

# The role of activating residual neurons in recovery of vision after partial optic nerve damage: *in vivo* observations in rats

**Dissertation**  
zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**  
**Dr. rer. nat.**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Sylvia Prilloff  
geb. am 08.01.1975 in Wolmirstedt

Gutachter:  
Prof. Dr. Bernhard A. Sabel  
Prof. Dr. Solon Thanos

eingereicht am: 22.09.2010

verteidigt am: 12.04.2011



Berichte aus der Medizin

**Sylvia Prilloff**

**The role of activating residual neurons  
in recovery of vision after partial optic nerve  
damage: *in vivo* observations in rats**

Shaker Verlag  
Aachen 2011

**Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek**

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2011

Copyright Shaker Verlag 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-0106-8

ISSN 0945-0890

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • e-mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

**Parts of this thesis have been published in following  
scientific papers or are submitted**

**Priloff, S.**, Noblejas, M.I., Chedhomme, V. & Sabel, B.A. (2007). Two faces of calcium activation after optic nerve trauma: life or death of retinal ganglion cells *in vivo* depends on calcium dynamics. *European Journal of Neuroscience* 25, 3339-3346.

**Priloff, S.**, Fan, J., Henrich-Noack, P. & Sabel, B.A. (2010). *In vivo* confocal neuroimaging (ICON): non-invasive, functional imaging of the mammalian central nervous system with cellular resolution. *European Journal of Neuroscience* 31, 521-528.

**Priloff, S.**, Henrich-Noack, P., Engelmann, R. & Sabel, B.A. (2010). *In vivo* imaging of mammalian central nervous system with the *in vivo* confocal neuroimaging (ICON) method. In: Conn, M. (Ed.), Techniques in microscopy. *Reliable Lab Solutions*, 307-315.

**Priloff, S.**, Henrich-Noack, P. & Sabel, B.A. (2010). Experience-dependent plasticity and vision restoration in rats after optic nerve crush. *Journal of Neurotrauma* 27, 2295-2307.

## ABSTRACT

Traumatic brain injury is one of the main causes of functional loss in the central nervous system after injury. These functional deficits are often not permanent but can be partially regained from the brain often surprisingly and partly spontaneously in the first few weeks after the lesion. A small number of retinal ganglion cells (10-20 %) are sufficient to spontaneously recover lost functions. It is now necessary to acquire more knowledge about the role of activating residual neurons in the recovery of vision after partial optic nerve damage as this is of high clinical relevance. To learn more about this issue, a defined optic nerve crush (ONC) in adult rats was used to analyse the functional recovery by using behaviour and cell biological methods. First, the *in vivo* confocal neuroimaging (ICON) was used for the non-invasive visualization of individual retinal ganglion cells (RGCs), and second an automated test system to study the psychophysics of rat vision (VIST). By applying these two procedures significant new insights have been gained regarding neurobiological mechanisms of functional recovery after partial injury of the visual system:

- It is possible to use two different fluorescent markers under *in vivo* conditions in order to observe retrograde axonal transport in RGCs in living rats. With this design an effective protocol is in place to observe the temporal pattern of recovery of retrograde axonal transport in injured RGCs.
- By ONC the axons of the RGCs are damaged which results in a temporary loss of axonal transport. The results from the double-labelling studies described here show that there is an intrinsic repair of damaged axons. The axonal transport in the injured optic nerve recovered within 2-3 weeks and consequently the visual function, too. As expected, axotomy did not allow such recovery.
- The *in vivo* imaging of calcium dynamics in individual RGCs is an important indication of the function or injury of these cells. Surviving RGCs show a delayed moderate (“compensatory”) calcium activation, which is significantly different from cell death-associated massive calcium influx, which occurs immediately after the injury.
- The repeated stimulation of the visual system following ONC has a positive effect on the recovery of vision. It could be observed, that “visual enrichment” produced a faster recovery of vision in rats compared to rats kept under normal dark/light conditions or rats held in total darkness.

These results show that activating residual neurons is a very important mechanism in recovery of vision. Through these new findings it is possible to understand the role of residual neurons much better and it allows new approaches for the development of potential therapies.

## ZUSAMMENFASSUNG

Eine der Hauptursachen für funktionelle Verluste des zentralen Nervensystems (ZNS) nach Verletzung sind Schädel-Hirn-Trauma und Schlaganfall. Eine Verbesserung von Therapie und Rehabilitation setzt ein grundlegendes Verständnis der neurobiologischen Prozesse, die zum Tod von Nervenzellen und damit zur Schädigung des Nervensystems führen, voraus. Für die Konzeption neuer Therapieverfahren ist die genaue Kenntnis der posttraumatischen Plastizität derjenigen ZNS-Strukturen, die die Schädigung überlebt haben, von Bedeutung. Hierbei ist die Rolle der Aktivierung von Residualstrukturen bei der ZNS-Reparatur besonders hervorzuheben. Dies ergibt sich aus der Beobachtung, dass eine geringe Anzahl von Nervenzellen (10-20 %) ausreicht, um zunächst verlorene Funktionen durch Spontanerholung zu einem erheblichen Anteil wiederzuerlangen (Sabel, 1997 und 1999b).

Hauptschwerpunkt der vorliegenden Dissertation war daher die Klärung der Bedeutung dieser residualen Strukturen für die Funktionserholung nach partieller Schädigung des visuellen Systems. Insbesondere galt es zu prüfen, in welchem Umfang Training und Aktivierung überlebender Nervenzellen die funktionelle Erholung anregen können. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die kontrollierte Quetschung des Nervus opticus der adulten Ratte genutzt, um die funktionelle Erholung durch verhaltens- und zellbiologische Methoden zu analysieren. Zunächst wurde der axonale Transport vor und nach partieller Verletzung des Nervus opticus mit Hilfe des In Vivo Confocal Neuroimaging Verfahrens (ICON) untersucht, und anschließend durch Nutzung des automatisierten Verhaltenstest (VIST) die Psychophysik der Funktionserholung nach partieller Nervus opticus Läsion dokumentiert. Durch Anwendung dieser beiden Verfahren konnten wesentliche neue Erkenntnisse über neurobiologische Mechanismen der funktionellen Erholung nach partieller Schädigung des visuellen Systems gewonnen werden:

- Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Fluoreszenzmarkern ist die Beobachtung des retrograden axonalen Transports in retinalen Ganglienzellen (RGZ) unter *in vivo* Bedingungen möglich. Somit konnte ein geeignetes Untersuchungsprotokoll zur Darstellung des retrograden axonalen Transport und der axonalen Regeneration in verletzten RGZ etabliert werden.
- Wichtige Aspekte zur Axonreparatur konnten durch Verwendung dieser Doppelmarkierung von RGZ zur Darstellung des axonalen Transports und der axonalen Regeneration in überlebenden RGZ nach Sehnervquetschung herausgefunden werden. Es zeigte sich, dass sterbende RGZ einen dauerhaft gestörten axonalen Transport nach Sehnervquetschung hatten und zu keinem Zeitpunkt nach Läsion eine Erholung stattfand. Im Gegensatz dazu gab es eine Subpopulation von RGZ, die einen vorübergehend unterbrochenen axonalen Transport nach Läsion des Sehnerven hatten, der sich jedoch später wieder erholte. Diese Effekte traten in allen drei Läsionsgruppen auf und können als Beleg für interne Axonreparatur angesehen werden.

- Die Sichtbarmachung der Kalziumaktivität in retinalen Ganglienzellen ist von funktioneller Bedeutung, da physiologische Kalziumaktivität in intakten Zellen die Folge von reizabhängigen Aktionspotentialen ist. In den Retinae unoperierter Kontrolltiere traten weder Änderungen in der Fluoreszenzintensität noch in der Zellgröße auf. Im Gegensatz dazu ergaben sich nach partieller Verletzung des Sehnervs zum Teil sehr drastische Änderungen in der Kalziumkonzentration. Die Schädigung von RGZs führte zunächst zu deutlichen Veränderungen in der Fluoreszenzstärke bevor dann zusätzlich auch morphologische Veränderungen eintraten. In Abhängigkeit vom Grad der Verletzung konnten unterschiedliche Zelltypen definiert werden. Nach einer milden Verletzung des Sehnervs (0.2 mm, definiert durch den Abstand der Pinzetten spitzen) zeigten 23 % aller markierten RGZ nach einer anfänglichen Abnahme der Fluoreszenzintensität eine schnelle Fluoreszenzintensitätszunahme. Nach Lichtstimulation konnte in diesen Zellen eine Kalzium-Hyperaktivität beobachtet werden. Bei 19 % der RGZ kam es nach moderater Verletzung des Sehnervs (0.1 mm) zunächst zu einer zögerlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität, mit einer anschließenden Zunahme. Eine Hyperaktivität konnte in diesen Zellen jedoch nicht beobachtet werden. Des Weiteren gab es in beiden Läsionsstärken noch Zellen ohne Änderungen und absterbende Zellen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die *in vivo* Darstellung von Kalzium in RGZs ein wichtiger Hinweis auf die Funktionsfähigkeit (oder Schädigung) einzelner Zellen ist. Während überlebende RGZ eine verzögerte moderate Kalzium-Aktivierung zeigten, erfolgte in sterbenden Zellen unmittelbar nach Verletzung ein Zelltod-assozierter massiver Kalziumeinstrom.
- Die wiederholte Stimulation des visuellen Systems nach partieller Schädigung des Sehnervs wirkte sich positiv auf die Regeneration des Sehens aus. So führte ein 2 Stunden andauerndes „visual enrichment“ zu einer schnelleren Erholung der Sehfähigkeit bei Ratten gegenüber im normalen Hell/Dunkel Rhythmus bzw. in völliger Dunkelheit gehaltenen Tieren. Dies stimmt mit der Hypothese überein, dass eine visuelle Erfahrung ein entscheidender Faktor für die Wiederherstellung der Sehfunktion ist. Es unterstützt zudem die Hypothese, dass eine zusätzliche visuelle Stimulierung die Reparatur im geschädigten Gehirn verbessert.

Die hier dargestellten Untersuchungen stehen in direktem Zusammenhang zu klinischen Fragen der Wirkung von Gesichtsfeldtraining auf die Verbesserung der Sehleistung bei Patienten mit Sehfeldausfällen nach Schädel-Hirn-Trauma. So konnte in zwei unabhängigen klinischen Studien nachgewiesen werden, dass tägliches Restitutionstraining zu einer deutlichen Gesichtsfeldvergrößerung bei Patienten führt (Kasten & Sabel, 1995; Kasten *et al.*, 1998). Die durchgeföhrten Studien haben dazu beigetragen, diese klinisch relevante Neuroplastizität des visuellen Systems neurobiologisch zu erklären, so dass aus dieser Erkenntnis heraus Ansätze für eine Verbesserung des Trainingserfolgs zur Anwendung kommen können.

# TABLE OF CONTENTS

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE OF CONTENTS.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABBREVIATIONS.....</b>	<b>IX</b>
<b>INDEX OF FIGURES AND TABLES.....</b>	<b>X</b>
<b>1      Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1    Traumatic brain injury and consequences of visual functions .....	1
1.2    The optic nerve crush – a model to study recovery of vision.....	2
1.3    Regeneration and functional recovery in the visual system.....	4
1.4    Experience-dependent plasticity and recovery of vision.....	7
1.5    Aims of the dissertation .....	8
<b>2      MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>9</b>
2.1    Animals .....	9
2.2    Laboratory Equipment .....	9
2.3    Chemical reagents and other research reagents .....	10
2.4    Anaesthesia.....	11
2.5    Surgery .....	12
2.5.1    RGC labelling.....	12
2.5.2    Optic nerve crush and axotomy.....	13
2.6    In Vivo Confocal Neuroimaging (ICON).....	14
2.6.1    ICON-microscopy .....	14
2.6.2    Analysis of cell soma diameters.....	15
2.6.3    Calcium activation analyses.....	17
2.6.4    RGC stimulation (calcium analysis study) .....	18
2.6.5    Phototoxicity .....	18
2.7    Behavioural testing .....	18
2.7.1    Behavioural testing apparatus (VIST) .....	19
2.7.2    Behavioural testing procedure.....	19
2.7.3    Visual enrichment.....	22
2.8    Statistical analyses.....	23
2.9    Databases.....	24
2.10    Times lines .....	24
<b>3      RESULTS.....</b>	<b>27</b>
3.1    Double-labelling study of axonal transport and axonal repair .....	27
3.1.1    Double-labelling of RGCs in normal rats.....	27
3.1.2    Double-labelling of RGCs in injured rats.....	28

3.2	Dual role of calcium in neurotrauma.....	33
3.2.1	Crush-induced calcium dynamics in surviving RGCs .....	33
3.2.2	Soma diameter measurements.....	35
3.2.3	Calcium activation after light stimulation .....	36
3.3	Behavioural testing after visual stimulation .....	40
3.3.1	Visual performance (Percent correct choices).....	40
3.3.2	Brightness discrimination threshold .....	42
3.3.3	Morphology .....	42
3.3.4	Correlations between behavioural and morphology parameters .....	44
<b>4</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>46</b>
4.1	Double-labelling study of axonal transport and axonal repair .....	46
4.2	Dual role of calcium in neurotrauma.....	48
4.3	Behavioural effects of visual stimulation .....	51
4.4	General Conclusions and Perspectives .....	55
<b>5</b>	<b>References.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Acknowledgements.....</b>	<b>72</b>
<b>Curriculum vitae .....</b>		<b>73</b>
<b>Publications and Conference abstracts .....</b>		<b>75</b>
Papers .....	75	
Conference abstracts .....	76	
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>		<b>77</b>

## ABBREVIATIONS

BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bg	Background
bv	Blood vessel
Ca	Calcium
(C)LSM	(Confocal) Laser Scanning Microscope
CNS	Central nervous system
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CO	Control
DA	Darkness
DAI	Diffuse axonal injury
DL	Dark/light
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dpt	Dioptrin
FI	Fluorescence intensity
ICON	<i>In Vivo</i> Confocal Neuroimaging
i.p.	intraperitoneal
MRS	Minimal residual structure
Na	Natrium
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchangers
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
ONC	Optic nerve crush
PMCA	Plasma membrane calcium pumps
RGC(s)	Retinal ganglion cell(s)
RGZ	Retinale Ganglienzellen
TBI	Traumatic brain injury
VE	Visual enrichment
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIST	Visual testing system
ZNS	Zentrales Nervensystem

## INDEX OF FIGURES AND TABLES

### Figures

Figure 01: Concept of diffuse axonal injury .....	3
Figure 02: Stereotactic coordinates (RGC labelling) .....	12
Figure 03: Calibrated cross-action forceps (crush).....	14
Figure 04: ICON setup .....	16
Figure 05: Design of the VIST hardware .....	20
Figure 06: Scale drawings of the front / rear side of the VIST testing apparatus.....	21
Figure 07: Illuminated turning drum (visual stimulation) .....	23
Figure 08: Experimental time-line of double-labelling study after axonal transport.....	25
Figure 09: Experimental time-line of calcium dynamics.....	26
Figure 10: Experimental time-line of behavioural testing after visual stimulation .....	26
Figure 11: ICON imaging of RGC after retrograde double-labelling .....	30
Figure 12: Percentage of RGC type for groups of different lesion severities .....	34
Figure 13: RGC Ca-dependent fluorescence intensity modifications after ONC.....	35
Figure 14: RGC soma diameter changes after ONC .....	36
Figure 15: Calcium activation after photo-stimulation (ON/OFF response).....	38
Figure 16: Calcium activation after photo-stimulation (function of time after injury)....	39
Figure 17: Results from VIST test after ONC (level analysis) .....	43

### Tables

Table 01: Numbers of RGCs after retrograde double-labelling in normal rats .....	28
Table 02: Numbers of RGCs after retrograde double-labelling before / after crush ....	29
Table 03: Results of RGC labelling after a mild crush (0.2 mm) .....	32
Table 04: Results of RGC labelling after a moderate crush (0.1 mm) .....	32
Table 05: Results from VIST test after ONC (visual performance) .....	41
Table 06: Cell size changes over time .....	45