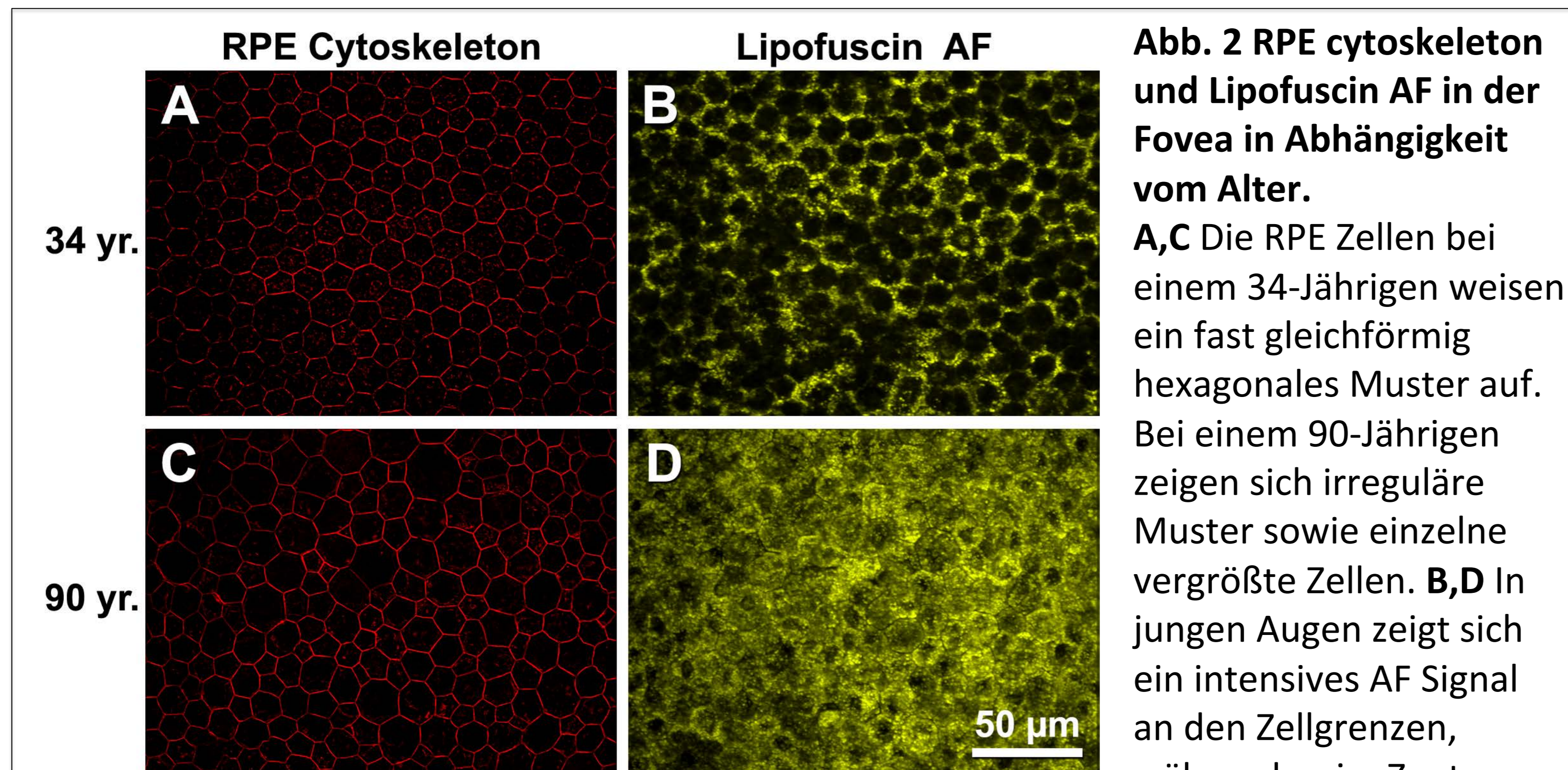
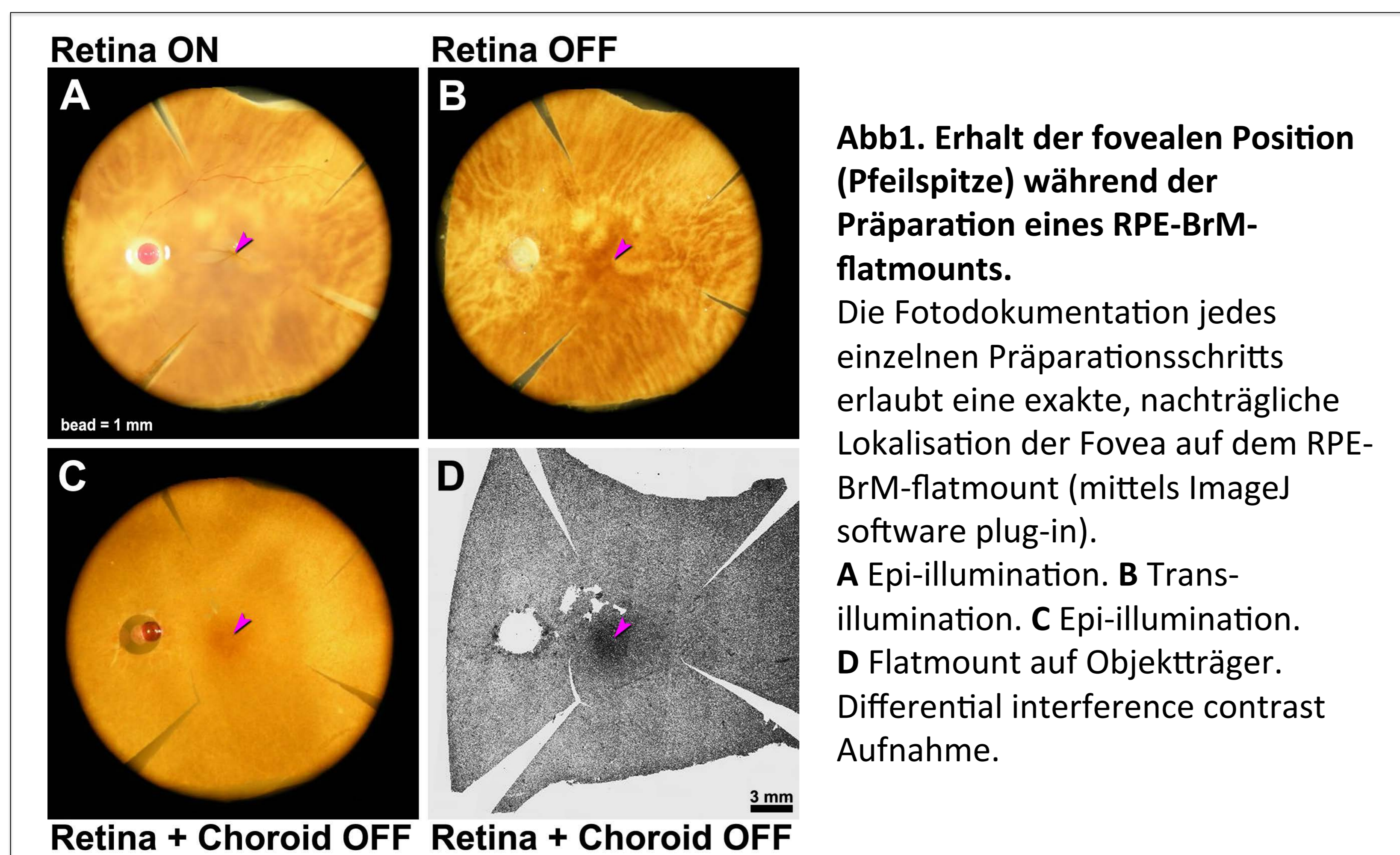


## Hintergrund

- Retinales Pigmentepithel (RPE) ist die Hauptquelle von Autofluoreszenz (AF)-Signalen klinischer Fundus-AF-Aufnahmen
- Daten zur AF auf histologischer Ebene sowie AF kombiniert mit RPE-Zelldichten sind nicht verfügbar
- Wir stellen Methoden vor, um die AF und Zelldichte humaner RPE Zellen in Relation zur Fovea zu bestimmen.

## Präparation von RPE-Bruch Membran flatmounts

- Menschliches chorioretinales Gewebe stellt die Basis für die Präparation von RPE-BrM-flatmounts dar (Abb. 1)
- Dissektion und Feinpräparation sind anspruchsvoll und zeitaufwendig (bis zu 8 Stunden pro Gewebe), resultieren aber in einer einzelligen Gewebeschicht, die eine exakte Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht
- Räumliche Abgrenzung einzelner Zellen erfolgt durch eine phalloidin f-actin Markierung (Abb. 2).



Cytoskeleton label mit AlexaFluor 647 phalloidin. Anregungswellenlänge der Lipofuscin AF: 488 nm, Emission > 510 nm.

**Tabelle: AF Intensitäten, RPE-Zelldichten und -flächen von 18 flatmounts**

	< 50 Jahre (n=8)	> 80 Jahre (n=10)	p
AF [a.u.]	21.6 ± 12.0	32.1 ± 18.0	0.031
max AF [a.u.]	34.0 ± 18.9	49.1 ± 27.6	0.032
min AF [a.u.]	11.2 ± 7.1	16.4 ± 10.7	0.0015
RPE Zelldichte [pro mm <sup>2</sup> ]	4902 ± 984	5027 ± 1144	0.53
RPE Zellfläche [mm <sup>2</sup> × 1000]	0.21 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.61

[a.u.] = arbitrary unit; AF wurde normalisiert und quantifiziert; angegeben ist Mittelwert ± Standardabweichung

## Literatur:

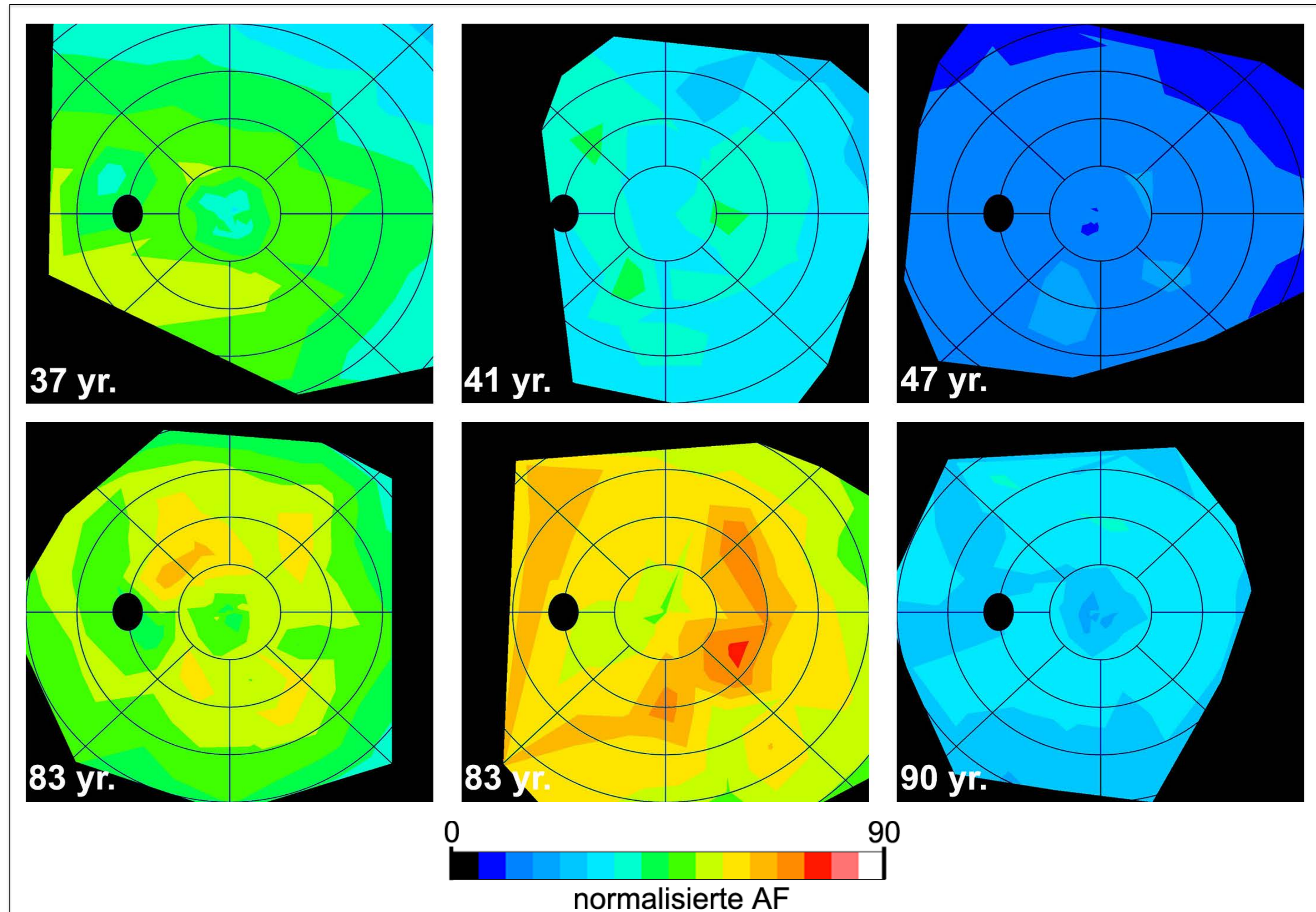
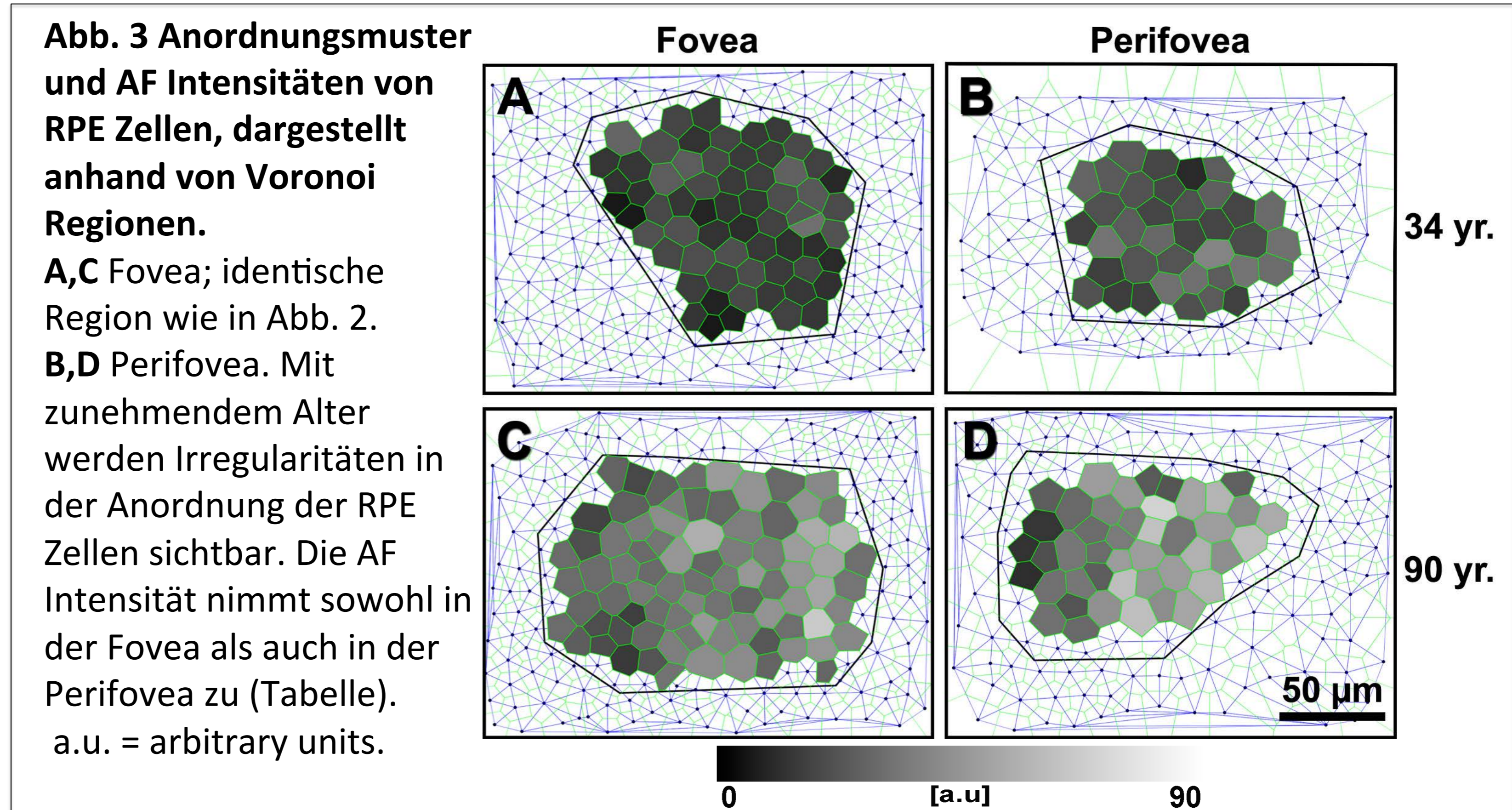
- Morgan et al. IOVS (2009), PMID 18952914
- Polyak, SL. The Retina (1941), Chapter 16, p. 213
- Curcio et al. J Comp Neurol (1990), PMID 2324310
- Delori et al. IOVS (2011), PMID 22016060

## Potentielle Interessenskonflikte:

- keine, 2.keine, 3. keine, 4. DFG AC265/1-1; NEI EY06109 + EY021470 ; EyeSight Foundation of Alabama; Research to Prevent Blindness, 5. keine.

## Computerunterstützte Analyse der RPE- Autofluoreszenz und Zelldichte

- Delaunay und Voronoi Analysen sind etablierte Methoden für das retinale Zellmosaik (Berechnung von Abständen zwischen Zellzentren und Anzahl von Zellnachbarn<sup>1</sup> (Abb. 3))
- AF-Intensitätssignale einer Voronoi Region werden numerisch integriert und ermöglichen so die Darstellung der absoluten AF jeder einzelnen Zelle
- Daraus lassen sich AF Karten ganzer RPE-BrM flatmounts erstellen (Abb. 4)
- Voronoi Analysen liefern auch Daten zur Zelldichte und Geometrie (Tabelle; siehe auch: Ach et al., Poster PFr03-07).



**Abb. 4 Quantifizierte AF Karten von sechs RPE-BrM flatmounts.**

Die AF Karten weisen eine hohe Variabilität auf. Die Gesamt-AF-Intensitäten sind im Alter jedoch signifikant höher als in jüngeren Jahren (siehe Tabelle). In der Perifovea<sup>2</sup> zeigt sich, im Vergleich zur Fovea, ein verstärktes AF Signal, unabhängig vom Alter. Die perifovealen Areale entsprechen Bereichen hoher Stäbchendichte in der ursprünglich darüberliegenden Netzhaut.<sup>3</sup> Alle AF Intensitäten wurden vor Anfertigung der Karten auf eine Standard-Fluoreszenzreferenz normalisiert/quantifiziert.<sup>4</sup> Die Ringe sind zentriert auf die Fovea, der Radius erhöht sich jeweils um 2 mm.

## Schlussfolgerung

- RPE-BrM flatmounts unter Erhalt der fovealen Position ermöglichen eine exakte Kartographie der RPE-AF auf zellulärer Ebene
- RPE-AF Karten weisen eine hohe Variabilität auf
- Die vorgestellten histologischen, quantifizierten AF-Karten können zur Interpretation der klinischen quantifizierten Fundusautofluoreszenz<sup>4</sup> dienen
- Die altersabhängige Zunahme der Lipofuscin-AF scheint nicht mit einer Veränderung der RPE-Zelldichte einherzugehen, was möglicherweise auch Auswirkungen auf das Rollenverständnis des Lipofuscins in der AMD-Pathogenese haben kann.