26: 1073-1078.
- Naji, A. and Harmand, M.F. (1990) Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts, *J.Biomed.Mater.Res.*, 24: 861-871.
- Niparko, J.K., Altschuler, R.A., Xue, X.L., Wiler, J.A. and Anderson, D.J. (1989) Surgical implantation and biocompatibility of central nervous system auditory prostheses, *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.*, 98: 965-970.
- Noble, M., Fok, S.J. and Cohen, J. (1984) Glia are a unique substrate for the in vitro growth of central nervous system neurons, *J.Neurosci.*, 4: 1892-1903.
- Oorschot, D.E. and Jones, D.G. (1991) Neuronal survival and neurite growth in cultured cerebral explants: assessment of the effect of cytosine arabinoside using improved stereology [published erratum appears in *Brain Res* 1991 Jul 19;554(1-2):361], *Brain Res.*, 546: 146-150.
- Osborne, N.N., Patel, S., Beaton, D.W. and Neuhoff, V. (1986) GABA neurones in retinas of different species and their postnatal development in situ and in culture in the rabbit retina, *Cell Tissue Res.*, 243: 117-123.
- Osborne, N.N., Barnett, N.L., Morris, N.J. and Huang, F.L. (1992) The occurrence of three isoenzymes of protein kinase C (alpha, beta and gamma) in retinas of different species, *Brain Res.*, 570: 161-166.
- Patel, B.C., Courtney, J.M., Evans, J.H. and Paul, J.P. (1991) Biocompatibility assessment: application of fluorescent probe response (FPR) technique., *Biomaterials*, 12: 722-726.
- Peichl, L., Gonzalez, S.J. (1994) Morphological types of horizontal cell in rodent retinæ: a comparison of rat, mouse, gerbil and guinea pig, *Vis.Neurosci.*, 11: 501-517
- Peyman, G., Chow, A.Y., Liang, C., Chow, V.Y., Perlman, J.I. and Peachey, N.S. (1998) Subretinal semiconductor microphotodiode array, *Ophthalmic Surg.Lasers.*, 29: 234-241.
- Politis, M.J. and Houle, J.D. (1985) Effect of cytosine arabinofuranoside (AraC) on reactive gliosis in vivo. An immunohistochemical and morphometric study, *Brain Res.*, 328: 291-300.

- Raju, T.R. and Bennett, M.R. (1986) Retinal ganglion cell survival requirements: a major but transient dependence on Muller glia during development, *Brain Res.*, 383: 165-176.
- Richardson-RR, J., Miller, J.A. and Reichert, W.M. (1993) Polyimides as biomaterials: preliminary biocompatibility testing., *Biomaterials*, 14: 627-635.
- Rogister, B., Leprince, P., Bonhomme, V., Rigo, J.M., Delree, P., Colige, A. and Moonen, G. (1990) Cultured neurons release an inhibitor of astroglia proliferation (astrostatine), *J.Neurosci.Res.*, 25: 58-70.
- Ruiz, M.C., Michelangeli, F., Ludert, J.E., Liprandi, F., del, C.J., Chemello, M.E., Benaim, G. and Cohen, E. (1991) Fluorimetric quantification of cell death in monolayer cultures and cell suspensions, *J.Biochem.Biophys.Methods*, 23: 237-248.
- Sachs, L. (1988) *Statistische Methoden*, Springer-Verlag,
- Satomi, K., Akagawa, Y., Nikai, H. and Tsuru, H. (1988) Tissue response to implanted ceramic-coated titanium alloys in rats, *J.Oral Rehabil.*, 15: 339-345.
- Schmidt, S., Horch, K. and Normann, R. (1993) Biocompatibility of silicon-based electrode arrays implanted in feline cortical tissue, *J.Biomed.Mater.Res.*, 27: 1393-1399.
- Schuschereba, S.T. and Silverman, M.S. (1992) Retinal cell and photoreceptor transplantation between adult New Zealand red rabbit retinas, *Exp.Neurol.*, 115: 95-99.
- Seiler, M.J., Aramant, R.B. and Bergstrom, A. (1995) Co-transplantation of embryonic retina and retinal pigment epithelial cells to rabbit retina, *Curr.Eye Res.*, 14: 199-207.
- Shaw, G. and Weber, K. (1984) The intermediate filament complement of the retina: a comparison between different mammalian species., *Eur.J.Cell Biol.*, 33: 95-104.
- Sogawa, K. (1981) [Comparative study on cytotoxicity of main components of three luting cements in vitro (author's transl)], *Shika.Rikogaku.Zasshi.*, 22: 172-186.
- Suka, T. (1986) [Experimental study on biomaterials coated with titanium-nitride ceramic for orthopedics], *Nippon.Seikeigeka.Gakkai.Zasshi.*, 60: 637-647.
- Sumbilla, C. and Lakowicz, J.R. (1983) Evidence for normal fibroblast cell membranes from individuals with Huntington's disease. A fluorescence probe study, *J.Neurol.Sci.*, 62: 23-40.

- Svensson, I., Artursson, E., Leanderson, P., Berglind, R. and Lindgren, F. (1997) Toxicity in vitro of some silicon carbides and silicon nitrides: whiskers and powders, *Am.J.Ind.Med.*, 31: 335-343.
- Takeshima, T., Shimoda, K., Sauve, Y. and Commissiong, J.W. (1994) Astrocyte-dependent and -independent phases of the development and survival of rat embryonic day 14 mesencephalic, dopaminergic neurons in culture, *Neuroscience*, 60: 809-823.
- Taschenberger, H., Engert, F. and Grantyn, R. (1995) Synaptic current kinetics in a solely AMPA-receptor-operated glutamatergic synapse formed by rat retinal ganglion neurons, *J.Neurophysiol.*, 74 (3): 1123-36
- Tomaselli, K.J., Reichardt, L.F. and Bixby, J.L. (1986) Distinct molecular interactions mediate neuronal process outgrowth on non-neuronal cell surfaces and extracellular matrices, *J.Cell Biol.*, 103: 2659-2672.
- Uesugi, R., Yamada, M., Mizuguchi, M., Baimbridge, K.G. and Kim, S.U. (1992) Calbindin D-28k and parvalbumin immunohistochemistry in developing rat retina, *Exp.Eye Res.*, 54: 491-499.
- Versaux, B.C., Pochet, R. and Nguyen, L.J. (1989) Immunohistochemical localization of GABA-containing neurons during postnatal development of the rat retina, *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*, 30: 652-659.
- Wallace, T.L. and Johnson-EM, J. (1989) Cytosine arabinoside kills postmitotic neurons: evidence that deoxycytidine may have a role in neuronal survival that is independent of DNA synthesis, *J.Neurosci.*, 9: 115-124.
- Walter, I.B. (1996) Triiodothyronine exerts a trophic action on rat sensory neuron survival and neurite outgrowth through different pathways, *Eur.J.Neurosci.*, 8: 455-466.
- Wataha, J.C., Hanks, C.T. and Sun, Z. (1994) Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity, *Dent.Mater.*, 10: 156-161.
- Wisbey, A., Gregson, P.J. and Tuke, M. (1987) Application of PVD TiN coating to Co-Cr-Mo based surgical implants., *Biomaterials*, 8: 477-480.
- Woodford, B.J., Carter, R.R., McCreery, D., Bullara, L.A. and Agnew, W.F. (1996) Histopathologic and physiologic effects of chronic implantation of microelectrodes in sacral spinal cord of the cat, *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, 55: 982-991.

- 
- Young, R.W. (1985) Cell differentiation in the retina of the mouse., *Anat.Rec.*, 212: 199-205.
- Zhang, X. and Bok, D. (1998) Transplantation of retinal pigment epithelial cells and immune response in the subretinal space, *Invest.Ophthalmol Vis Sci*, 39: 1021-1027.
- Zrenner, E., Ruther, K. and Apfelstedt, S.E. (1992) [Retinitis pigmentosa. Clinical findings, results of molecular genetic techniques and research perspectives], *Ophthalmologe.*, 89: 5-21.
- Zrenner, E., Miliczek, K.D., Gabel, V.P., Graf, H.G., Guenther, E., Haemmerle, H., Hoefflinger, B., Kohler, K., Nisch, W., Schubert, M., Stett, A. and Weiss, S. (1997) The development of subretinal microphotodiodes for replacement of degenerated photoreceptors., *Ophthalmic Res.*, 29: 269-280.

## 8. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Eberhart Zrenner für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Nutzung von Labor und Arbeitsmitteln.

Herrn Prof. Dr. Martin Diener danke ich für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität.

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Elke Günther, die mich u.a. in die Technik der Zellkultivierung eingewiesen hat, insbesondere für Diskussion, Anregung und Unterstützung dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung der Implantatmaterialien danke ich den Mitarbeitern des Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Instituts (NMI) der Universität Tübingen in Reutlingen, des Instituts für Mikroelektronik (IMS) der Universität Stuttgart und des Instituts für Physikalische Elektronik (IPE) der Universität Stuttgart.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern der Forschungsstelle für Experimentelle Ophthalmologie für den angenehmen Alltag, die fröhlichen Stunden und die vielen mutmachenden Worte danken.