

Aus dem Department für Augenheilkunde

Ärztliche Direktoren:

Professor Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt, Professor Dr. E

Zrenner

Universitäts-Augenklinik Tübingen

Schwerpunkt: Erkrankungen des vorderen und hinteren

Augenabschnittes

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt

**Elektrophysiologische Toxizitätsuntersuchungen
intravitrealer Pharmaka am Modell der isolierten und
umströmten Vertebratennetzhaut**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kai Januschowski, geb. 26.07.1982

aus

Celle

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Szurman

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dipl.-Ing. M. Seeliger

Widmung:

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern, ohne sie wäre nichts möglich gewesen.

Ad maiorem dei gloriam

Inhalt

1 Einleitung.....	7
1.1 Die altersbedingte Makuladegeneration	7
1.2 Pathophysiologie der exsudativen neovaskulären AMD.....	9
1.3 Therapieansätze der AMD.....	11
1.3.1 Die intravitreale Therapie	12
1.3.2 Triamcinolon als Monotherapie	12
1.3.3 Antiangiogenetische Therapie	13
1.4 Die Netzhaut, Aufbau und elektrophysiologische Grundlagen.....	18
1.5 Das Elektroretinogramm (ERG).....	20
1.6 Das Elektroretinogramm als Messparameter der Netzhautfunktion	23
2 Material und Methodik	25
2.1 Perfusionslösung	26
2.2 Präparation	26
2.3 Perfusionskammer	27
2.4 Die modifizierte Perfusionskammer	28
2.5 Sauerstoffgesättigte Nährlösung	29
2.6 Toxizitätsanalyse mit retinalen Ganglienzellen.....	30
2.7 Reizquelle.....	31
2.8 Herstellung der Stammlösungen	31
3 Durchführung und Ergebnisauswertung	32
3.1 Versuchsdurchführung	32
3.1.1 Versuchsanordnung	32
3.1.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Avastin (Bevacizumab)/rekombinantem Gewebsplasminogen Aktivator (rt-PA) auf die b- Welle	34
3.1.3 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von rt-PA auf die b- Welle	35
3.1.4 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Ranibizumab (Lucentis) auf die b-Welle.....	35
3.1.5 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von gelöstem Triamcinolon (Volon A) auf die b-Welle	35
3.1.6 Das Versuchsprotokoll zu Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon (Volon A) bei direkter Applikation auf die b-Welle	35
3.1.7 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Avastin (Bevacizumab)/rekombinanter Gewebsplasminogen Aktivator (rt-PA) auf die a- Welle	36
3.1.8 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von rt-PA auf die a- Welle	36

3.1.9 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Ranibizumab (Lucentis) auf die a-Welle.....	37
3.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von vollständig gelöstem Triamcinolon (Volon A) auf die a-Welle.....	37
3.2.1 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon (Volon A) bei direkter Applikation auf die a-Welle	37
3.2.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung der Trägerflüssigkeit des rt-PA und des Ranibizumab (Lucentis) auf die a- und b-Welle	37
3.2.3 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung einer Negativprobe (bovines IgG)) auf die a- und b- Welle	38
3.2.4 Das Versuchsprotokoll zur histologischen Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon (Volon A) bei direkter Applikation.....	38
3.3 Ergebnisauswertung.....	38
3.3.1 Auswertung der Elektroretinogramme	38
3.3.2 Darstellung der Versuchsergebnisse.....	39
4. Ergebnisse	40
4.1 Beurteilung der Wirkung von Bevacizumab(Avastin)/rt-PA auf die b-Welle	41
Abbildung 8: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 0,25 mg/l Bevacizumab und 20 µg/ml rt-PA. Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standartabweichung eingefügt worden. Der schwarze Querbalken über dem Graphen zeigt die Dauer der Applikation an.	
4.2 Beurteilung der Wirkung von rt-PA auf die b-Welle	41
4.3 Beurteilung der Wirkung von Ranibizumab (Lucentis) auf die b-Welle.....	45
4.4 Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon auf die b-Welle bei indirekter Applikation.....	46
4.5 Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon bei direkter Applikation auf die b-Welle	47
4.6 Dosis-Wirkungsbeziehung von Triamcinolon bei direkter Applikation auf die b-Welle	48
4.7 Beurteilung der Wirkung von Avastin/rt-PA auf die a-Welle.....	49
Abbildung 16: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 0,25 mg/ml Bevacizumab und 20 µg/ml rt-PA. Die gestrichelt, gepunktete Linie zeigt die Applikation von 1 mM Aspartat zur Unterdrückung der b-Welle an. Der durchgängige Querbalken zeigt die Applikation von Bevacizumab und rt-PA an. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standartabweichung eingefügt worden	50
4.8 Ergebnisse der Versuche zur Beurteilung der Wirkung von rt-PA auf die a-Welle	51
4.9 Beurteilung der Wirkung von Ranibizumab (Lucentis) auf die a-Welle.....	54
4.10 Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon auf die a-Welle	54
4.11 Ergebnisse der Versuche zur Beurteilung der Wirkung von gelöstem Triamcinolon auf die a-Welle.....	55
4.12 Die Dosis-Wirkungsbeziehung von kristallinem Triamcinolon bei direkter Applikation auf die a-Welle	56

4.13 Beurteilung der Wirkung der Trägerflüssigkeiten von rt-PA und von Ranibizumab (Lucentis) auf die b- und a-Welle	59
4.14 Negativprobe für Bevacizumab	63
4.15 Darstellung der histologischen Ergebnisse zur dosisabhängigen Kristallablagerung von Triamcinolon bei direkter Applikation	64
4.16 Darstellung der histologischen Ergebnisse zur Untersuchung von abgestorbenen retinalen Ganglienzellen bei direkter Applikation von Triamcinolon.....	65
5. Diskussion	67
5.1 Zur Methodik	67
5.2 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Wirkung von Avastin/rt-PA auf das Elektroretinogramm	69
5.3 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Wirkung von Ranibizumab (Lucentis).....	71
5.4 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Wirkung von Triamcinolon (Volon A).....	72
5.5 Bevacizumab und Ranibizumab	76
6. Zusammenfassung.....	79
7. Abkürzungsverzeichnis:	80
8. Abbildungsverzeichnis und Legende:.....	80
9. Tabellen.....	83
10. Literaturverzeichnis:	84
11. Dank	93
12. Lebenslauf.....	93

1 Einleitung

1.1 Die altersbedingte Makuladegeneration

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) stellt in den westlichen Industrienationen die häufigste Erblindungsursache ab dem 65. Lebensjahr dar. Weltweit sind 25-30 Millionen Menschen betroffen (AMD Alliance International), wobei die Prävalenz mit dem Alter korreliert. So haben 19,4% der 55-65 jährigen eine AMD und 36.8% der über 75 jährigen (Klein R 933-43). In Deutschland ist die AMD die häufigste Ursache für den Bezug von Blindengeld (Stürzlinger H). Mit der demographischen Alterung in der westlichen Welt, wird wahrscheinlich auch die Prävalenz der AMD ansteigen und so noch wesentlich an Bedeutung gewinnen (Thylefors B 115-21; Stürzlinger H). Bei der Klassifizierung der fortgeschrittenen AMD unterscheidet man ein Früh- und ein Spätstadium, sowie die trockene Form von der feuchten bzw. exsudativen AMD. Das Frühstadium äußert sich durch Drusen (Ablagerungen von abnormen, eiweiß- und lipidhaltigem amorphen Material in der Bruch'schen und zwischen Bruch'scher Membran und retinalem Pigmentepithel). Dabei kann es zu einem leichten Visusverlust kommen (Berrocal MH 486-93; Kanski JJ 405-19). Im weiteren Verlauf kann sich entweder das Spätstadium der trockenen AMD entwickeln oder in die feuchte/exsudative Verlaufsform (ca. 15%) umwandeln. Die Spätform der trockenen AMD führt zu einem lokalen langsamen Zelluntergang des retinalen Pigmentepithels im Bereich der Makula und damit zu einer nutritiven Mangelsituation der äußeren Schicht der neurosensorischen Netzhaut. Dieses wiederum mündet dann in den Untergang der Photorezeptoren und dementsprechend in einer langsam fortschreitenden Funktionsminderung. Die feuchte AMD geht mit einem dramatischeren Visusverlust einher. Charakteristisch ist die Induktion von choroidalen Neovaskularisationen (CNV), welche z.B. durch Blutungen, Exsudation und die begleitende lokale Entzündungsreaktion die Photorezeptoren schädigen (Pauleikhoff D 1065-84). Die neovaskulären Formen sind für 80-90% der schweren Visusverluste im Krankheitsverlauf verantwortlich (Ferris FL, 1640-

42). Bei der exsudativen AMD werden die verschiedenen Typen nach Lokalisation und nach fluoreszeinangiographischen Kriterien unterschieden: So spricht man bei einer Entfernung der neovaskulären Membran (CNV) von mehr als 200 µm vom Zentrum der fovealen avaskulären Zone (FAZ) von einer *extrafoveolären CNV*, bei einem Abstand von 1 µm-199 µm von einer *juxtafoveolären CNV* und bei einem Abstand von 0 µm, entsprechend einer Lage unterhalb des Zentrums der FAZ, von einer *subfoveolären CNV* (Bird AC 367-74). Ferner unterscheidet man noch die klassische von der okkulten CNV bzw. deren Mischform, die minimal-klassische CNV. Klinisch gesehen haben die meisten Patienten eine Mischform aus feucht und okkult.

Die verschiedenen Unterformen der feuchten AMD zeigen variabel schwere Verläufe und werden unterschiedlich erfolgreich behandelt (siehe Therapieansätze der AMD). Aber auch die Prognosen und Verläufe sind unterschiedlich. So haben z.B. die Macular Photocoagulation Study Group (MPS)1980 (Macular Photocoagulation Study Group 694-701), Coscas und Soubrane 1983 (Coscas G 912-18) in ihren Studien gezeigt, dass der Verlauf einer extrafovealen klassischen CNV einen Visusverlust von ≥ 3 Zeilen im Verlaufe von zwei Jahren in 56-86% der Fälle mit sich bringt (Pauleikhoff D 1065-84). Als Risikofaktoren für die Entstehung der AMD werden ein hohes Lebensalter (Thylefors B 115-21), eine genetische Komponente und das Rauchen diskutiert. So wurde in einer Zwillingsstudie entdeckt, dass die Erblichkeit für eine ausgeprägte frühe und späte AMD zusammen ca. 67% beträgt (Seddon J 321-27). Obwohl für das weibliche Geschlecht eine höhere Prävalenz beobachtet wurde, ist das Geschlecht als Risikofaktor fraglich, da dieser Unterschied auch sicherlich durch den höheren Anteil von Frauen an der älteren Bevölkerung bedingt ist (Lacour M 101-33). In Tabelle 1 sind die Unterscheidungskriterien nochmals zusammengefasst.

Tabelle 1

Unterscheidungskriterium	Klassifikation	Definition
Lokalisation	Extrafoveal	Entf. ≥ 200 µm von Zentrum der avaskulären Zone

	Juxtafoveal	Entf. 1-199 µm
	Subfoveal	Lage direkt unter dem Zentrum der avaskulären Zone
Anteil der klassischen CNV	Überwiegend klassisch	Areal mit klassischer CNV >50% des Gesamtareals
	Minimal klassisch	Areal mit klassischer CNV <50%, aber >0%
	Nur okkult	Keine Areale mit klassischer CNV nachweisbar

1.2 Pathophysiologie der exsudativen neovaskulären AMD

Die Gründe für die Entstehung der subretinalen Neovaskularisationen im Rahmen der AMD sind noch nicht komplett aufgeklärt, jedoch scheint ein Ungleichgewicht zwischen den die Angiogenese fördernden und hemmenden Faktoren ursächlich zu sein.

Das retinale Pigmentepithel (RPE) produziert eine Reihe von Zytokinen, u.a. den „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) und das Angiopoetin 1 (Ang 1), welche eine spezielle Wirkung auf das Endothel der Choriokapillarisgefäße entfalten. So fördert Ang 1 den Erhalt von reifen Gefäßen und deren Interaktion mit den umgebenden Stützzellen (Suri C 1171-80). VEGF und seine Isoformen gelten heute als Schlüsselfaktoren des Gefäßwachstums und beeinflussen Proliferation, Migration (Ferrara N 1-30) und Überleben der Endothelzellen (Alon T 1024-28). Desweiteren werden VEGF noch chemotaktische, neuroprotektive, proinflammatorische und permeabilitätssteigernde Eigenschaften zugeschrieben. Im Vergleich zu Histamin bewirkt VEGF eine 50.000fach größere Permeabilitätssteigerung (Völcker M 476-83). Es werden

unterschiedliche Isoformen von VEGF von den RPE Zellen sekretiert, wobei die im Auge am häufigsten vorkommende Isoform beim Menschen VEGF 165 ist. Sie liegt teils gebunden und teils ungebunden vor (Ferrara N, Gerber HP, und Le Couter J 669-76) und scheint eine zentrale Rolle in der Entstehung der CNV bei der feuchten AMD zu besitzen (Holz FG 82-85).

Weiterhin sezerniert das RPE noch Faktoren, die das Endothelwachstum verlangsamen und Apoptose induzieren können. Hier ist der „Pigment Epithelial Derived Factor“ (PEDF) zu nennen (Dawson DW 245-48), der vermutlich dem VEGF als Gegenspieler gegenüber steht. Verschiedene Umstände beeinflussen nun die Expression dieser Faktoren: Mit zunehmendem Alter nimmt die intravitreale Konzentration von PEDF ab. Ähnliches konnte auch bei der neovaskulären Form der AMD und bei Hypoxie beobachtet werden (Holekamp NM 220-27). Im Gegensatz dazu wird VEGF hauptsächlich durch Hypoxie induziert (Dawson DW 245-48) und in Augen mit einer neovaskulärer AMD vermehrt exprimiert (Holekamp NM 220-27). Die Bruch'sche Membran als Diffusionsbarriere unterliegt in ihrer vertikalen Ausdehnung und Zusammensetzung ebenfalls altersbedingten Veränderungen. So nimmt die Dicke in rechnerisch 100 Jahren durchschnittlich um 135% zu, von 2,0 auf 4,7µm. Gleichzeitig nimmt die Gefäßdichte der Choriokapillaris bei gleich bleibender Dichte um bis zu 45% ab (Ramrattan RS 2857-64). Außerdem werden im Alter in der Makula und peripheren Bruch'schen Membran vermehrt Phospholipide, Triglyceride, Fettsäuren und freies Cholesterol eingelagert, wobei vor allem die Lipidanteile im Bereich der Makula stärker als in der Peripherie akkumulieren (Holz FG 402-06). Das RPE steht zusätzlich noch mit den äußeren Netzhautschichten in Kontakt und phagozytiert permanent distal Photorezeptoraußensegmente, die zusätzlich die Diffusion behindern. Durch diese eben beschriebenen Diffusionsbarrieren und Abnahme der Gefäßdichte der Choriokapillaris, wird das RPE langsam zunehmend einer Hypoxie ausgesetzt, was wiederum zur vermehrten Freisetzung von VEGF im Alter führt und die Entstehung einer neovaskulären AMD fördert (Joussen AM 284-91; Miller DW, Joussen AM und Holz FG 92-96).

Die Schädigung der Netzhaut erfolgt bei der CNV durch die geringe Dichtigkeit und die Brüchigkeit der neugebildeten Gefäße, die klinisch zu subretinalen Flüssigkeitsansammlungen, subretinalen Blutungen, weichen Exsudaten (Aufquellung von Nervenfasern), oder einer Ablösung des RPEs führen, welche wiederum eine Schädigung der Photorezeptoren nach sich ziehen und infolge mit einem schweren Funktionsverlust einhergehen (Pauleikhoff D 1065-84). Besonders ausgeprägt ist der schädigende Barriereeffekt bei subretinalen Blutungen, da dieser den Metabolismus zwischen Netzhaut und Choriokapillaris einschränkt. Zusätzlich wirkt sich Eisen, welches vom Hämoglobin freigesetzt wird, toxisch aus, da es mit dem Energiestoffwechsel interferiert und die Mangelsituation der Photorezeptoren weiter verstärkt. (Glatt H 762-73; Toth CA 723-29; Avery RL 183-89; Berrocal MH 486-93; Bressler N 375-413; Scupola A 97-102).

1.3 Therapieansätze der AMD

In dieser Arbeit wird ausschließlich auf Therapien eingegangen, die auf die Behandlung der neovaskulären Membranen zielen, welche die eigentliche Ursache der exsudativen AMD darstellen. Eine effektive Behandlung der trockenen AMD existiert zurzeit noch nicht.

Die Therapieansätze der AMD haben sich innerhalb der letzten zehn Jahre grundlegend verändert. Waren die Therapieergebnisse in der Vergangenheit noch so begrenzt, dass alleine die Behandlung zu einer zusätzlichen Schädigung der Netzhaut, wie z.B. bei der Laserkoagulation, führte und das Ziel der Behandlung in einer Stabilisierung der Sehschärfe auf niedrigem Niveau zu sehen war, so haben sich in jüngster Zeit immer differenziertere Therapiemöglichkeiten hervorgetan (Maier M 1-23). Neben der Photodynamischen Therapie (PDT), welche relativ selektiv die neovaskulären Membranen behandelt, wurden zunehmend auch operative Methoden verfolgt, wie z.B. die Makulatranslokation, deren Ziel es ist, die neurosensorische Netzhaut auf einen gesünderen Untergrund zu verlagern (Aisenbrey S 451-59; Gelisken F und Bartz-Schmidt KU 144-49).

Mit der Veröffentlichung der Ergebnisse der „Submacular Surgery Trials“ (SST-Studie) 2004, die zeigte, dass die CNV-Extraktion zu keiner Visusstabilisierung führt (Submacular Surgery Trials (SST) Research Group 1967-80), sowie der „Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy“ (TAP)-Studienergebnisse (Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group 198-207), die zeigten, dass durch die PDT nur eine Stabilisierung gegenüber dem Spontanverlauf der Erkrankung bewirkt wurde, ergab sich die Notwendigkeit für die Entwicklung anderer Therapiestrategien.

1.3.1 Die intravitreale Therapie

Im Folgenden soll nun ein kurzer Überblick über die intravitrealen therapeutischen Möglichkeiten, mit besonderem Schwerpunkt auf die in dieser Arbeit behandelten Substanzen, gegeben werden.

1.3.2 Triamcinolon als Monotherapie

In Tiermodellen konnte die Anwendung von Triamcinolon eine Verkleinerung der retinalen Neovaskularisation bewirken (Ciulla TA 399-404) und wurde in den 1980er-Jahren für die intravitreale Injektion zur Behandlung ophthalmologischer Krankheitsbilder vorgeschlagen (Machemer R 171-80). Die gängigen Dosierungen waren 4 mg und 25 mg. Die vielversprechenden Ergebnisse der Therapie mit Triamcinolon auf die Visusentwicklung der AMD-Patienten (Danis RP 244), die in nachfolgenden Studien bestätigt werden konnten, wiesen auf einen zeitlich limitierten Therapieerfolg mit der Notwendigkeit erneuter Applikationen hin. Eine Stabilisierung des Visus war nur für den Zeitraum von 3-7 Monaten nachweisbar (Jonas J, Kreissig I und Degenring R 113-20). Eine initiale Verbesserung des Visus 3 Monate nach Applikation von 4 mg, die in der einzigen randomisierten placebokontrollierten Doppelblindstudie zur Evaluierung des Behandlungserfolgs von TA bei einer neovaskulären AMD von Gilles et al. 2003 durchgeführt worden war (Gillies MC 667-73) zeigte auch nach einem Jahr einen signifikanten Unterschied in Bezug

auf die Größe der CNV zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe. Allerdings konnte im Gegensatz dazu nach einem Jahr kein Unterschied in Bezug auf die Visusentwicklung zwischen den beiden Behandlungsgruppen mehr nachgewiesen werden (Gillies MC 667-73). Erste Untersuchungen zur Sicherheit der Therapie (Challa J 188-92) zeigten, dass die intravitreale Injektion als spezifische Nebenwirkungen des Steroids einen Tensioanstieg und Kataraktprogression mit sich bringt (Gillies MC 667-73; Jonas J 579-80; Jonas J, Spandau U, and Kampeter BA 387-94), durch die Injektionsform wurde ein erhöhtes Endophthalmitisrisiko erzeugt, wobei postuliert wurde, dass dieses erhöhte Risiko nicht wirkstoffspezifisch, sondern eher applikationsformspezifisch ist (Jager RD 676-98). Neuere in-vitro Studien haben gezeigt, dass eine Konzentration von 200 µg/ml und sogar weniger einen toxischen Effekt auf RPE-, Glia- und neurosensorische Zellen haben, ganz im Gegensatz zu den zuvor gesammelten Erfahrungen (Yeung CK 5300). Dieses Dilemma wurde so erklärt, dass die Toxizität von Triamcinolonkristallen ohne direkten Kontakt zur Netzhaut sehr moderat ausfiel. Dagegen zeigte sich bei direktem Kontakt von nur kleinsten Kristallablagerungen, die die klinischen Konzentrationen weit unterschritten, schon die Induktion einer Apoptose (Szurman P 584-92; Surman P, Sierra A 44-53). Bei dem fehlenden Nachweis eines therapeutischen Effekts erscheint die Monotherapie der neovaskulären AMD mit Triamcinolon momentan nicht sinnvoll (Makulakommission der DOG und DRG).

1.3.3 Antiangiogenetische Therapie

Ziel der heutigen antiangiogenetischen Therapie ist es, den Botenstoff VEGF zu inhibieren, der für die Entstehung, das Wachstum und die Komplikationen der CNV eine bedeutende Rolle spielt.

1.3.3.1 Ranibizumab

Ranibizumab (Lucentis®/Gentech) ist kein vollständiger Antikörper, sondern nur das Fab-Fragment (Antigen bindende Domäne) (Ferrara N 859-70) eines

monoklonalen Antikörpers der Maus (A4.6.1), der gegen humanes VEGF-A gerichtet ist. Dieses Fab-Fragment wurde humanisiert (rhuFab VI, Fab 12) und in seiner Affinität verstärkt. Auf diese Weise entstand die Y0317 Variante, der verwendete Wirkstoff (Kaiser PK 660-68). Ranibizumab besteht aus fünf variablen Domainsubstituenten und einem am C-Terminus der schweren Kette gelegenen konstanten Segment. Die Affinität der Y0317 Variante übersteigt die von Fab 12 ungefähr um den Faktor 100, was zum Großteil an verbesserten Dissoziationseigenschaften liegen soll (Chen Y 865-81). Es werden alle bioaktiven VEGF-A Formen intraokulär inhibiert, bei einer biologisch aktiven Konzentration von Ranibizumab, die sich im Affenmodell in präklinischen Studien für ungefähr einen Monat hielt. Im Serum war die Konzentration bei intravitrealer Injektion 1000-2000fach niedriger als im Auge (Gaudreault J 726-33).

In zwei großen Phase 3 Studien, namentlich die MARINA- und ANCHOR-Studien wurde Ranibizumab untersucht. Die doppel-blind, randomisierte MARINA Studie betrachtete 716 Patienten mit minimal klassischen oder rein okkulten CNV über einen Zeitraum von zwei Jahren, welche in drei Gruppen, eine 0,3 mg-, eine 0,5 mg- und eine Placebogruppe, unterteilt wurden, denen monatlich intravitreal Verum oder Placebo injiziert wurden. In den Verumgruppen erreichten 95% der 0,3 mg-Gruppe und 96% der 0,5 mg-Gruppe den primären Endpunkt (Visusverlust kleiner als 15 Buchstaben), wohingegen nur 62% der Placebogruppe einen ähnlichen Verlauf zeigten. Nach einem Jahr Beobachtungszeitraum zeigten die Behandlungsgruppen eine Visusverbesserung von durchschnittlich 6,5 bzw. 7,2 Buchstaben, während die Placebogruppe durchschnittlich 10,4 Buchstaben Visusverschlechterung aufwies. Eine Visusverbesserung nach einem Jahr trat in den Verumgruppen bei 25% bzw. 34% auf, bei der Kontrollgruppe nur bei 5%. Diese Visusentwicklung hielt sich auch im zweiten Studienjahr unter Behandlung. Das Komplikationsspektrum umfasste folgende Risiken: Uveitis (weniger als 1,7% der Gesamtzahl) und Endophthalmitis (weniger als 1,7%) (Rosenfeld PJ 1419-31).

In der ANCHOR Studie wurden 423 Patienten mit klassischer CNV auf drei

Behandlungsarme doppelblind randomisiert: Photodynamische Therapie mit Verteporfin mit monatlicher intravitrealer Placeboapplikation, monatliche Applikation von 0,3 mg Ranibizumab und photodynamischer Scheinbehandlung wurde durchgeführt, sowie monatliche Applikation von 0,5 mg Ranibizumab mit photodynamischer Scheinbehandlung. Nach 12 Monaten erreichten 94% der 0,3 mg Gruppe und 96% der 0,5 mg Gruppe den primären Endpunkt (Visusverlust kleiner als 15 Buchstaben), aus der Verteporfin-Verum-Gruppe nur 64%. 35% bzw. 40% der Verumgruppen erzielten eine Visusverbesserung von 15 oder mehr Buchstaben, bei 6% in der Verteporfingruppe. Die Komplikationen waren Endophthalmitis bei 1,4% und Uveitis bei 0,7% (Brown DM 748-50). Bei der Testung in der Zellkultur wurden noch keine zytotoxischen Nebenwirkungen, wohl aber proliferationshemmende festgestellt (Manzano RP 257-61; Spitzer MS 1837-42).

1.3.3.2 Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin) ist ein 149 kD schwerer anti-VEGF Antikörper, welcher schon seit 2003 in der Karzinomtherapie bekannt ist und unter anderem gegen das metastasierte kolorektale Karzinom eingesetzt wird und zuletzt im Rahmen verschiedener Augenerkrankungen zulassungsüberschreitend („off-label“) eingesetzt wird (Aisenbrey S 941-48; Haritoglou C 999-105; Moschos MM 37-44; Tewari A 1093-94). Die Notwendigkeit der Nutzung von Bevacizumab in der Behandlung ophthalmologischer Krankheitsbilder ergab sich aus der Tatsache, dass Ranibizumab einem Fab-Segment des vollständigen Antikörpers Bevacizumab entspricht, Bevacizumab wesentlich früher zur Verfügung stand und wesentlich preiswerter ist als Ranibizumab (Freeman WR 853-58). In ersten Studien mit Bevacizumab zur Behandlung der neovaskulären AMD zeigten sich vielversprechende Ergebnisse, wobei sich die Therapie zunächst auf die systemische Anwendung beschränkte (Michels S 1035-47). Eine Fallserie von 81 Augen mit monatlich 1,25 mg intravitreal ergab eine Visusstabilisierung bei Patienten, bei denen sich zuvor eine Therapie mit Pegabtanib (Macugen) als ineffektiv erwiesen hatte (Avery RL 372). Es zeigte sich, dass nach acht Wochen sowohl eine Verbesserung des Visus von 20/200

auf 20/80 der Snellen-Skala (mehr als 3 Zeilen auf der „Early Treatment of Diabetic Retinopathy“ [ETDRS]- Skala) auftrat, als auch eine Verbesserung des Makulödems. Ähnliche Ergebnisse zeigten nachfolgende Studien, so dass sich Bevacizumab als Therapieoption in der Behandlung der AMD fest etabliert hat (Bashshur ZF 1-9). Das Nebenwirkungsspektrum beinhaltet die Gefahr einer Uveitis und RPE-Risse in ca. 3,6% der Patienten mit neovaskulärer AMD (Gelissen F 694-702). Auch bei Bevacizumab lagen bis jetzt nur in-vitro Studien zu einer eventuellen Toxizität vor, die wie bei allen anti-VEGF Therapien einen gewissen antiproliferativen Effekt zeigten (Spitzer MS 1837-42). Wie sich dieser Effekt in der klinischen Anwendung auswirken könnte, bzw. welchen Effekt die Substanzen bei direktem Kontakt mit der Retina, vor allem in Bezug auf die Funktion der einzelnen Zellen, sowie deren Interaktion, haben könnten, dazu liegen bisher noch keine Untersuchungen vor.

1.3.3.3 Kombination von rt-PA und Bevacizumab (Avastin)

Subretinale Blutungen haben aufgrund der Versorgungsstörung zwischen Retina und Choriokapillaris, des Abscherens der äußeren Segmente der Photorezeptoren und des toxischen Effektes des Eisens, das aus dem Hämoglobin freigesetzt wird, eine schlechte Prognose für die Sehschärfe der Patienten (Glatt H 762-73; Toth CA 723-29). Diese Prognose ist noch schlechter, wenn die Blutung zusätzlich noch mit einer AMD assoziiert ist (Avery RL 183-89; Bressler N 375-413; Scupola A 97-102). Beim Einsatz von rt-PA zeigte sich ein kurz anhaltender Benefit für die Sehschärfe, jedoch verschlechterte sich diese bald wieder aufgrund der zugrunde liegenden Neovaskularisation (Oshima Y 193-198). Daher macht eine Applikation mit Bevacizumab, als Behandlung der Grundkrankheit Sinn, da die Effektivität allein schon in mehreren, allerdings unkontrollierten klinischen Studien gezeigt wurde. In diesen Studien ergaben sich keine Hinweise auf eine retinale Toxizität (Michels S 1035-47; Rosenfeld PJ 1419-31; Manzano RP 257-61). Wegen dieser Erfahrungen scheint eine Kombination aus rt-PA und Avastin einen guten neuen Behandlungsweg darzustellen. Allerdings wurde die Toxizität von rt-PA im Tiermodell schon untersucht (Johnson MW 108; Hrach CJ 659-63), und es

gilt als sicher, dass ab einer Dosis von mehr als 50 µg mit toxischen Effekten gerechnet werden muss. Das entspricht einer intravitrealen Konzentration von 10 µg/ml, wenn man von einem 5 ml Glaskörpervolumen ausgeht. Bei einigen Patienten wurde bei einer Dosis von 100 µg intravitreal appliziertem rt-PA als Komplikation eine inferiore Netzhautablösung festgestellt, die in der Gruppe von 50 µg jedoch nicht auftrat (Hesse L 273-77). Weiter wurden Fundusveränderungen bei einer Dosis von 33 µg beobachtet, was einer Konzentration von 6,6 µg/ml entspricht, so dass generell empfohlen wird, nicht mehr als 50µg zu verwenden (Hassan AS 1900-06). Es gibt jedoch eine Studie mit 17 Patienten, in denen wesentliche höhere Dosierungen verwendet wurden, wobei sich hier keine Hinweise auf eine retinale Toxizität zeigten (Singh RP 429-31).

Aufgrund älterer Studien über die intravitreale Injektion mit Aztreonam ($C_{13}H_{17}N_5O_8S_2$) geht man davon aus, dass die Toxizität von rt-PA mit dem in der Trägersubstanz enthaltenen L-Arginin zusammenhängt, weil dort ähnliche Beobachtungen analog zu der L-Arginindosis gemacht wurden (Loewenstein A 3466-76; Rowley SA 573-78). Diese Daten belegen die Notwendigkeit einer funktionellen Toxizitätstestung am Modell der isolierten, umspülten, bovinen Netzhaut.

1.4 Die Netzhaut, Aufbau und elektrophysiologische Grundlagen

Abbildung 1

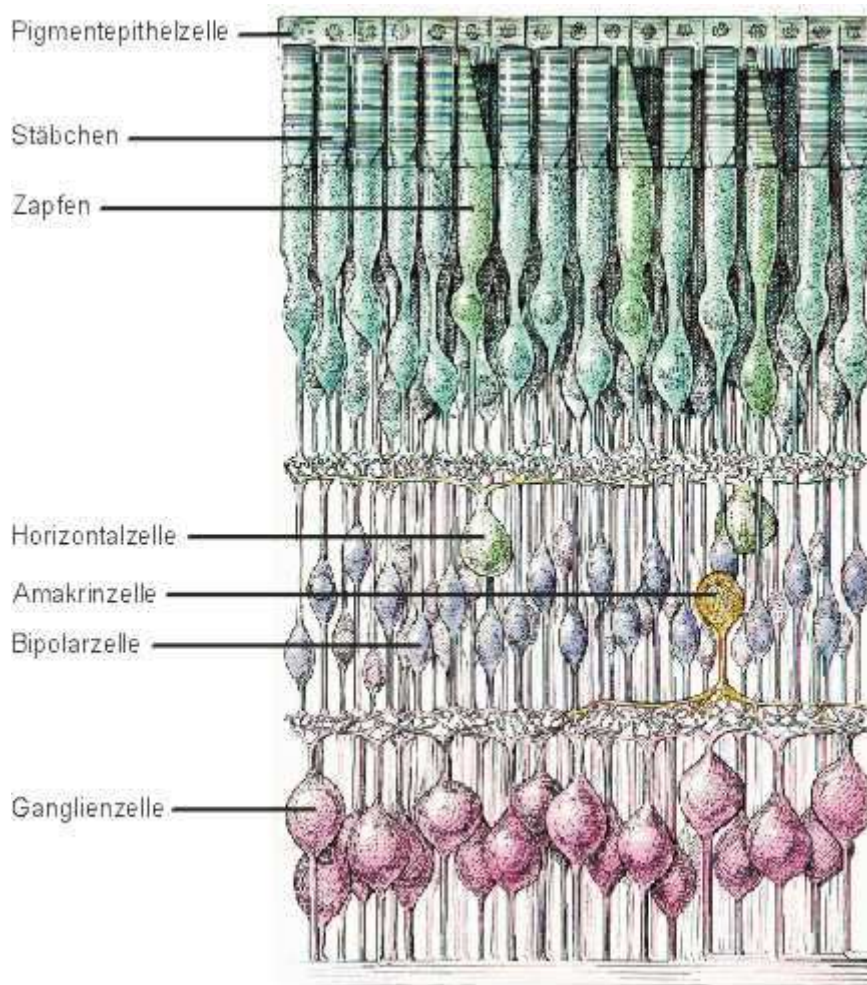


Abbildung 1: Modifiziert aus David H. Hubel (1989) *Auge und Gehirn. Neurobiologie des Sehens*. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg.

An dieser Stelle soll nur ein kurzer Überblick über den groben Aufbau und die Verschaltung der Netzhaut gegeben werden, von skleranah beginnend. Als erste Schicht sind dort die Photorezeptoren zu nennen, die direkten Kontakt zum Pigmentepithel haben und teilweise von diesem umschlossen werden. Das Pigmentepithel übernimmt unter anderem die Versorgung der Photorezeptoren und phagozytiert ihre Außensegmente. Die Perikaryen der Stäbchen und Zapfenzellen bilden die äußere Körnerschicht. Im Anschluss, weiter in Richtung Corpus vitreum, schließt sich die äußere plexiforme Schicht an, in der die Fortsätze der Photorezeptoren synaptisch mit den Horizontal- und Bipolarzellen

verschaltet sind, die mit den Zellkörpern der amakrinen Zellen die innere Körnerschicht bilden. Wieder weiter nach Innen hin schließt sich die innere plexiforme Schicht an, in der die Synapsenkontakte der amakrinen Zellen und die der Bipolarzellen mit den Ganglienzellen zu treffen sind. Diese Ganglien werden als Neurone der dritten Ordnung der neurosensorischen Retina gesehen. Aus den Axonen der Ganglienzellen wird die Ganglienzellfaserschicht gebildet, die als Nervus opticus zur Sehrinde ziehen. Die Müllerstützzellen bilden als Glia die Lamina limitans externa und die Lamina limitans interna. Ferner werden Ihnen als Gliazellen noch weitere nutritive Funktionen zugeschrieben (Dacey DM 737-63; Sterling P 205-79). Die Reiztransduktion in der Netzhaut ist für die Wahrnehmung visueller Reize essentiell und kann zugleich durch Ableitung eines Elektroretinogramms (ERGs) gemessen werden. Die Komponenten der Phototransduktion befinden sich an der Diskmembran der äußeren Segmente der Photorezeptoren. Trifft ein Photon auf ein Rhodopsinmolekül, so wird dieses isomerisiert und bildet einen Komplex mit Transducin, wodurch das am inaktiven Transducin gebundene GDP durch GTP ersetzt wird. Daraufhin zerfällt das Transducin in zwei Untereinheiten und setzt eine Signalkaskade in Gang, die einen cGMP Abfall im Zytoplasma bewirkt. Dieses cGMP wiederum würde in normaler Konzentration, also im Ruhezustand, Kationen-Kanäle der Photorezeptoren inaktivieren, bei einem Abfall der Konzentration werden die Kanäle jedoch aktiviert. Das besondere an den Sinnesrezeptoren der Retina ist, dass Sie im Ruhezustand depolarisiert und im Erregungszustand hyperpolarisiert sind. Bei anderen neuronalen Reizverarbeitungsmechanismen im Körper ist das Gegenteil der Fall. Diese Hyperpolarisation wird durch die bereits erwähnte Aktivierung der Kationen-Kanäle verursacht. Eine Untereinheit des Transducins besitzt nun eine intrinsische GTPase Aktivität und wandelt das GTP in GDP um, die Kaskade läuft nun in entgegengesetzter Richtung mit Erhöhung des cGMP-Spiegels im Zytoplasma ab. Die Kationenkanäle werden wieder geöffnet, dadurch wird die Plasmamembran depolarisiert, der Ruhezustand ist wiederhergestellt.

1.5 Das Elektroretinogramm (ERG)

Die Geschichte des ERGs geht bis in das Jahr 1849 zurück, als Du-Bois-Raymond am Bulbus eines enukleierten Fischeauges am vorderen und hinteren Pol Elektroden ansetzte und erstmalig ein Bestandpotential nachweisen konnte (Du Bois-Raymond E). 1879-1880 wurden von Holmgren am enukleierten Froschauge erstmals Bestandpotentialschwankungen nach Reizung durch Licht festgestellt, und damit das erste ERG abgeleitet (Holmgren F 278-86). Mit der Entwicklung schneller Galvanometer, also Drehpulsesswerke, die in der Lage sind kleinste Ströme und Spannungen nachzuweisen, konnten die Messungen der Bestandpotentialschwankungen weiter präzisiert werden, und es wurden verschiedene Wellen entdeckt. So definierte man die initiale negative Potentialschwankung als a-Welle, die folgende positive Potentialschwankung als b-Welle und eine langsame folgende Potentialschwankung als c-Welle.

Als Grundlage für diese Beobachtungen wurden die Arbeiten von Granit 1933-1948 genommen, der in gründlichen Studien an Frosch- und Katzennetzhäuten im Wellencharakter des ERG drei verschiedene, durch Äther, bzw. Sauerstoffmangel konsekutiv supprimierbare Komponenten entdeckte und diese in zeitlicher Reihenfolge als P I, P II und P III bezeichnete (Granit R 239). In Abbildung 2 ist die historische Abbildung von Granits Veröffentlichung mit den Komponenten und verschiedenen Wellen abgebildet.

Die a- Welle wird, wie spätere Forschungen ergaben, als Summenäquivalent der Signale der Photorezeptoren gewertet, die durch das eintreffende Licht hyperpolarisieren. Der negative Ausschlag ist also als cornea-negativer Ausschlag zu werten (Derwent JJ 353-63; Jamison JA 445-55). Die b-Welle wird als nachfolgende Reizverarbeitung des höheren neuronalen Netzwerkes in den inneren Netzhautschichten gedeutet (Hood DC 107-26), wobei die Meinungen über den direkten zellulären Ursprung der b- Welle auseinandergehen: Eine Theorie gibt aber an, dass die Bipolarzellen als indirekte lichtinduzierte Antwort über die Photorezeptoren die b-Welle erzeugen (Shiells RA 503-11). Eine frühere Theorie machte die Müllerzellen verantwortlich, die als Reaktion auf den Anstieg des extrazellulären Kaliums,

verursacht durch die Depolarisation der Bipolarzellen, ebenfalls mit einer Depolarisation antworten. Dieses bewirkt einen transretinalen Strom und generiert somit die b-Welle (Miller RF 323-41). Derzeit ist man der Ansicht, dass sowohl die Müller- als auch die Bipolarzellen direkt an der Entstehung der b-Welle beteiligt sind (Xu X 96-105).

Der Ursprung der c-Welle ist weiterhin umstritten. So konnten ältere Theorien, die besagten, dass das Pigmentepithel der Ursprungsort der c-Welle ist, durch Nachweis einer c-Welle ohne Pigmentepithel widerlegt werden. Sie wird mit Stoffwechselprozessen innerhalb der Netzhaut in Verbindung gebracht werden (Sickel W 115-24).

Abbildung 2

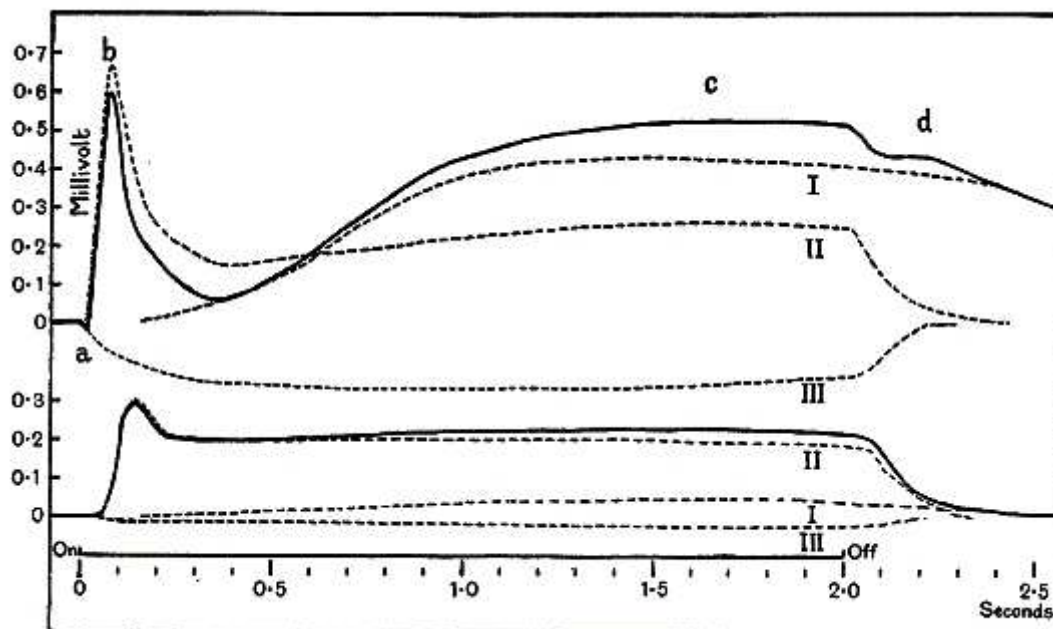


Abbildung 2: historische, modifizierte Abbildung aus: Granit "The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve", J Physiol 1933.

Legende (Übersetzung): Analyse des zusammengesetzten retinalen Aktionspotentials bei zwei Intensitäten, 14 mlx, und 0,14 mlx und einem Bereich von 1661 mm² beobachtet aus einer Entfernung von 70 mm. Bestandteile: gestrichelte Linien. Zusammengesetzte Kurve ist in durchgehenden Linien gezeichnet. Die a-Welle ist etwas dicker gezeichnet, um die Abweichung besser zu zeigen.

Bereits 1945 wurde das ERG klinisch nutzbar gemacht, indem Karpe bei an Retinitis Pigmentosa erkrankten Patienten ERG-Veränderungen nachweisen konnte (Karpe G 1-118). Das klinische Einsatzgebiet des ERGs erstreckt sich

auch heute insbesondere auf die Erkennung von Netzhautdegenerationserkrankungen oder –dystrophien. In der Forschung hat sich das ERG der isolierten umströmten bovinen Retina als pharmakologisches Messinstrument zur Untersuchung potentieller Retinotoxizität von Stoffen etabliert (Lüke M 27-36) und wurde schon in einer Reihe von orientierenden Untersuchungen anderer Wirkstoffgruppen genutzt (Lüke M, Januschowski K 1077-82).

1.6 Das Elektretinogramm als Messparameter der Netzhautfunktion

Bei einem Elektretinogramm, kann man zwei Wellenkomponenten unterscheiden. Die a- Welle wird als das durch die Photorezeptoren gebildete Summenpotential definiert, welches als erste Antwort auf einen Lichtreiz im ERG erscheint (Hood DC 107-26; Jamison JA 445-55). In Abbildung 3 ist exemplarisch eine a-Welle aus Originalaufzeichnungen dargestellt.

Abbildung 3

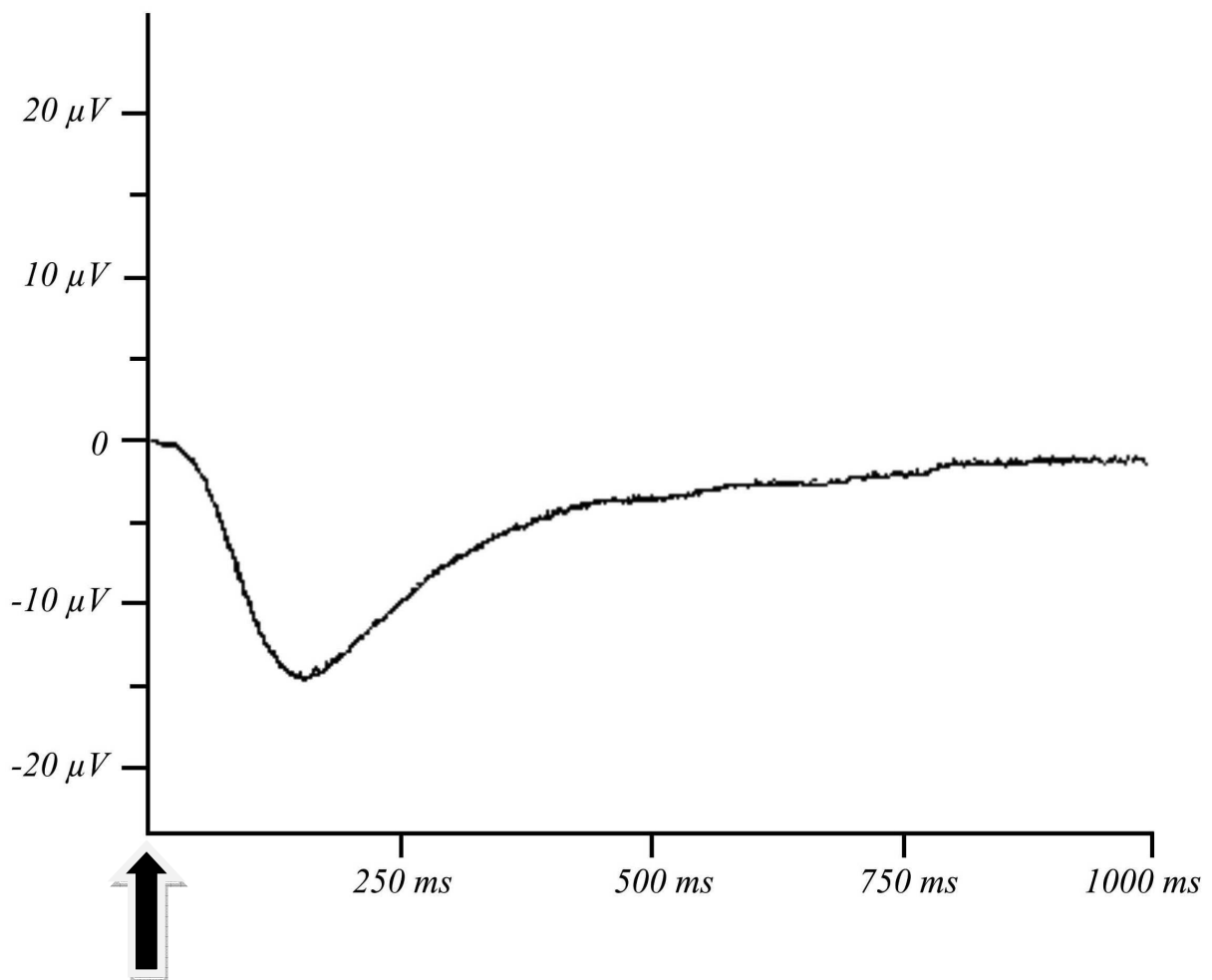


Abbildung 3: a-Welle (modifiziert aus: Lücke M 1077-82). Am Zeitpunkt 0 ms wurde der Lichtreiz gesetzt. Es ist der Verlauf der Photorezeptorantwort im skotopischen Bereich auf einen einzelnen Lichtreiz abgebildet. Zur Unterdrückung des höheren neuronalen Netzwerkes wurde zuvor 1mM Aspartat zur Nährlösung hinzugefügt.

Die Reiztransduktion der Photorezeptoren führt nachfolgend im höheren neuronalen Netzwerk der Netzhaut zur Generation der b-Welle (Hood DC und Birch DG 107-26). Sie tritt mit einer leichten Latenz auf und wird als erster positiver Ausschlag nach der a-Welle kommend definiert. In Abbildung 4 ist dies wieder mit einer Originalabbildung dargestellt.

Abbildung 4

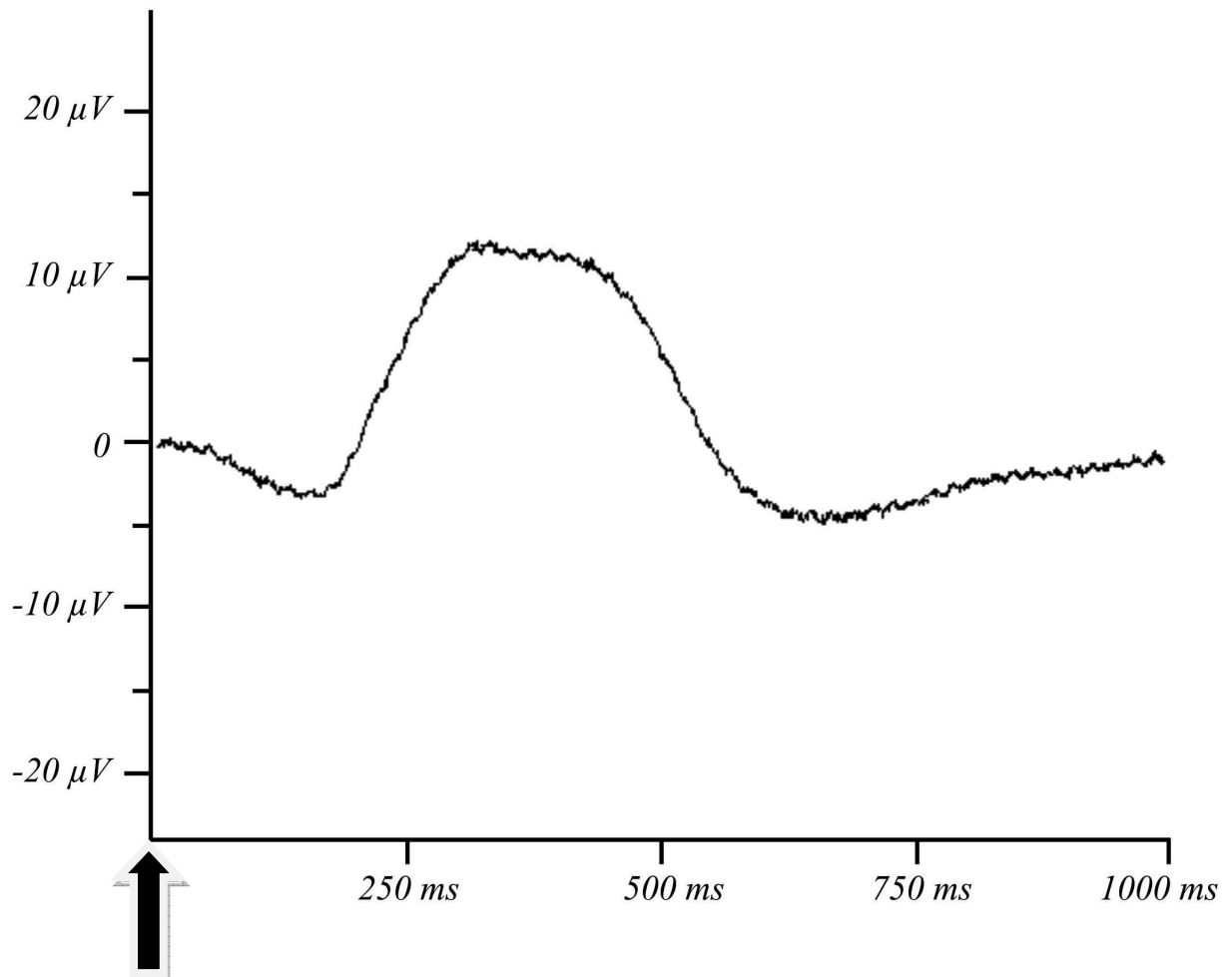


Abbildung 4: b-Welle (modifiziert aus: Lüke M 1077-82). Am Zeitpunkt 0 ms wurde der Lichtreiz gesetzt. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Antwort des höheren neuronalen Netzwerkes dargestellt, wobei die Höhe der b-Wellenamplitude von erstem lokalen Minimum (kurz vor 250 ms) bis zum ersten Maximum per definitionem gemessen wird.

Abbildung 3 wurde unter skotopischen Bedingungen aufgenommen, nachdem 1 mMol Aspartat der Nährlösung zugefügt wurde. Aspartat unterdrückt die

synaptische Transmission der Photorezeptoren auf das höhere neuronale Netzwerk, man sieht dementsprechend die reine Photorezeptorantwort.

Abbildung 4 stellt die b-Welle dar: Im skotopischen Bereich ist das nachgeschaltete höhere neuronale Netzwerk proportional zum ersten Neuron stärker als unter photopischen Bedingungen. So verursacht ein schwacher Lichtreiz -und damit eine Aktivierung von nur wenigen Photorezeptoren- eine intensive Signalverarbeitung im höheren neuronalen Netzwerk der Netzhaut, welche sich durch eine große Amplitude der b-Welle im ERG darstellt. Unter diesen Bedingungen lässt sich eine a-Welle schwer abgrenzen, da das negative Summenpotential der wenigen Photorezeptoren durch die starke laterale Informationsweitergabe überlagert wird.

Durch das ERG kann man Aussagen über den Zustand auf zellulärer und funktioneller Ebene treffen, wobei die b-Welle als sensibler Indikator auf funktioneller Ebene besonders aussagekräftig ist. Da man mit unterschiedlichen Reizintensitäten, oder Zugabe von Aspartat zur Nährlösung, gute funktionelle Beobachtungen durchführen kann, kann man den Wirkort und das Wirkverhalten verschiedener Substanzen auf die einzelnen Neuronenschichten untersuchen.

Beobachtet man z.B. eine Verminderung der b-Welle unter Exposition mit einem Wirkstoff, so kann dies, wie schon erwähnt, entweder an einer direkten Schädigung der inneren Netzhautschicht liegen, oder durch eine Schädigung der Photorezeptoren bewirkt werden, die sich dann indirekt auf die Amplitude der b-Welle auswirkt. Mithilfe der separaten Untersuchung der a-Welle kann man die Wirkart toxischer Effekte klären.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Toxizität der intravitreal applizierten Substanzen Bevacizumab (Avastin) in Kombination mit rt-PA, Ranibizumab (Lucentis) und Triamcinolon (Volon A) anhand elektrophysiologischer Ableitungen zu testen.

2 Material und Methodik

Die Methodik der umströmten und isolierten Vertebratennetzhaut orientiert sich an den Arbeiten von Sickel und Lüke (Sickel W 115-24;Lüke M 27-36).

2.1 Perfusionslösung

Die für die Versuche verwendete Perfusionslösung diente der Lagerung und der Ernährung der bovinen Netzhäute. Sie enthält 120 mMol/l NaCl, 2 mMol/l KCl, 0,1 mMol/l MgCl₂, 0.15mM CaCl₂, 1.5mM NaH₂PO₄, 13.5mM Na₂HPO₄ und 5mMol/l Glucose.

Die einzelnen Konzentrationen wurden empirisch ermittelt, im Hinblick auf eine möglichst lange Messbarkeit der retinalen Antworten im ERG. Da Nervenzellen einen hohen Stoffumsatz haben, muss auch an der präparierten, isolierten Netzhaut davon ausgegangen werden, dass verstärkt saure Metabolite anfallen, die abgepuffert werden müssen, damit das ERG nicht verändert wird. Zur Neutralisation ist hier das Phosphatpuffersystem wichtig, sowie die konstante Umströmung der Netzhaut, die die sauren Äquivalente schnell abschwemmt und so eine intrazelluläre Akkumulation verhindert. Weiterhin sind der pH-Wert der Lösung, der mit 7,8 alkalischer als der Blut pH-Wert ist und die Ca²⁺-Konzentration, die niedriger als die im Blut vorhandene Ca²⁺-Konzentration zu erwähnen. Aufgrund dieser durch die Perfusionslösung geschaffenen Bedingungen war es möglich, lang anhaltende und konstante Aufzeichnungen der Elektroretinogramme zu erhalten.

2.2 Präparation

Die Rinder wurden am Schlachthof gebolzt und die Augen anschließend enukleiert. Sie wurden danach sofort in einem lichtundurchlässigen, mit sauerstoffgesättigter Perfusionslösung gefüllten Gefäß aufbewahrt. Nach Enukleation war es innerhalb von 20-30 Minuten möglich, die Augen zu präparieren. Dies erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen mit einem Rotlicht. Zuerst wurden das periorbitale Fettgewebe und die Augenmuskelansätze, die von der Enukleation am Schlachthof verblieben waren, abpräpariert. Als nächstes wurde das Rinderauge in einen Präparationsblock eingelegt und durch eine äquatoriale Schnitfführung der vordere Abschnitt abgetrennt. Nach Entfernung des Vorderabschnittes wurde durch eine vorsichtige, rotierende

Bewegung mit einer Pinzette der Glaskörper von der Netzhaut gelöst. Danach war es möglich, den Glaskörper ohne Beschädigung der Netzhaut durch Ausgießen zu entfernen. Nun wurde der übrig bleibende Abschnitt des Rinderauges mit einem Messer in vier Quadranten geteilt und mittels Trepanation aus jeweils einem Quadranten eine Stanze mit Netzhaut und Sklera gewonnen und in eine Schale mit der sauerstoffgesättigten Perfusionslösung gelegt. Die so gewonnenen Stanzen wurden mit einer feinen Pinzette skleraseitig gefasst und die Netzhäute durch leichtes Schütteln vom Pigmentepithel entfernt. Durch die Stanzung und die Rundung des Auges wölbten sich die Netzhäute vor allem an den Stanzrändern leicht vor, so dass es jederzeit möglich war, die Photorezeptoreseite der Retina als solche zu identifizieren. So konnte man die Retina rezeptorseitig auf das Trägernetz überführen, welches zentral in einem Kunststoffträger eingebettet war. Diesen Kunststoffträger wiederum konnte man in eine Perfusionskammer nach Sickel einsetzen, die an das mit Sauerstoff gesättigte Nährlösungsgefüllte Perfusionssystem angeschlossen wurde. Es wurden jeweils zwei Rinderaugen präpariert, so standen jeweils acht Stanzen mit Netzhaut zur Verfügung. Die nicht verwendeten sieben Netzhautstanzen wurden in lichtundurchlässige, mit sauerstoffgesättigter Perfusionslösung gefüllte Behälter überführt und verschlossen bei 4-8°C aufbewahrt.

2.3 Perfusionskammer

Bei der Perfusionskammer handelt es sich um eine modifizierte Perfusionskammer nach Sickel. Die Perfusionskammer besteht aus einem Deck- und einem Bodenblock ca. 1 cm dicken Plexiglas. Beide Blöcke können durch vier, außen sitzende Schrauben fest verschlossen werden. In der Mitte beider Blöcke findet sich jeweils ein dichter Gummiring, zwischen den der Kunststoffträger mit der Netzhaut so eingebracht werden kann, dass die Perfusionskammer nach festem Zuschrauben des Deck- und Bodenblockes abgedichtet ist.

An einer Seite des Kunststoffträgers befinden sich ein Zufluss und ein Abfluss, welche mit dem Perfusionssystem konnektiert werden können. Auf der gegenüberliegenden Seite befinden sich Silberdrahtelektroden, die in den Kunststoffträger eingelassen sind. Die Perfusion innerhalb der Kammer erfolgt über einen Überlauf. Der epiretinal applizierte Lichtreiz kann ungehindert das Plexiglas durchdringen und die Photorezeptoren stimulieren. Die Reizantwort kann nun als Spannungsschwankung über das Nährmedium an die Silberelektroden weitergegeben, abgeleitet und sichtbar gemacht werden. Die Perfusionskammer ist als Schema in Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 5

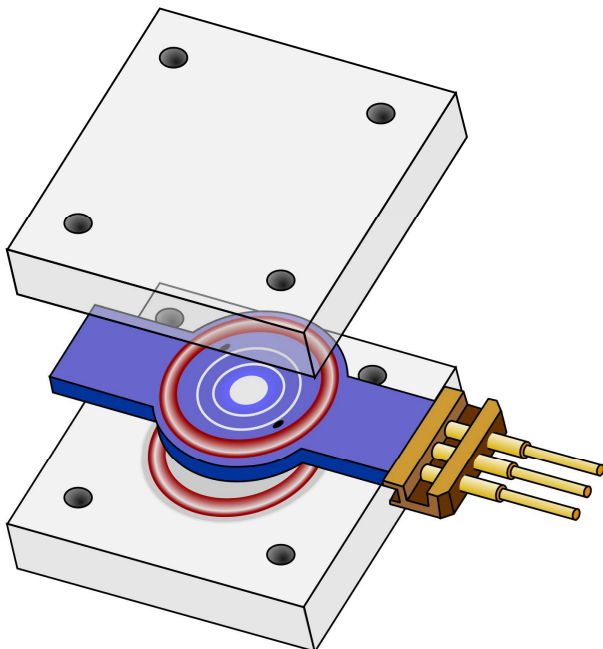


Abbildung 5: „Tübinger Kammer“ Perfusionskammer. Dargestellt ist der Kunststoffträger, in dem die präparierte Netzhaut befestigt ist, zwischen den beiden Plexiglasdeckplatten dargestellt. In den Kunststoffträger eingelassen sind die Elektroden zur Ableitung der ERGs.

2.4 Die modifizierte Perfusionskammer

Um die Wirkung der Triamcinolonkristalle bei direkter, intravitrealer Injektion zu simulieren war es nötig, die Kristalle direkt auf die Netzhaut zu applizieren. Hierzu wurden beidseitig, jeweils im oberen Teil der Perfusionskammer kleine Bohrungen angefertigt. Die Bohrkanäle verliefen im spitzen Winkel so auf das

Trägernetz, auf dem die Retina befestigt war, zu, dass man eine Kanüle zur Applikation direkt über die Netzhaut einbringen konnte, jedoch die Kanäle selbst nicht im Lichtstrahl der Reizquelle waren. Auch konnte die Kanüle die Netzhaut nicht perforieren, da die Bohrlöcher so bemessen waren, dass die Netzhaut selber mit der Kanüle nicht erreicht werden konnte. Während des kurzen Zeitraumes der Applikation wurde die Perfusion kurz gestoppt. Unter dem konstanten Fluss der Perfusionslösung (1ml/min) wurden dann die Versuche durchgeführt. Auf diese Art wurde versucht, eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Kristalle epiretinal zu ermöglichen. In der Abbildung 6 ist die modifizierte Perfusionskammer schematisch dargestellt.

Abbildung 6

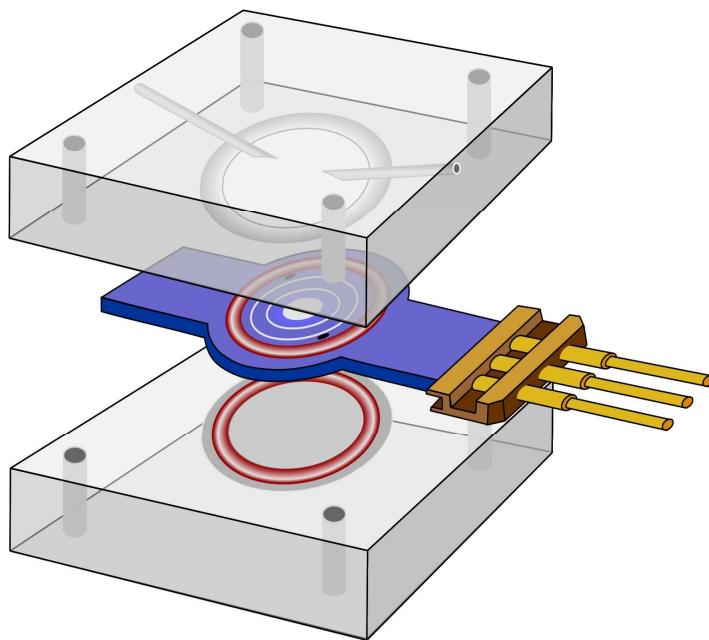


Abbildung 6: Modifizierte „Tübinger Kammer“ nach Januschowski und Lücke. Die Modifikation besteht in zwei Kanälen im oberen Teil der Plexiglasdeckplatte, siehe auch 3.14.

2.5 Sauerstoffgesättigte Nährlösung

Aus den Vorarbeiten und aus eigenen Versuchen war ersichtlich, dass man den Sauerstoffpartialdruck gegenüber Raumluft sättigung erhöhen musste, um eine PII-Komponente messen zu können. Dafür wurde folgendermaßen verfahren: Die Nährlösung und die Versuchslösungen wurden ständig über einen Schlauch mit 100% Sauerstoff begast und zusätzlich das obere Ende der

Erlenmeyerkolben mit einem Stopfen verschlossen. Zur besseren Verteilung des Sauerstoffes innerhalb der Perfusions- und Versuchslösungen wurde am Ende des Schlauches ein Aquarienstein befestigt. Dieses Verfahren garantierte die Umströmung der Netzhaut mit einer sauerstoffgesättigten Nährlösung.

2.6 Toxizitätsanalyse mit retinalen Ganglienzellen

Da bei der Versuchsreihe zum Triamcinolon die Ganglienzellen durch die Kristalle besonders gereizt wurden, wurden die Retinae zum Nachweis möglicher toxischer Effekte auf die retinalen Ganglienzellen nach den Durchflussmessungen aus der Perfusionskammer entnommen und eine Färbung zum Nachweis der Vitalität der Ganglienzellen durchgeführt. Hierfür wurde der LIVE/DEAD™ Viability/cytotoxicity kit (Molecular Probes™ invitrogen detection technologies) verwendet. Die Komponenten des LIVE/DEAD™ kits sind Calcein AM und Ethidium homodimer-1 (EthD-1). Letzteres durchdringt geschädigte Zellmembranen und bindet an im Kern enthaltene Nukleinsäuren. Dabei wird die Fluoreszenz des EthD-1 um das 40 fache verstärkt und eine hellrote Färbung im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2 imaging, Jena, Deutschland) bei einer Wellenlänge von ~495nm hervorgerufen. Das EthD-1 ruft in lebenden Zellen eine vernachlässigbare Fluoreszenz hervor, da es nicht mit den nukleären Nukleinsäuren interagiert. So konnte man selektiv die geschädigten Nervenzellen darstellen.

Zur Anfärbung aller Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI verwendet. Ursprünglich nahm man an, dass DAPI spezifisch an AT-Basenpaare bindet, im Nachhinein wurde jedoch auch die Bindung an GC-Basenpaare nachgewiesen. Im Fluoreszenzmikroskop wird durch DAPI eine hellblaue Fluoreszenz hervorgerufen.

Direkt nach der EthD-1 Färbung wurden die Zellen fixiert und die Membranpermeabilität durch 5 min Behandlung mit 0,01% Triton erhöht. Danach wurde die DAPI Färbung mit 6µg DAPI/ml mit einer Einwirkdauer von 10 Minuten durchgeführt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2 imaging, Jena, Deutschland) wurden sodann unter 40-facher Vergrößerung jeweils acht Fotografien (Zeiss

Axiovision imaging, Jena, Deutschland) von gleichen Regionen gemacht und sowohl die lebenden als auch die toten Retinazellen gezählt, um ein semiquantitatives Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen zu erhalten. Die Zellzählung wurde mithilfe des Programmes Analysis® (Soft Imaging system GmbH, Münster, Deutschland) durchgeführt.

2.7 Reizquelle

Zur Stimulation der Retina wurde eine Xenonlampe (xenon tube, Grass Technologies, West Warwick, RI) verwendet, die einen einzelnen 1Hz-Lichtreiz abgab. Die Reizintensität war auf 6,3 mlx auf der Netzhaut durch Filter (Wratten Filter; Kodak, Stuttgart, Germany) begrenzt. So konnte man gut messbare und vor allem konstante Reizantworten erhalten.

Um die Antworten des höheren neuronalen Netzwerkes zu unterdrücken, wurde 1 mMol/l Aspartat zur Supprimierung der synaptischen Übertragung jenseits der Photorezeptoren eingesetzt.

2.8 Herstellung der Stammlösungen

Die Stammlösungen, die untersucht wurden, sind mit verschiedenen Verfahren hergestellt worden, die hier vorgestellt werden sollen. Für die Avastin/rt-PA Stammlösungen wurden die kommerziell erhältlichen Produkte von Boehringer Ingelheim Deutschland Actilyse® (10mg Alteplase) und Avastin™ (Bevacizumab) von Roche Pharma Schweiz verwendet. Das rt-PA wurde in einer 10ml Charge mit 348,4 mg Arginin, 107,2mg H₃PO₄, 1mg Polysorbat 80 und Wasser für die Injektion geliefert. Für die Beurteilung der Wirkung der direkten Applikation von Triamcinolon wurden die Konzentrationen 1mg/ml, 2mg/ml, 8mg/ml, 20mg/ml und 40mg/ml des Volon-A™ von der Universitätsapotheke Tübingen hergestellt, zentrifugiert und in Insulinspritzen (jeweils 1ml) angeliefert. Der Benzylalkohol, von dem per se toxische Effekte bekannt waren (Lang Y 778-88) wurde nach einem etabliertem Verfahren zuvor fast vollständig entfernt (Hernandez-Ortega MC 350-51). Für die Testung des Ranibizumab (Lucentis) wurde die kommerziell erhältliche Flasche LUCENTIS®

von Novartis®, Basel, Schweiz verwendet. Die Herstellung der Trägerlösung wurde nach den Herstellerangaben (10 mM histidine HCl, 10% α,α -trehalose dihydrat, 0.01% polysorbat 20, pH 5.5) in der Universitätsapotheke Tübingen angefertigt.

3 Durchführung und Ergebnisauswertung

3.1 Versuchsdurchführung

3.1.1 Versuchsanordnung

Vor dem Einsetzen der Perfusionskammer in die Messvorrichtung wurde das Perfusionssystem angeschlossen und die Kammer luftblasenfrei mit Nährlösung gefüllt. Die Messvorrichtung befand sich in einem von thermischen und optischen Reizen abgeschirmten Käfig. Um einen konstanten Fluss der Perfusionslösung zu ermöglichen, wurde die Flussgeschwindigkeit der Nährlösung mit der Rollerpumpe „Peristaltic Pump P-1“ der Firma Pharmacia®, die kurz hinter dem Käfig angebracht war, kontrolliert. Nach dem Füllen der Kammer wurde sie in eine Ableitungsvorrichtung eingespannt. Die elektrischen Reizantworten wurden mithilfe des „Grass P 122 RM Amplifier“ (Grass Technosets™, Warwick USA) gefiltert und verstärkt (100 Hz-Hochpassfilter, 50 Hz-Kerbfiler, 100 000x Verstärkung). Danach wurden die Daten mit einem A/D Wandler (PCI-MIO-16-XE-50, National Instruments, Austin, TX) prozessiert und konvertiert. In dem isolierten Käfig befand sich direkt über der Perfusionskammer der Lichtstimulator „PS 33 Plus“ (Grass Telefactor™, Warwick USA), ein System aus Regulator und Xenon-Lichtquelle, das die Netzhäute durch gesteuerte Lichtreize von 10 ms Dauer reizte. Die Temperatur innerhalb der Perfusionskammer wurde dabei über die Perfusionslösung konstant auf 29-31°C gehalten. Dafür wurde das Schlauchsystem mit der Perfusionslösung kurz nach Abgang aus dem Erlenmeyerkolben in ein Wasserbad überführt. Dieses wurde an das Heizsystem „LKB-Multi Temp II“ der Firma Pharmacia® geleitet und auf 50°C erwärmt. Das aufgewärmte Wasser wurde wiederum in das Wasserbad geleitet

und kühlte auf 40° C ab. Das Schlauchsystem wiederum wurde als Spirale durch das Wasserbad geführt, damit sich die Perfusionslösung erwärmen konnte. Am Ende des Wasserbades wurde das Schlauchsystem in den Käfig überführt, wobei eine Temperatur von 29-31°C in der Perfusionskammer erreicht wurde. Innerhalb der Perfusionskammer wurde die Netzhaut zuerst glaskörperseitig und dann über den Überlauf auch rezeptorseitig umströmt. Nach Verlassen der Nährlösung aus dem Ausfluss der Perfusionskammer und des Käfigs wurde das Perfusionssystem an die Rollerpumpe überführt, die den Fluss der Perfusionslösung konstant hielt und sie in ein Auffanggefäß weiterleitete, wo sie dann verworfen werden konnte, oder aber zurück in den Erlenmeyerkolben floss, wo sie dann wieder mit Sauerstoff angereichert und rezirkulieren konnte.

Die elektrischen Reizantworten der Retinae wurden über die Perfusionslösung an die chlorierten Silberdrahtelektroden weitergeleitet, die in den Kunststoffträger eingelassen waren, in dem die Netzhaut auf einem Netz befestigt war. Die Signale wurden in einem Frequenzbereich von 0,1 Hz und 300 Hz gefiltert und dann 10.000-fach verstärkt. Diese Signale wurden dann an einen PC weitergeleitet und mittels der Software Labview® aufgezeichnet und sichtbar gemacht. In Abbildung 7 ist der Versuchsaufbau schematisch als Übersicht dargestellt.

Abbildung 7

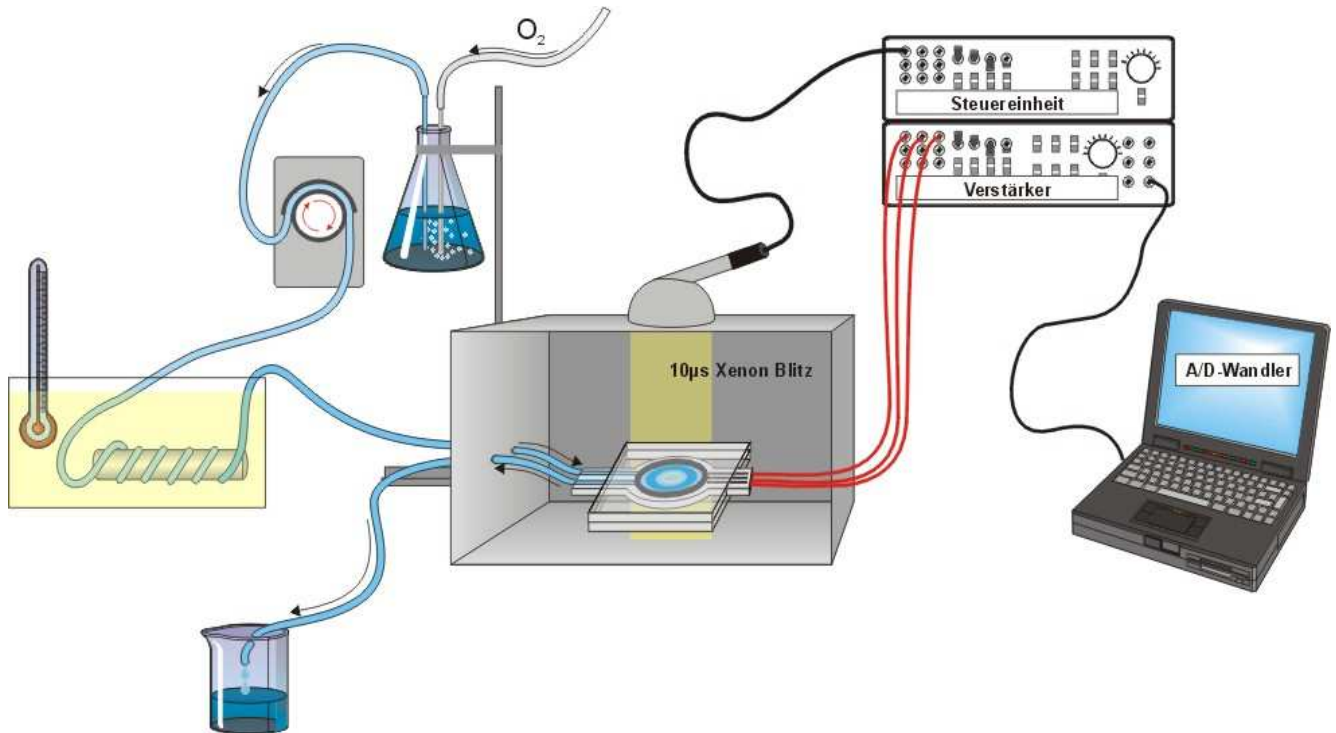


Abbildung 7: Versuchsaufbau, schematisiert.

3.1.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Avastin (Bevacizumab)/rekombinantem Gewebsplasminogen Aktivator (rt-PA) auf die b-Welle

Konstante Parameter für alle Versuchsreihen waren die Lichtreizdauer von 10 ms, das Reizintervall von 5 Minuten und die konstante Flussgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute.

Nach der Entnahme und Präparation der bovinen Netzhäute wurden diese in die Perfusionskammer eingelegt und diese wiederum an das Perfusionssystem angeschlossen und in den isolierten Käfig gestellt. Bei Dunkeladaptation und einer Lichtreizstärke von 6,3 mlx wurde das Erreichen konstanter b-Wellenamplituden abgewartet und die Messungen gestartet, wobei die konstanten Amplituden jeweils für 30 Minuten gemessen wurden und nicht um mehr als 1 μV voneinander abweichen durften. Anschließend wurde die Netzhaut der jeweils zu untersuchenden Konzentrationen von Avastin/rt-PA für 45 Minuten ausgesetzt. Um die Reversibilität der Effekte auf das ERG

beurteilen zu können, wurde nach dem Expositionszeitraum eine Auswaschzeit von mindestens 75 Minuten anberaumt.

3.1.3 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von rt-PA auf die b-Welle

Um die Wirkung von rt-PA bei alleiniger Applikation auf die b-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus 3.1.2 angewendet.

3.1.4 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Ranibizumab (Lucentis) auf die b-Welle

Um die Wirkung von Ranibizumab (Lucentis) auf die b-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus 3.1.2 angewendet.

3.1.5 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von gelöstem Triamcinolon (Volon A) auf die b-Welle

Um die Wirkung von gelöstem Triamcinolon (Volon A) auf die b-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus 3.1.2 angewendet.

3.1.6 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon (Volon A) bei direkter Applikation auf die b-Welle

Bis zur Exposition der Netzhäute mit Triamcinolon wurde verfahren wie unter 3.2.2, wobei die modifizierte Perfusionskammer verwendet wurde. Um die Wirkung der direkten intravitrealen Applikation von Triamcinolon auf die Retina zu testen, wurde die Perfusion gestoppt und die jeweils zu untersuchende Konzentration von Triamcinolon direkt über der Netzhaut, aber ohne direkten Kontakt über eine Kanüle appliziert. Anschließend wurde die Perfusion wieder gestartet und verfahren wie unter 3.12. Nach Ablauf der Zeit zur Untersuchung der Reversibilität möglicher Effekte von Triamcinolon wurde die Perfusion wiederum gestoppt, die Netzhaut vorsichtig entnommen und sofort die Färbung

mit dem LIVE/DEAD™ Kit durchgeführt und die Netzhaut danach fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die DAPI-Färbungen durchgeführt und die Netzhäute unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

3.1.7 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Avastin (Bevacizumab)/rekombinanter Gewebsplasminogen Aktivator (rt-PA) auf die a-Welle

Wie unter 3.1.2 beschrieben, wurde die Netzhaut in der Perfusionskammer in den Käfig gesetzt und an das Perfusionssystem angeschlossen. Unter einer Lichtreizstärke von 6,3 mW/cm² wurde gewartet, bis sich eine konstante b-Welle ausgebildet hatte (konstante Werte für 30 Minuten). Danach wurde diese b-Welle unterdrückt, indem Aspartat in einer Konzentration von 1 mMol/l zur Nährlösung zugefügt wurde. Wiederum wurde abgewartet, bis sich die b-Welle reduziert und eine konstante a-Welle ausgebildet hatte. Die a-Wellenamplituden wurden für 30 Minuten gemessen und durften keine Abweichung von mehr als 1 µV im Mittel zeigen. Wurde diese Bedingung erfüllt, so wurden die Netzhäute für 45 Minuten der jeweils zu untersuchenden Konzentration von Avastin/rt-PA ausgesetzt, gefolgt von einer Auswaschphase von mindestens 75 Minuten, wobei wieder die mit einer Konzentration von 1 mMol /l Aspartat versehene Nährlösung verwendet wurde. Zusätzlich wurde in manchen Fällen noch eine höhere Reizstärke eingesetzt, um die Rezeptorantwort noch etwas zu verstärken.

3.1.8 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von rt-PA auf die a-Welle

Um die Wirkung von rt-PA alleinig auf die a-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus 3.1.7 angewendet.

3.1.9 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Ranibizumab (Lucentis) auf die a-Welle

Um die Wirkung von Ranibizumab (Lucentis) auf die a-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus 3.1.7 angewendet.

3.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von vollständig gelöstem Triamcinolon (Volon A) auf die a-Welle

Um die Wirkung von Triamcinolon (Volon A) auf die a-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus 3.1.7 angewendet.

3.2.1 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon (Volon A) bei direkter Applikation auf die a-Welle

Bei der Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon bei direkter Applikation wurde bis zur Applikation verfahren wie unter 3.1.7. Danach wurde die Perfusion gestoppt und die jeweils zu untersuchende Konzentration von Triamcinolon direkt über der Netzhaut über eine Kanüle appliziert. Nach der Auswaschperiode wurde die Netzhaut wieder entnommen und die Färbungen durchgeführt (siehe 3.1.6).

3.2.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung der Trägerflüssigkeit des rt-PA und des Ranibizumab (Lucentis) auf die a- und b-Welle

Um die Wirkung der Trägerflüssigkeit des rt-PA auf die a-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus 3.1.7 angewendet, für die b-Welle entsprechend das Protokoll aus 3.1.2.

3.2.3 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung einer Negativprobe (bovines IgG)) auf die a- und b- Welle

Um die Wirkung einer Negativprobe für das Bevacizumab (Avastin) auf die a-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus 3.1.7 angewendet, für die b-Welle entsprechend das Protokoll aus 3.1.2.

3.2.4 Das Versuchsprotokoll zur histologischen Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon (Volon A) bei direkter Applikation

Unmittelbar nach Durchführung der Versuche wurden die Retinae behutsam entnommen und gefärbt. Zum Nachweis der Kristallsedimentierungen auf der Retina wurden die gefärbten Präparate nativ unter dem Mikroskop betrachtet. Zum Nachweis und zur semiquantitativen Messung der epiretinalen Kristallsedimentierung, sowie der eventuellen Toxizität wurden die Netzhäute nach direkter Applikation des Triamcinolons mit dem in 3.1.6 erwähnten LIVE/DEAD™ Viability/cytotoxicity kit (Molecular Probes™ invitrogen detection technologies) gefärbt und die abgestorbenen Zellen gegen die noch lebenden Ganglienzellen ausgezählt.

3.3 Ergebnisauswertung

3.3.1 Auswertung der Elektroretinogramme

Die Lichtreize zur Stimulation der Photorezeptoren und des höheren neuronalen Netzwerkes wurden durch einen Lichtblitz appliziert. Die elektrische Reizantwort der Retina wurde, wie schon erwähnt, über die Perfusionslösung an die chlorierten Silberelektroden weitergeleitet, die in den Kunststoffträger, in dem die Netzhaut eingespannt war, eingelassen war. Dort wurden sie vorverstärkt und in einer Bandbreite zwischen 1 Hz und 300 Hz an einen Speicheroszillographen transferiert. Dieser Speicheroszillograph war an einen PC angeschlossen. So konnten die Reizantworten mithilfe eines speziellen Softwareprogrammes (Lab view™, National Instruments) aufgenommen, ausgewertet und gespeichert werden.

Als erstes lokales Minimum der Reizantworten wurde zunächst die a-Welle registriert, die der Antwort der Photorezeptoren entspricht. Die b-Welle, stellvertretend als Reizantwort des höheren neuronalen Netzwerkes, wurde als erstes lokales Maximum erkannt. Die Messung erfolgte vom tiefsten Punkt des ersten lokalen Minimums bis zum Gipfel des ersten lokalen Maximums. Bei jeder Versuchsreihe und den zugehörigen einzelnen Versuchen wurde immer auch die Gipfellatenz registriert. Diese Latenzzeit zeigte diejenige Zeitspanne an, die zum Erreichen des ersten lokalen Minimums der a-Welle, oder diejenige, die zum Erreichen des ersten lokalen Maximums der b-Welle benötigt wurde (siehe Abb. 3 und Abb. 4)

3.3.2 Darstellung der Versuchsergebnisse

Neben der Verwendung der originalen Registrierungen der während der Versuche aufgenommenen Elektroretinogramme wurden auch Mittelwertskurven zur Beschreibung des Amplitudenverlaufens und Dosis-Wirkungs-Kurven verwendet, um die Ergebnisse der Versuche darzustellen. Für jede einzelne Versuchsreihe zu den bestimmten Konzentrationen wurde eine Mindestanzahl von 5 Versuchen durchgeführt, in einigen Fällen wurde von der Anzahl der Versuche abgewichen. Dies ist im Ergebnisteil dann jeweils extra angegeben.

Die einzelnen Messwerte der Versuche wurden in ein Koordinatensystem gegen die Zeit (t) aufgetragen, damit man den Verlauf der Amplituden der jeweils zu messenden Welle vor, während und nach der Exposition mit der jeweils zu untersuchenden Substanz darstellen konnte. Die einzelnen Messwerte wurden gemittelt und aus Ihnen Mittelwertskurven gegen die Zeit (t) erstellt.

Die prozentuale Minderung der Amplitudenhöhe unter Exposition während der Versuchsreihen wurden durch die Formel $(1-E_{45}/N_0)*100$ errechnet und ein Dosis-Wirkungsdiagramm erstellt. E_{45} stellt in dieser Formel den Amplitudenwert dar, der am Ende der 45 minütigen Expositionszeit der Netzhaut mit der jeweils zu messenden Konzentration der jeweiligen Substanz registriert wurde. N_0 stellt im Gegensatz dazu den letzten Amplitudenwert dar,

der vor Exposition gemessen wurde, also den Amplitudenwert, der als konstant angesehen wurde. Aus diesen beiden Werten wurde die prozentuale Minderung der Amplituden unter Exposition für den jeweiligen Versuch bestimmt. Zusätzlich wurden diese Graphiken noch durch die prozentuale Minderung der Amplitudenhöhe am Ende der Auswaschphase ergänzt. Zur Berechnung dieser wurde die Formel $(1-A75/N0)*100$ verwendet, wobei A75 die letzte Messung der Amplituden am Ende der jeweiligen Auswaschphase, also nach 75 Minuten, darstellt.

N0 steht wieder für den letzten gemessenen Wert der Amplituden vor Beginn der Exposition. Die Mittelwerte der Reduktionen der verschiedenen Amplituden, sowie die Standardabweichung wurden mithilfe der Datenverarbeitungssoftware „Origin 6.0“ von „Microcal“ ermittelt und den einzelnen Diagrammen hinzugefügt. Der Nachweis der Signifikanz wurde mit dem gepaarten t-Test durchgeführt, wobei ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ festgelegt wurde.

4. Ergebnisse

Für alle Versuche wurden die Umgebungsbedingungen (Sauerstoffpartialdruck, Temperatur und osmotischer Druck), denen die bovine Retina ausgesetzt wurde, zu jeder Zeit konstant gehalten. Es wurde davon ausgegangen, dass nach ca. zwei Stunden Perfusion konstante ERG-Amplituden erreicht werden, die mindestens zehn Stunden auf die Lichtreize ohne wesentliche Amplitudenverlust reagieren konnten (Lüke M 27-36).

4.1 Beurteilung der Wirkung von Bevacizumab(Avastin)/rt-PA auf die b-Welle

Es wurde zuerst die Konzentration 0,25 mg/ml Bevacizumab in Kombination mit 20 µg/ml rt-PA mithilfe des ERGs getestet. Während der Expositionszeit der Netzhaut wurde eine nicht signifikante Reduktion der b-Wellenamplitude von 14,2% registriert. In der Auswaschphase blieb die b-Welle weiterhin konstant und zeigte keine signifikante Reduktion im Vergleich zum Ausgangswert ($p=0,80$), wie in Abbildung 8 zu sehen ist.

Abbildung 8

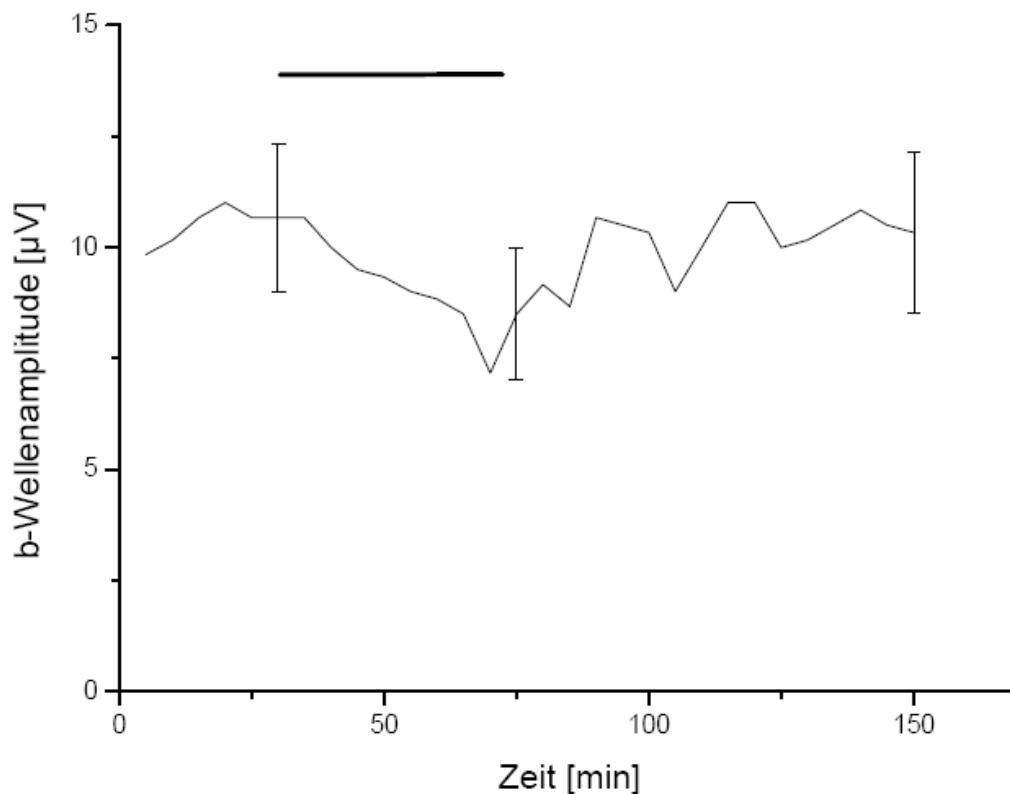


Abbildung 8: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 0,25 mg/l Bevacizumab und 20 µg/ml rt-PA. Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden. Der schwarze Querbalken über dem Graphen zeigt die Dauer der Applikation an.

4.2 Beurteilung der Wirkung von rt-PA auf die b-Welle

Der Effekt von rt-PA ohne Koapplikation von Bevacizumab in den Konzentrationen 20 µg/ml, 60 µg/ml und 200 µg/ml auf die b-Welle wurde ebenfalls untersucht. Während der Exposition mit 20 µg/ml wurde eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der b-Wellenamplitude von 20,53% beobachtet ($p=0,10$), die sich in der Auswaschphase wieder annähernd auf das Ausgangsniveau begab (siehe Abb. 9).

Abbildung 9

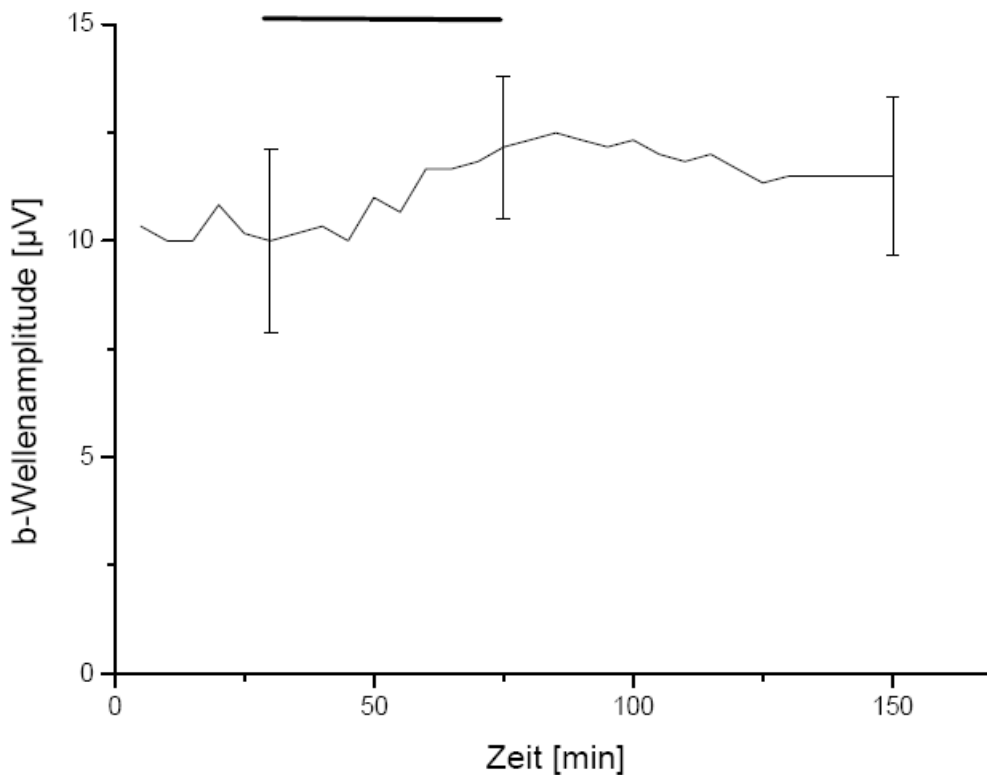


Abbildung 9: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 20 µg/ml rt-PA . Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden. Der schwarze Querbalken über dem Graphen zeigt die Dauer der Applikation an.

Bei der Applikation von 60 µg/ml wurde eine nicht signifikante Reduktion der b-Wellenamplitude von 27,9% festgestellt ($p=0,25$), die sich während der Auswaschphase nivellierte (siehe Abb. 10).

Abbildung 10

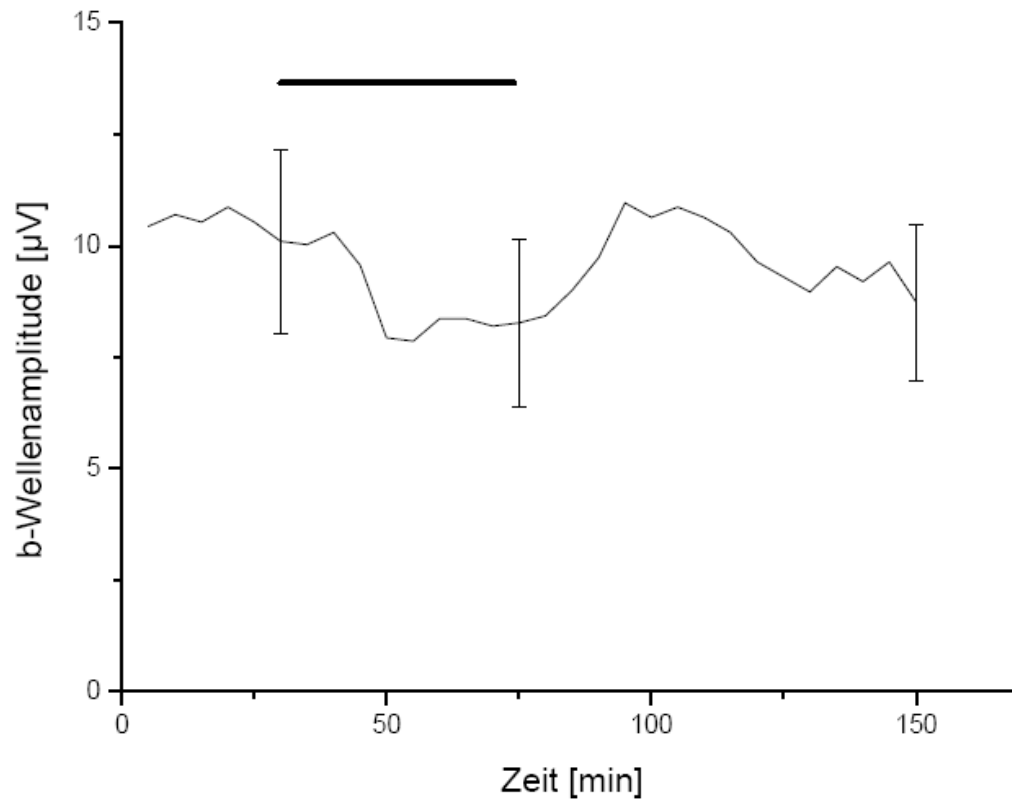


Abbildung 10: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 60 µg/ml rt-PA. Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden. Der schwarze Querbalken über dem Graphen zeigt die Dauer der Applikation an.

Bei der Exposition der Netzhaut mit 200 µg/ml rt-PA wurde eine signifikante Reduktion der b-Welle von 44,64% beobachtet ($p < 0,01$). Auch während der Auswaschphase blieb die b-Welle signifikant erniedrigt ($p < 0,01$) und erreicht damit das Ausgangsniveau nicht mehr (Abb. 11).

Abbildung 11

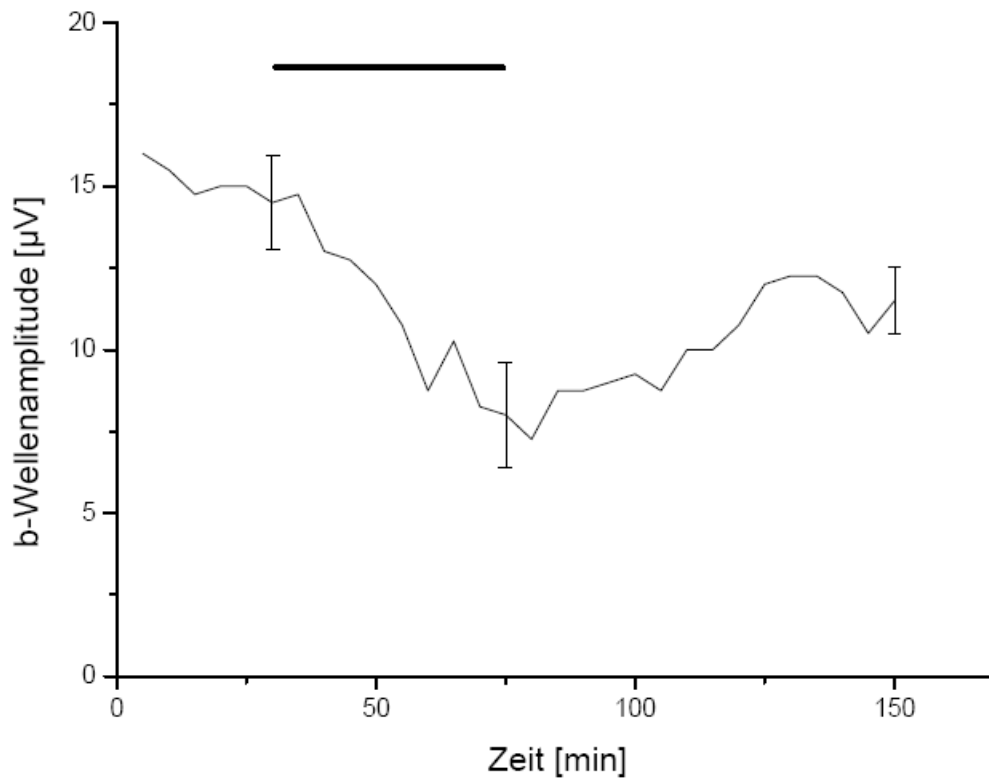


Abbildung 11: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 200 µg/ml rt-PA. Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden. Der schwarze Querbalken über dem Graphen zeigt die Dauer der Applikation an.

4.3 Beurteilung der Wirkung von Ranibizumab (Lucentis) auf die b-Welle

Während der Exposition mit 1 mg Ranibizumab trat eine nicht-signifikante ($p=0,13$) Reduktion der b-Wellenamplitude von bis zu 22,32 % auf. Bis zum Ende der Auswaschphase erreichte die b-Wellenamplitude wieder ihren Ausgangswert (Abb. 12).

Abbildung 12

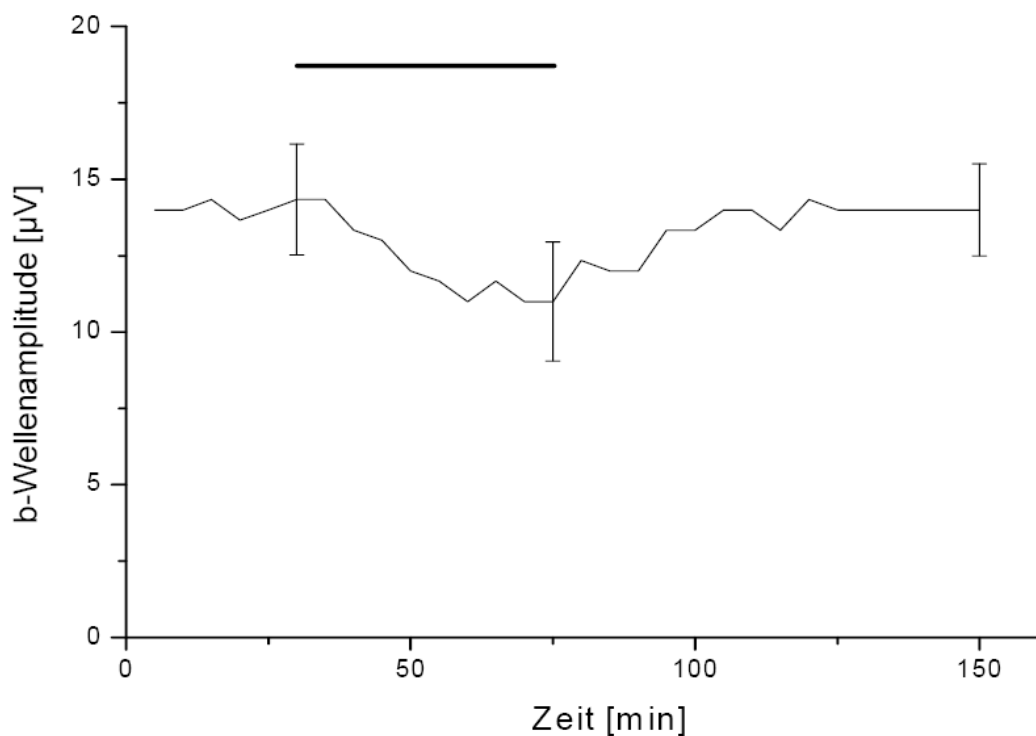


Abbildung 12: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 1 mg Ranibizumab. Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden. Der schwarze Querbalken über dem Graphen zeigt die Dauer der Applikation an.

4.4 Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon auf die b-Welle bei indirekter Applikation

Die zuerst getestete Konzentration von Triamcinolon war $36\mu\text{g/ml}$, was dem Löslichkeitsgleichgewicht und damit der maximal löslichen Konzentration in wässriger Lösung entspricht. Bei einer höheren Konzentration kommt es zum Ausfällen von Kristallen. Bei der Messung der b-Wellenamplituden konnten sowohl während der Expositionszeit als auch in der Auswaschphase keine signifikanten Veränderungen gemessen werden ($p=0,135$, $n=6$). Dies ist in Abbildung 13 dargestellt.

Abbildung 13

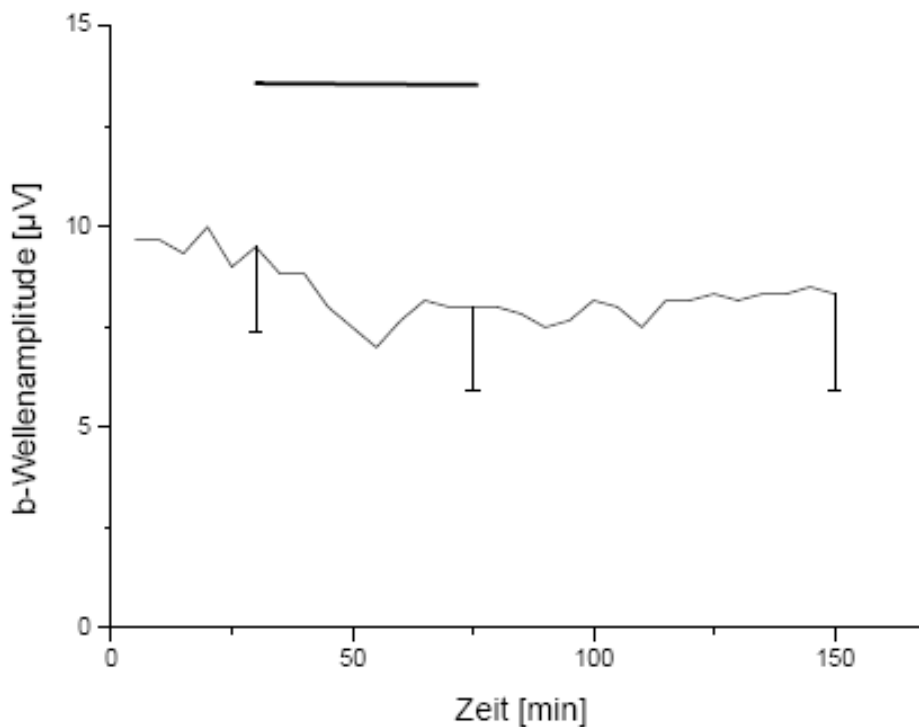


Abbildung 13: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von $36\mu\text{g/ml}$ Triamcinolon. Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden. Der schwarze Querbalken über dem Graphen zeigt die Dauer der Applikation an.

4.5 Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon bei direkter Applikation auf die b-Welle

Um den Vorgängen, die im menschlichen Auge nach direkter intravitrealer Injektion ablaufen, gerecht zu werden, wurde versucht, die Sedimentation der Triamcinolonkristalle direkt auf der Retina möglichst real nachzustellen. Dies wurde erreicht, indem das Triamcinolon mit Hilfe der Bohrkanäle in der modifizierten Perfusionskammer (siehe Abbildung 6) direkt über der Retina appliziert wurde. Daraufhin wurde das Verhalten der b-Wellenamplituden in den verschiedenen Konzentrationen 1mg/ml, 4mg/ml, 8mg/ml, 20mg/ml und 40mg/ml untersucht.

Bei den Konzentrationen von 1mg/ml und 4 mg/ml wurden kleine, nicht signifikante Reduktionen der b-Wellenamplituden gemessen, die auch wieder vollständig reversibel waren (siehe Tabelle).

Tabelle 2

TA [mg/ml]	1	4	8	20	40
Maximale Reduktion der b-Wellenamplitude in der Expositionsphase	19.8 %	17.6 %	30.2 %	56.3 %	74.9 %
	p = 0.28	p = 0.081	p = 0.043	p<0.001	P<0.001
Defizit der b-Wellenerholung in der Auswaschphase	4.78%	17.92%	-2.67%	29.76%	71.17%
	p = 0.50	p = 0.07	p = 0.07	p = 0.08	p = 0.009

4.6 Dosis-Wirkungsbeziehung von Triamcinolon bei direkter Applikation auf die b-Welle

Bei den Konzentrationen 8 mg/ml, 20 mg/ml und 40 mg/ml wurden signifikante Verminderungen der b-Welle gemessen. Diese waren dosisabhängig und sind zusammen mit den Konzentrationen 1 mg/ml 4 mg/ml und 8 mg/ml in Abb. 14 abgebildet.

Abbildung 14

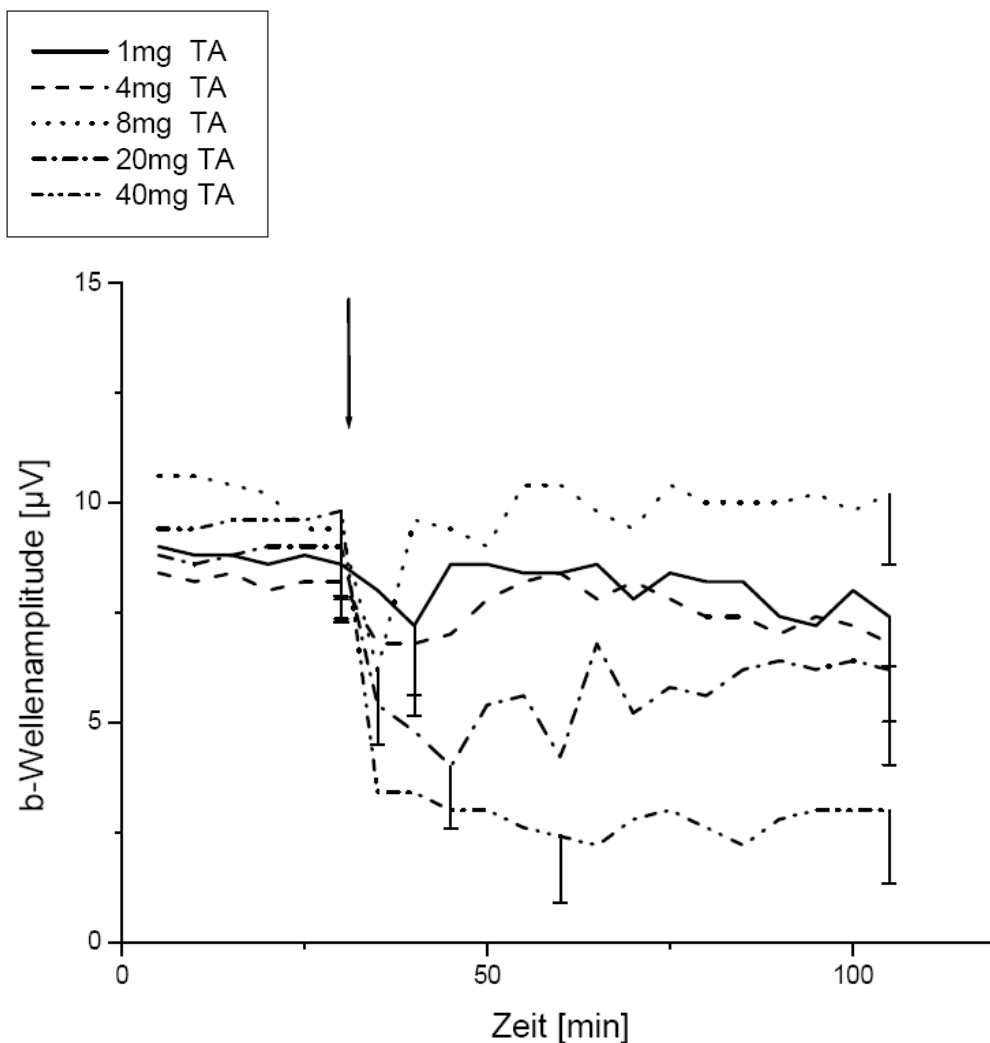


Abbildung 14: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 1 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml, 20 mg/ml und 40 mg/ml Triamcinolon. Die Unterscheidung der einzelnen Konzentrationen ist aus der Grafik zu entnehmen. Zur Wahrung der Übersicht wurde der Beginn der Expositionszeit mit einem Pfeil markiert. Da auch nach dem Ende der Auswaschphase noch Kristalle verblieben, konnte man keinen begrenzten Applikationszeitraum angeben.

Besonders deutlich zeigte sich die konzentrationsabhängige Reduktion der b-Wellenamplituden bei 20mg/ml und 40mg/ml. Wie Abbildung 15 zeigt, ist eine maximale Reduktion der b-Wellen nach ca. 15 Minuten Applikation aufgetreten, die sich bei einer Konzentration von 40mg/ml Triamcinolon nicht mehr erholte. Eine Reduktion der b-Welle von 50% trat bei einer berechneten Konzentration von 14,1 mg/ml auf (Abb. 15).

Abbildung 15

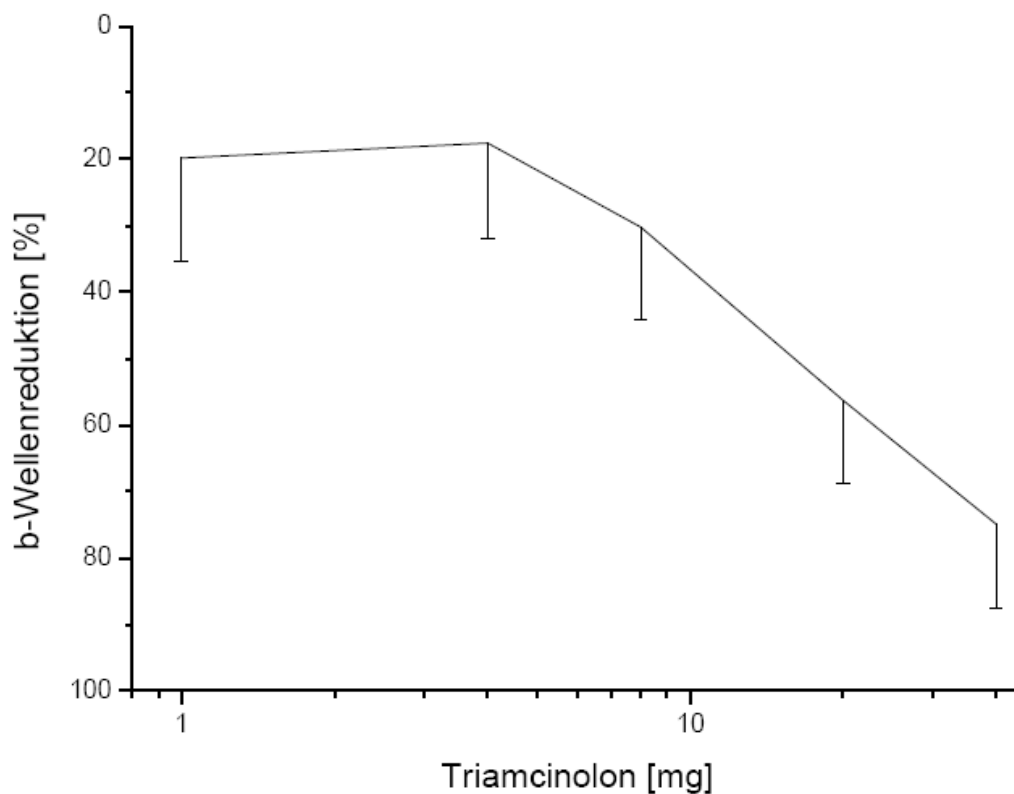


Abbildung 15: Dosis-Wirkungsbeziehung. Dargestellt ist die dosisabhängige Reduktion der b-Wellenamplituden bei Applikation von Triamcinolon. Reduktion von 50 % bei einer berechneten Konzentration von 14,1 mg/ml.

4.7 Beurteilung der Wirkung von Avastin/rt-PA auf die a-Welle

Zur Untersuchung der Wirkung der kombinierten Injektion aus 0,25mg/ml Bevacizumab und 20 µg/ml rt-PA auf die a-Wellenamplitude, wurde Aspartat zur Unterdrückung der b-Welle eingesetzt. Dies ist bereits ein etabliertes Verfahren(Hanawa I und Tateishi T 1311-12). Nach Zugabe von 1mM Aspartat

zur Nährlösung konnte eine Reduktion der b-Welle beobachtet werden, bis schließlich die P III Komponente als Ausdruck der Photorezeptoren zu messen war. Bei unveränderter Expositionszeit von 45 Minuten, wurde die Auswaschphase auf 60 Minuten begrenzt. Während der Exposition mit 0,25mg/ml Bevacizumab und 20 µg/ml rt-PA konnte eine signifikante ($p=0,02$) Reduktion der a-Wellenamplituden von 17,02% gemessen werden (Abb. 16), die sich jedoch während der Auswaschphase wieder vollständig zurückbildete ($p=0,07$).

Abbildung 16

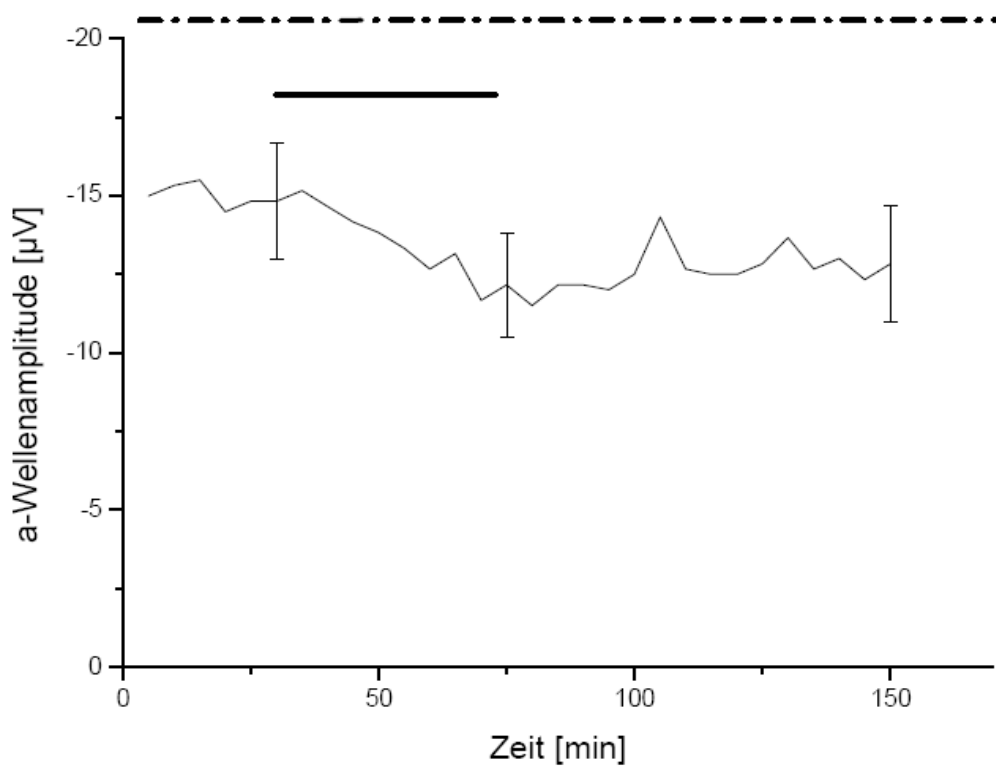


Abbildung 16: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 0,25 mg/ml Bevacizumab und 20 µg/ml rt-PA. Die gestrichelt, gepunktete Linie zeigt die Applikation von 1 mM Aspartat zur Unterdrückung der b-Welle an. Der durchgängige Querbalken zeigt die Applikation von Bevacizumab und rt-PA an. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden

4.8 Ergebnisse der Versuche zur Beurteilung der Wirkung von rt-PA auf die a-Welle

Analog zu den b-Wellenversuchen wurden für die a-Wellenamplituden ebenfalls die Konzentrationen von 20 µg/ml, 60 µg/ml und 200 µg/ml rt-PA auf das ERG gemessen. Bei einer Konzentration von 20 µg/ml (Abb. 17) zeigte sich während der Applikationsphase eine nicht-signifikante Reduktion der a-Welle ($p=0,20$), die sich während der Auswaschphase wieder normalisierte ($p=0,18$).

Abbildung 17

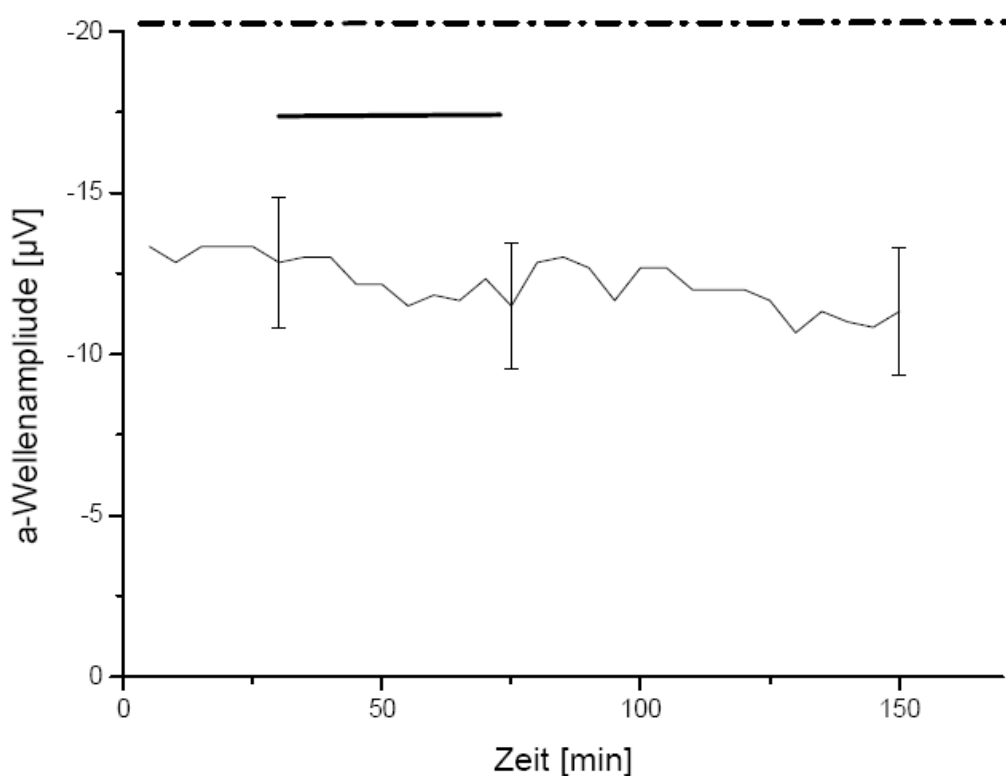


Abbildung 17: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 20 µg/ml rt-PA. Die gestrichelt, gepunktete Linie zeigt die Applikation von 1 mM Aspartat zur Unterdrückung der b-Welle an. Der durchgängige Querbalken zeigt die Applikation von rt-PA an. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden

In der Expositionsphase mit 60 µg/ml rt-PA (Abb. 18) wurde allerdings eine signifikante Reduktion der a-Wellenamplitude von 18,2% gemessen ($p < 0,01$), die sich jedoch am Ende der Auswaschphase wieder normalisierte ($p = 0,23$).

Abbildung 18

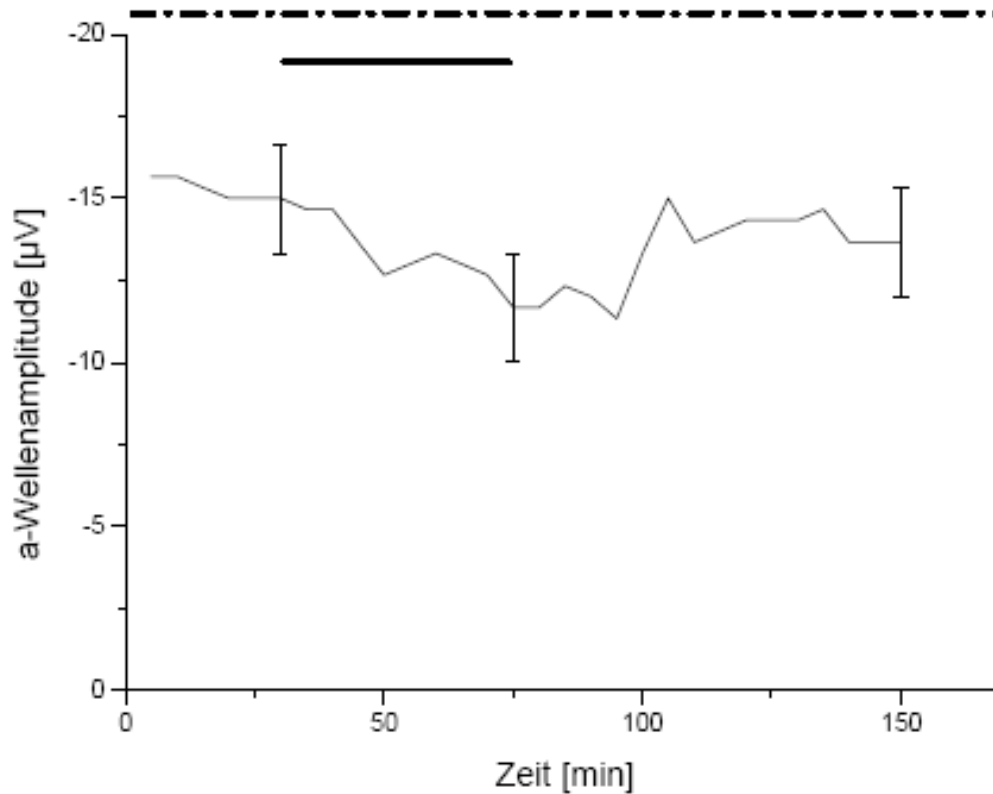


Abbildung 18: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 60 µg/ml rt-PA. Die gestrichelt, gepunktete Linie zeigt die Applikation von 1 mM Aspartat zur Unterdrückung der b-Welle an. Der durchgängige Querbalken zeigt die Applikation von rt-PA an. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden.

Bei der höchsten Konzentration 200 µg/ml (Abb.19) zeigte sich in der Applikationsphase eine Reduktion der a-Wellenamplitude von 36,6% ($p < 0,01$). Auch am Ende der Auswaschphase erreichten die Werte nicht mehr das Ausgangsniveau ($p = 0,01$).

Abbildung 19

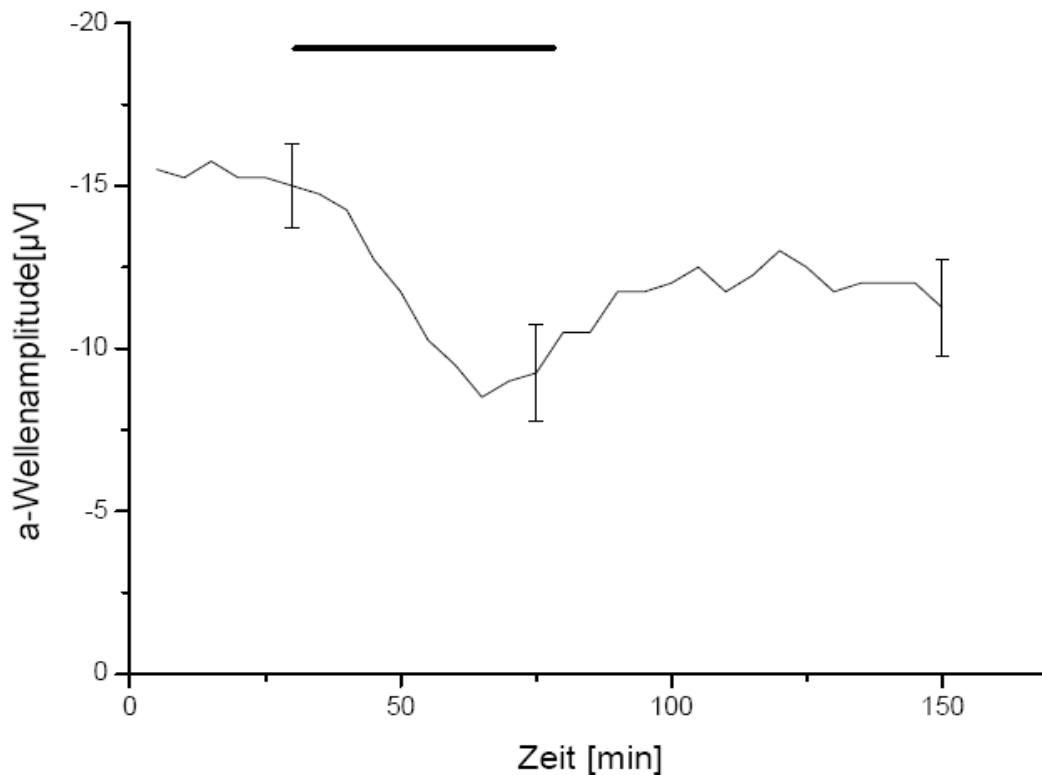


Abbildung 19: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 200 µg/ml rt-PA. Die gestrichelt, gepunktete Linie zeigt die Applikation von 1 mM Aspartat zur Unterdrückung der b-Welle an. Der durchgängige Querbalken zeigt die Applikation von rt-PA an. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden.

4.9 Beurteilung der Wirkung von Ranibizumab (Lucentis) auf die a-Welle

Bei der Testung des Effektes von 1 mg Ranibizumab (Lucentis) wurde verfahren wie unter 4.8 beschrieben. Es zeigte sich eine maximale Reduktion der a-Wellenamplitude von 4%, die jedoch keine statistische Signifikanz zeigte ($p=0,18$) und sich bis zum Ende der Auswaschphase wieder vollständig regenerierte (Abb. 20).

Abbildung 20

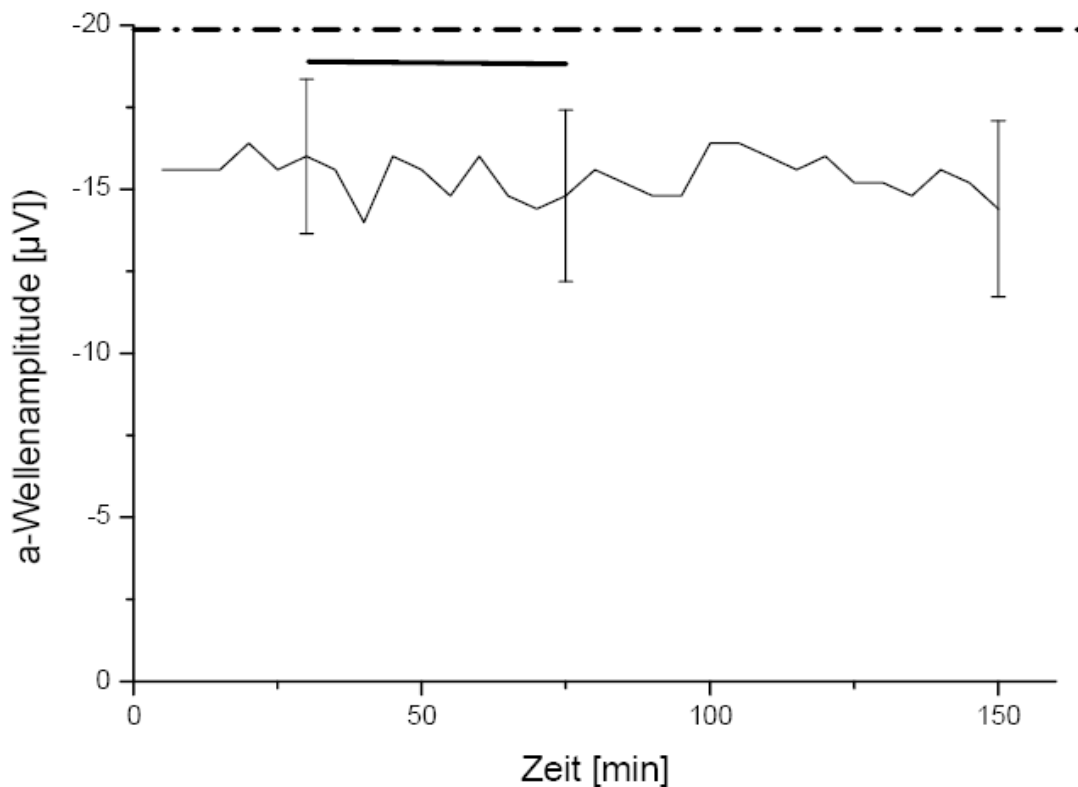


Abbildung 20: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 1 mg/ml Ranibizumab. Die gestrichelt, gepunktete Linie zeigt die Applikation von 1 mM Aspartat zur Unterdrückung der b-Welle an. Der durchgängige Querbalken zeigt die Applikation von Ranibizumab an. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden.

4.10 Beurteilung der Wirkung von Triamcinolon auf die a-Welle

Um besser differenzieren zu können, ob sich der Effekt des Triamcinolons auf das höhere neuronale Netzwerk der Netzhaut oder direkt auf die Photorezeptoren beschränkt, wurde, wie in den vorigen Versuchen bereits erwähnt, wieder 1 mM Aspartat verwendet, um die b-Welle zu unterdrücken. So

konnte man den Effekt von Triamcinolon auf das Photorezeptorpotential P III beobachten.

4.11 Ergebnisse der Versuche zur Beurteilung der Wirkung von gelöstem Triamcinolon auf die a-Welle

Wie die b-Wellenamplituden, so blieben auch die a-Wellenamplituden, stellvertretend für die Photorezeptoren, bei einer Konzentration von 36 µg/ml konstant. Es zeigte sich während der Testung der maximal löslichen Konzentration von Triamcinolon (Abb. 21) während der Expositions- und Auswaschphase keine signifikante Reduktion ($p=0,889$, $n=3$).

Abbildung 21

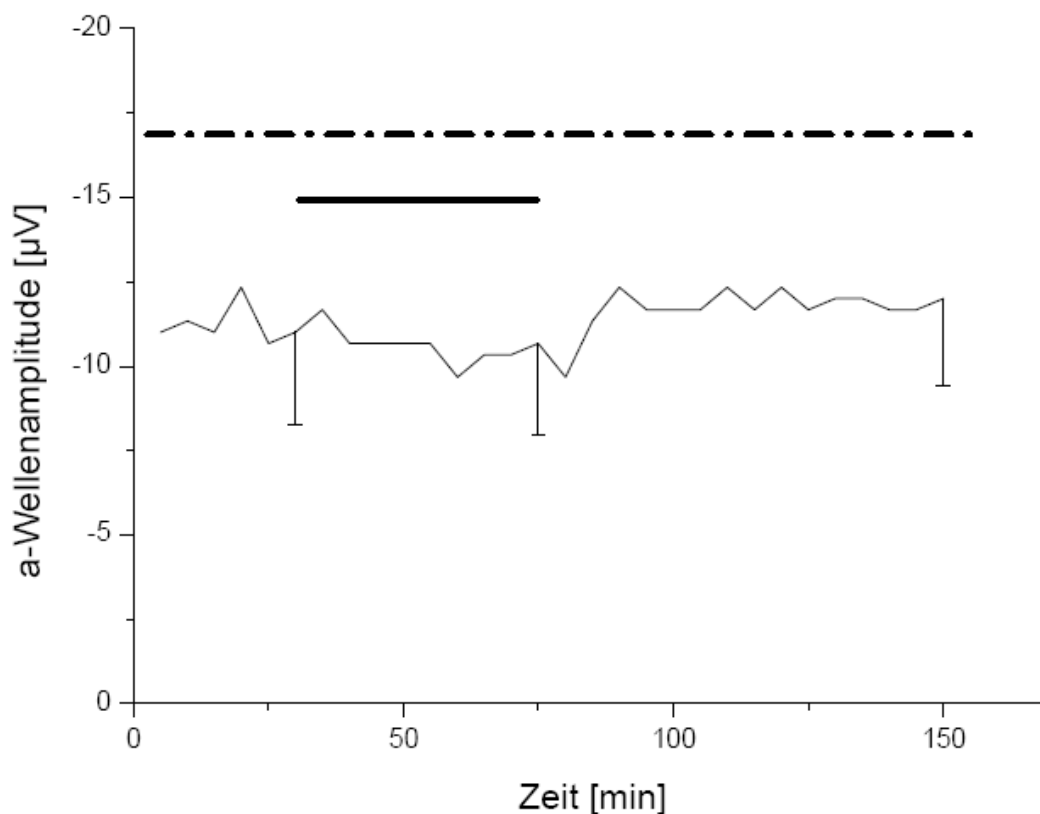


Abbildung 21: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 36µg/ml Triamcinolon. Die gestrichelt, gepunktete Linie zeigt die Applikation von 1 mM Aspartat zur Unterdrückung der b-Welle an. Der durchgängige Querbalken zeigt die Applikation von Triamcinolon an. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden.

4.12 Die Dosis-Wirkungsbeziehung von kristallinem Triamcinolon bei direkter Applikation auf die a-Welle

Bei der direkten Applikation von 1mg/ml Triamcinolon zeigte sich sowohl in der Applikations- als auch in der Auswaschphase keine signifikante Reduktion der a-Wellenamplitude. Bei den höheren Konzentrationen ließ sich eine konzentrationsabhängige, signifikante Reduktion der a-Wellenamplitude feststellen. Dies ist in der Synopsis (Abb. 22) dargestellt.

Abbildung 22

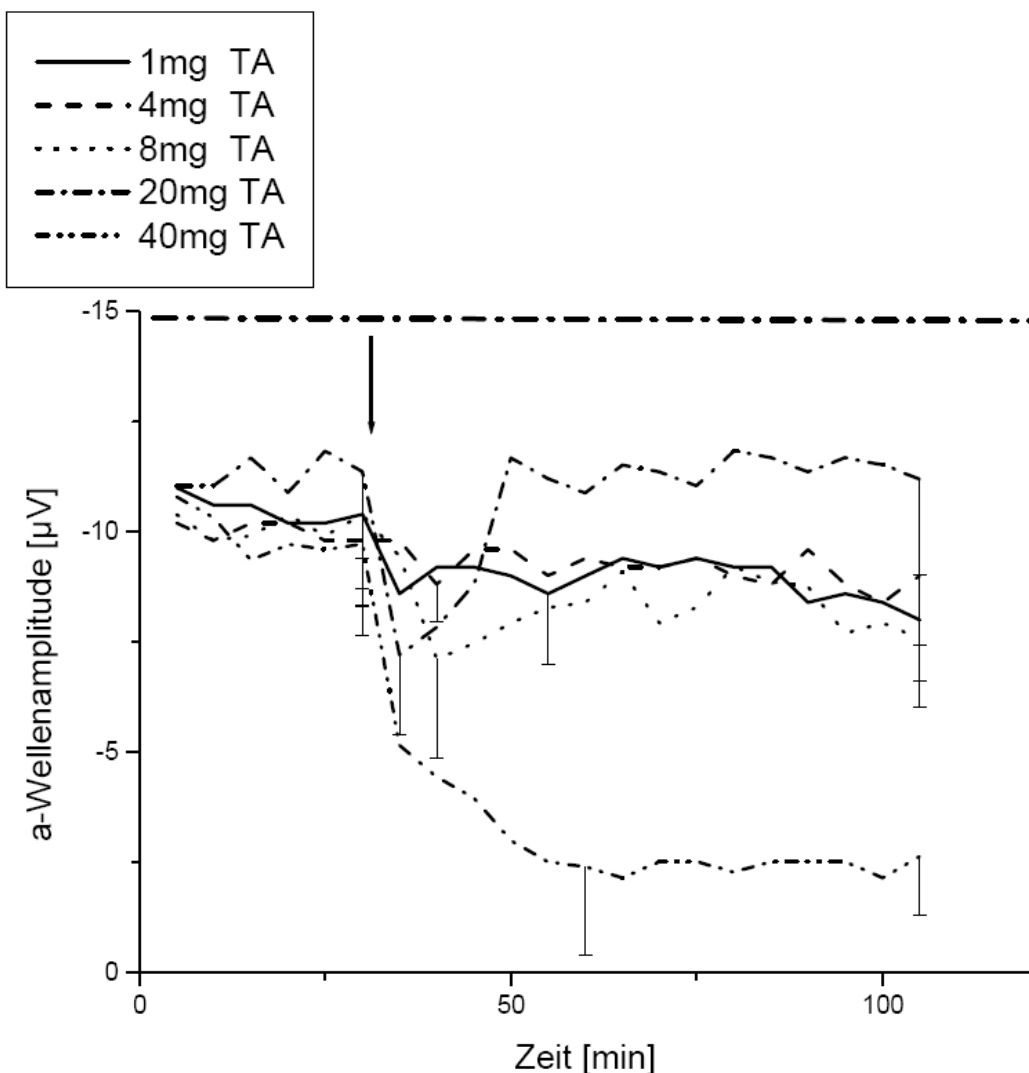


Abbildung 22: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 1 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml, 20 mg/ml und 40 mg/ml Triamcinolon. Die Unterscheidung der einzelnen Konzentrationen ist aus der Grafik zu entnehmen. Zur Wahrung der Übersicht wurde der Beginn der Expositionszeit mit einem Pfeil markiert. Da auch nach dem Ende der Auswaschphase noch Kristalle verblieben, konnte man keinen begrenzten Applikationszeitraum angeben.

Die Reduktionen der a-Wellenamplituden und die dazugehörigen p-Werte sind in Tabelle 3 gegenübergestellt. Bei berechneten 20,5 mg/ml zeigte sich eine Reduktion der a-Welle um 50% (siehe Abbildung 23).

Tabelle 3

TA [mg/ml]	1	4	8	20	40
Maximale Reduktion der a-Wellenamplitude in der Expositionsphase	0	19.24 %	31.46 %	36.6 %	77.7 %
		p = 0.003	p = 0.01	p = 0.02	P<0.001
Erholungsdefizit der a-Welle in der Auswaschphase	19.56%	8.04%	32.54%	0.17 %	72.84%
	p = 0.16	p = 0.18	p = 0.07	p = 0.37	p = 0.001

Abbildung 23

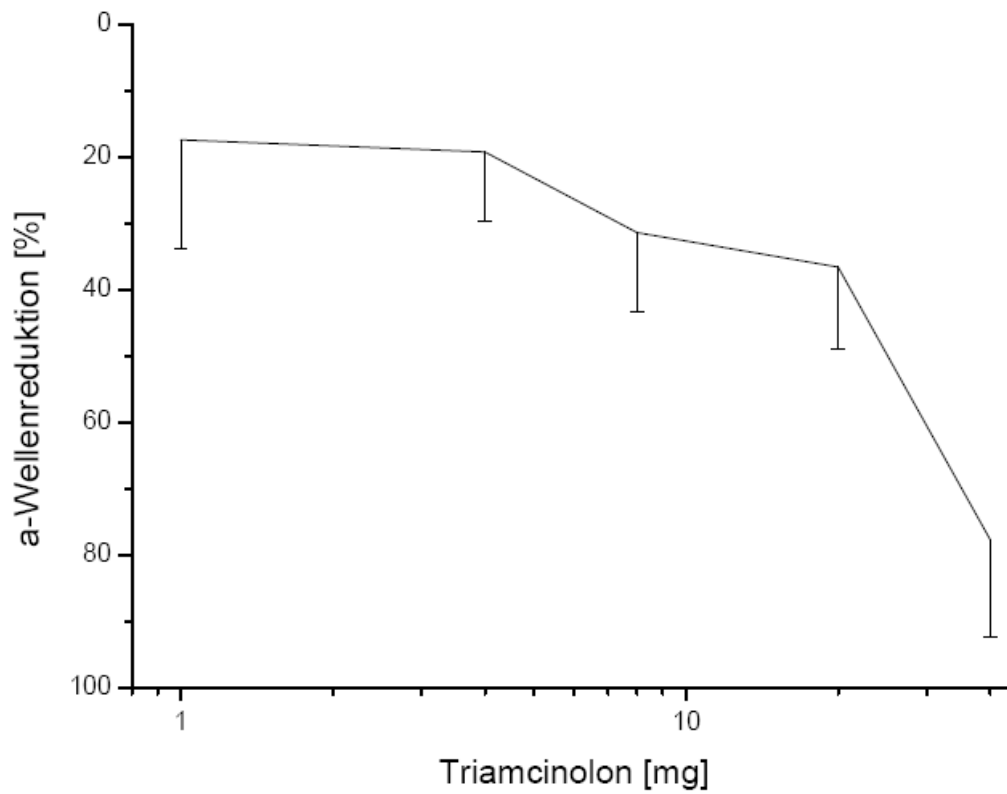


Abbildung 23: Dosis-Wirkungsbeziehung. Dargestellt ist die dosisabhängige Reduktion der a-Wellenamplituden bei Applikation von Triamcinolon. Reduktion von 50 % bei einer berechneten Konzentration von 20,5 mg/ml.

4.13 Beurteilung der Wirkung der Trägerflüssigkeiten von rt-PA und von Ranibizumab (Lucentis) auf die b- und a-Welle

Zur Untersuchung der Trägerflüssigkeit von rt-PA wurde diese in derselben Konzentration wie bei 20 µg/ml Applikation rt-PA zur Nährlösung dazugegeben und als Kontrolle gemessen (Abb. 24). Es wurde sowohl während der Expositionsphase ($p=0,16$) als auch während der Auswaschphase ($p=0,4$) keine signifikanten Effekte auf die b-Welle festgestellt.

Abbildung 24

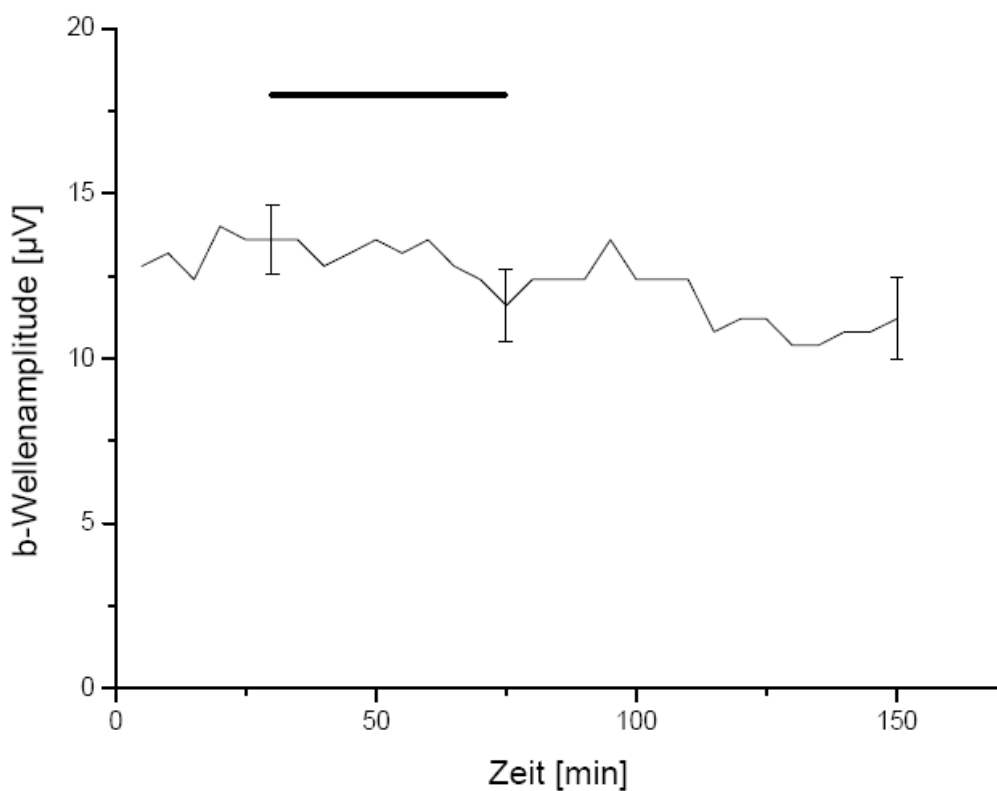


Abbildung 24: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation der Trägerflüssigkeit von rt-PA. Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden. Der schwarze Querbalken über dem Graphen zeigt die Dauer der Applikation an.

Für die a-Wellen konnte bei der Testung der Trägersubstanz (Abb. 25) des rt-PA sowohl während der Expositionsphase ($p=0,74$) als auch während der Auswaschphase keine signifikante Veränderung der Amplitude festgestellt werden.

Abbildung 25

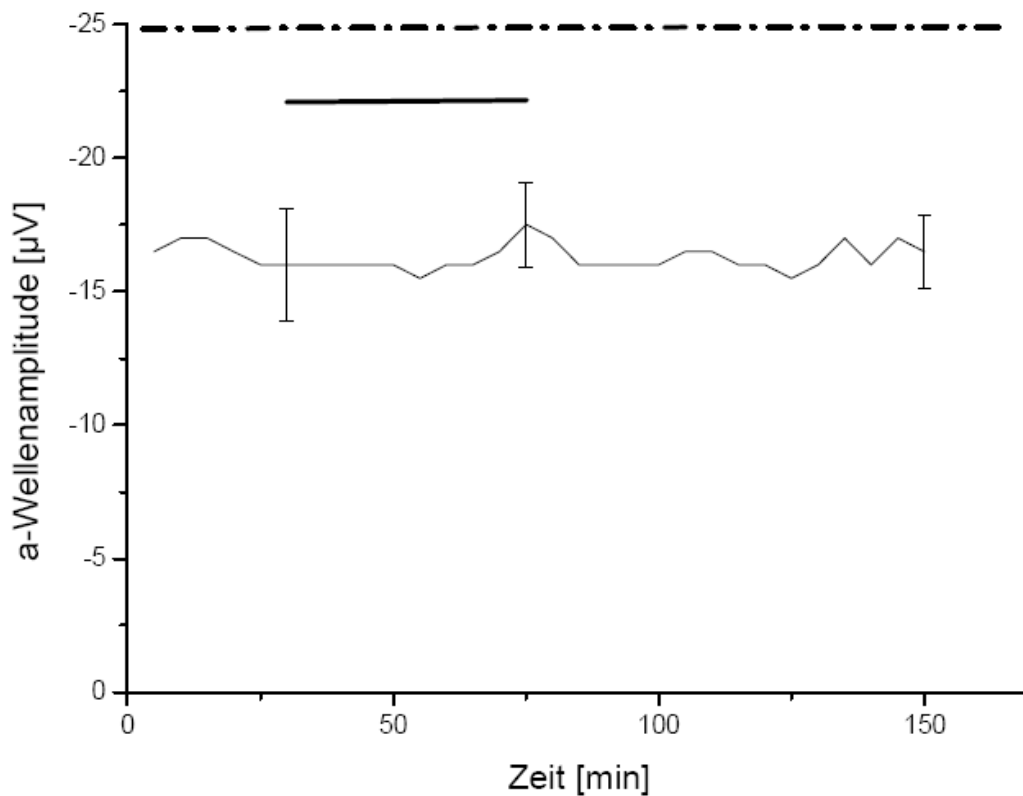


Abbildung 25: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation der Trägerflüssigkeit von rt-PA. Die gestrichelt, gepunktete Linie zeigt die Applikation von 1 mM Aspartat zur Unterdrückung der b-Welle an. Der durchgängige Querbalken zeigt die Applikation der Trägerflüssigkeit von rt-PA an. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden.

Zur Untersuchung der Trägersubstanz des Ranibizumab (Lucentis) wurde diese in derselben Konzentration wie bei der Applikation von 1 mg Ranibizumab getestet (Abb. 26). Dabei wurde eine Reduktion der b-Welle von 2,9% Prozent beobachtet, die jedoch nicht signifikant war ($p=0,979$).

Abbildung 26

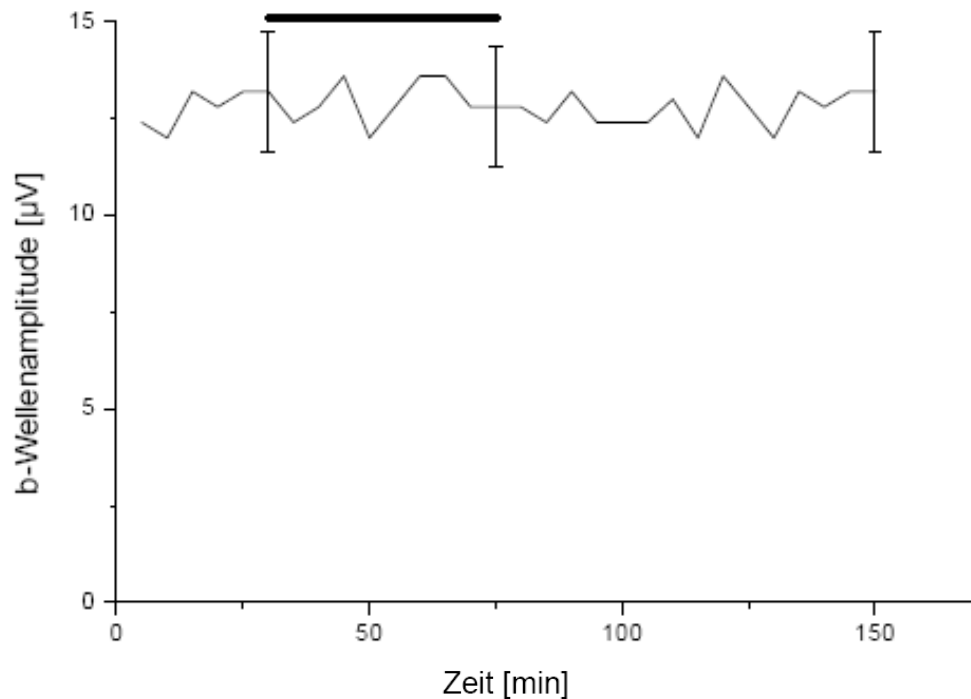


Abbildung 26: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation der Trägerflüssigkeit von Ranibizumab. Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden. Der schwarze Querbalken über dem Graphen zeigt die Dauer der Applikation an.

Des Weiteren wurde der Effekt der Trägersubstanz des Ranibizumab (Lucentis) auf das Photorezeptorpotential PIII getestet. Es kam zu einer maximale Reduktion der a-Welle von 8%, die jedoch, wie Abbildung 28 zeigt, keine statistische Signifikanz erreichte ($p=0,30$).

Abbildung 27

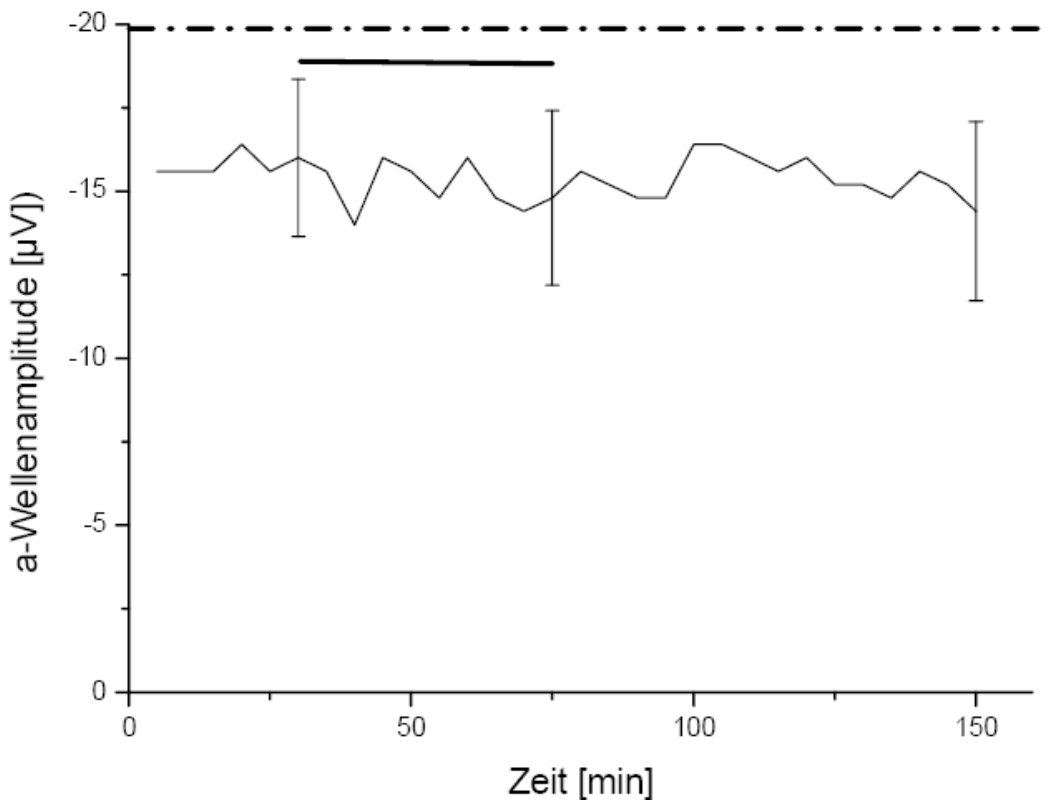


Abbildung 27 : Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation der Trägerflüssigkeit von Ranibizumab. Die gestrichelt, gepunktete Linie zeigt die Applikation von 1 mM Aspartat zur Unterdrückung der b-Welle an. Der durchgängige Querbalken zeigt die Applikation der Trägerflüssigkeit von Ranibizumab an. Jeweils nach 30 Minuten, nach 75 Minuten und am Ende der Auswaschphase ist die Standardabweichung eingefügt worden.

4.14 Negativprobe für Bevacizumab

Als weiteren Kontrollversuch, bzw. Negativprobe für das Bevacizumab wurden bovine anti-IgG Antikörper vom Schaf in Kombination mit rt-PA, verwendet. Damit sollte gezeigt werden, daß eventuell gemessene Effekte auf die b-Welle vom Bevacizumab herrühren und nicht ein Effekt der Antikörpereigenschaften per se sind. Es sollte also untersucht werden, wie sich ein Antikörper, der gegen bovine Antigene gerichtet ist, auswirken würde. Hier ließen sich sowohl in der Expositions- als auch in der Auswaschphase keine Veränderung der b-Wellenamplitude feststellen (Abb. 29).

Abbildung 28

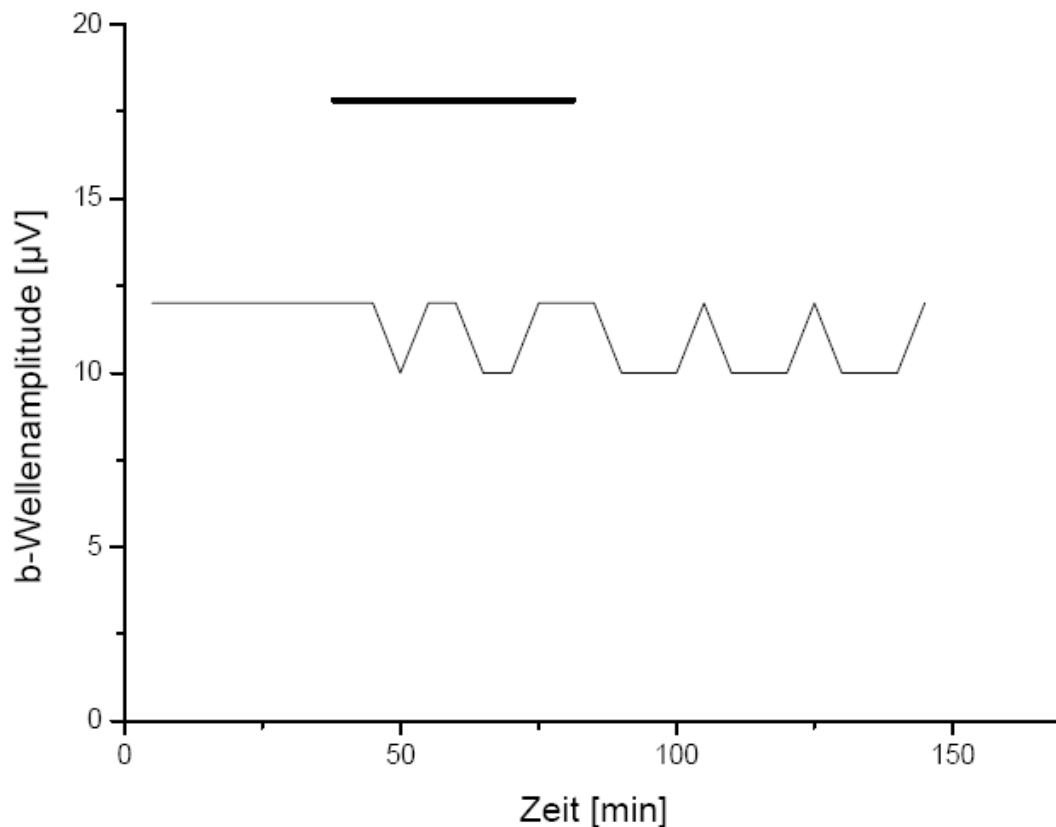


Abbildung 28: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation einer Negativprobe gegen Bevacizumab. Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit. Der schwarze Querbalken über dem Graphen zeigt die Dauer der Applikation an. Hier sind keine Standardabweichungen angegeben, da $n=1$ war.

4.15 Darstellung der histologischen Ergebnisse zur dosisabhängigen Kristallablagerung von Triamcinolon bei direkter Applikation

Nach Entnahme und Fixation der Retinae wurden die Kristallsedimentierungen ohne Färbung lichtmikroskopisch dargestellt. Obwohl durch die Perfusion der Kammer vermutlich Kristalle abtransportiert wurden, ist eine dosisabhängige Ablagerung der Kristalle deutlich zu sehen (Abb. 30).

Abbildung 29

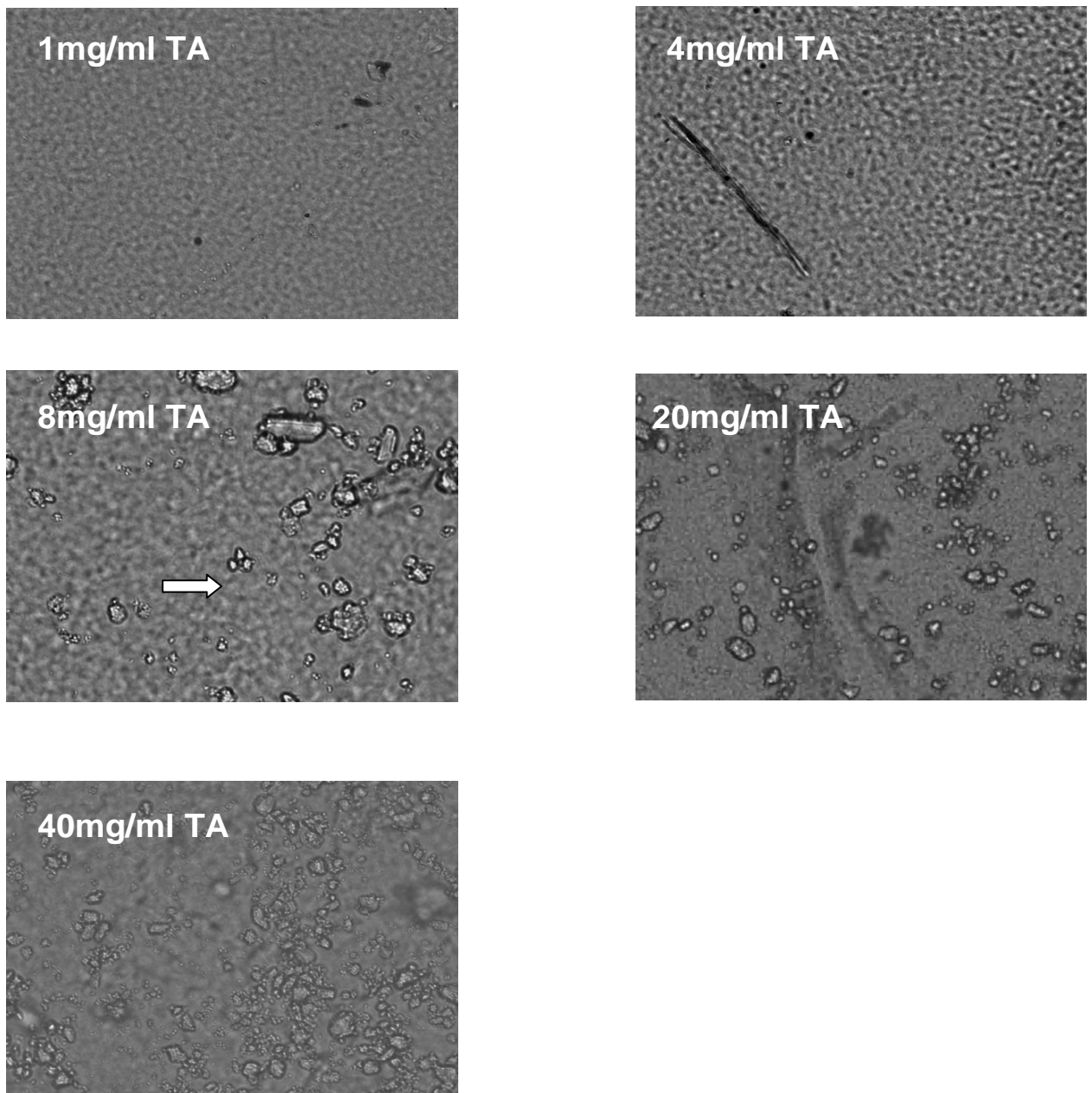


Abbildung 29: Es sind die Kristallsedimentierungen abgebildet. Der Pfeil markiert beispielhaft ein Sediment.

4.16 Darstellung der histologischen Ergebnisse zur Untersuchung von abgestorbenen retinalen Ganglienzellen bei direkter Applikation von Triamcinolon

Durch die fluoreszenzmikroskopischen Live/Dead[®] Viability/Cytotoxicity Färbungen wurden die toten retinalen Ganglienzellen angefärbt und ausgezählt. Bei Konzentrationen von 1mg/ml, 4mg/ml und 8 mg/ml konnten nur vereinzelt apoptotische Zellen beobachtet werden. Bei 20mg/ml konnten allerdings schon 60,53% tote Zellen und bei 40mg/ml 82,35% ausgezählt werden (siehe Tabelle). In Abbildung 31 ist für die verschiedenen Konzentrationen jeweils ein repräsentativer Abschnitt dargestellt.

Tabelle 4

Triamcinolon-Konzentration in mg/ml	Anteil der abgestorbenen Zellen am Ende der Auswaschphase in %	Oberes und unteres Konfidenzintervall in %	p-Wert
0	19,86	15,8-25,1	
1	15,65	10,1-21,1	p=0,138
4	14,28	8,98-10,7	p=0,108
8	19,99	15,3-25,9	p=0,523
20	60,53	48,4-72,7	p= 0,013
40	82,35	64,5-89,2	p=0,002

Abbildung 30

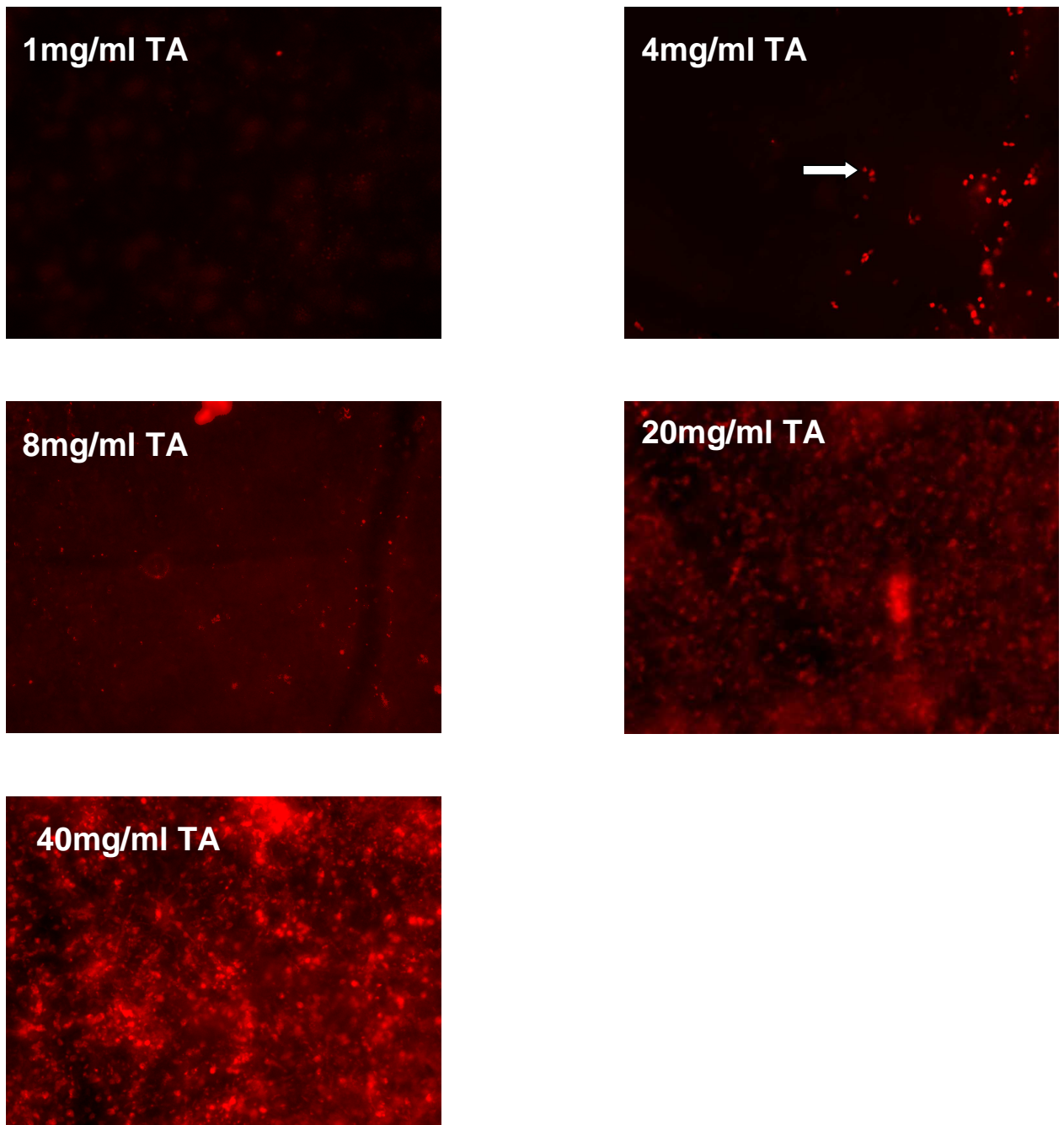


Abbildung 30: Es sind die toten Ganglienzellen dargestellt. Die rote Fluoreszenz markiert die abgestorbenen Zellen. Mit dem Pfeil ist beispielhaft eine abgestorbene Ganglienzelle markiert.

5. Diskussion

5.1 Zur Methodik

Alle in dieser Arbeit behandelten Pharmaka sind zur intravitrealen Injektion vorgesehen. Bei der Untersuchung der Nebenwirkungen eines Pharmakons spielen zwei Gesichtspunkte eine wichtige Rolle: Die durch die Applikationsform entstehenden Komplikationen und das eigentliche Nebenwirkungs- bzw. Toxizitätsprofil des jeweiligen Pharmakons. Die durch die Injektion entstehenden Risiken z.B. einer Endophthalmitis bei Bevacizumab oder Ranibizumab sind hinreichend beschrieben worden (Freeman WR 853-58), allerdings fehlte die Betrachtung der Toxizität auf die Netzhaut durch den direkten Kontakt. Auch das Verhalten der Trägersubstanzen ist in diesem Zusammenhang ein wichtiger Aspekt.

Um bei allen Medikamenten die Toxizität auf die neurosensorische Netzhaut, die bei der intravitrealen Injektion als Gefahr besteht, zu untersuchen, musste man ein Modell finden, das es einem ermöglicht genaue Aussagen über den Funktionszustand der Retina zu treffen und dabei das Ausmaß an äußeren Einflüssen so gering wie möglich zu halten. Das elektrophysiologische Modell der isolierten und umströmten Netzhaut von Sickel (Sickel W 115-24) entspricht diesen Kriterien. Es wurde zwar an Froschnetzhäuten entwickelt, ließ sich aber auch an höheren Vertebraten verwenden (Haschke W 162-67; Sickel W 667-727) und hat sich seit einiger Zeit als bewährtes Instrument pharmakologischer Testungen bewährt (Lüke M 27-36). Zudem zeigten vorherige Studien starke Ähnlichkeiten der Medikamenten-induzierten ERG Veränderungen bei dem Vergleich boviner und humaner Netzhäute. Weiterhin gilt das ERG als objektivierbares Messinstrument der reizverarbeitenden einzelnen Netzhautschichten und erlaubt direkte Rückschlüsse auf die Photorezeptoren und das höhere neuronale Netzwerk (Holmgren F 278-86; Hood DC 107-26). Veränderungen in den Reizantworten können somit auch direkt mit der getesteten Substanz und der jeweiligen Wirkung auf Photorezeptoren oder höheres neuronales Netzwerk in Verbindung gebracht werden. Die zeitliche Korrelation zwischen Applikation der zu testenden Substanzen und Veränderungen der abgeleiteten ERGs in den verschiedenen Konzentrationen

belegen dies. Ebenso die Tatsache, dass nach Entfernung der zu testenden Substanz eine Erholung der Reizantworten auf Ausgangsniveau stattfand, sprechen für die Tatsache, dass die Veränderungen der Reizantworten allein auf die getestete Substanz zurückzuführen waren.

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen konnten in überprüfbarer Konzentration der Nährlösung beigemischt werden, die in-vivo vorkommenden Konzentrationsschwankungen aufgrund der Pharmakokinetik konnten mit diesem Versuchsaufbau ausgeschlossen werden. Der Vorteil dieser Methodik gegenüber in-vivo Ableitungen am Tiermodell ist, dass der diluierende Effekt des Glaskörpers wegfällt. Dadurch kann man präzisere Aussagen über den alleinigen Effekt auf die neurosensorische Netzhaut treffen. Selbst wenn man sagen würde, dass durch den Wegfall des Glaskörpers eine gewisse Differenz zwischen Versuch und Wirklichkeit bestünde, so muss man hinzufügen, dass es erstens viele vitrektomierte Patienten gibt und zweitens eine Toxizität bei einer Person mit Glaskörper eher geringer ausfallen würde. Der nach Vitrektomie entstehende intraokuläre Raum wird zwar mit Kammerwasser wieder aufgefüllt, dieses besitzt aber nicht dieselben Dichteigenschaften wie der Glaskörper. Somit gefährdet eine eventuelle Aussage über die Sicherheit eines hier getesteten Pharmakons keine Patienten.

Wie aus Material und Methoden zu entnehmen ist, bedarf es in dem hier verwendeten Modell der umströmten Vertebratennetzhaut keiner Zusätze von Substanzen, die mit den getesteten Medikamenten interferieren könnten. Die Zusammensetzung der Perfusionslösung nach Sickel entspricht empirisch ermittelten Konzentrationen, die die konstantesten ERG Antworten über den längsten Zeitraum erbrachten (Lüke M 27-36). Durch die geringen Konzentrationen der getesteten Pharmaka wurden zu keiner Zeit signifikante Veränderungen z.B. der Ionenkonzentration der Perfusionslösung verursacht. Dadurch konnten hierdurch entstehende Effekte vermieden werden und es war möglich, die Wirkung der Substanzen und Trägersubstanzen klar voneinander zu trennen.

Da man nicht ausschließen konnte, dass vielleicht die Trägersubstanzen der Wirkstoffe ebenfalls einen Effekt auf die Reizantwort der isolierten bovinen

Retina haben konnten, war es sinnvoll, die Trägersubstanzen zusätzlich alleinig zu testen. Für alle zu testenden Substanzen zeigte sich keine signifikante Verminderung weder der a- noch der b-Welle (siehe 4.13), auch in verlängerten Versuchszeiten nicht, so dass eine mögliche Ergebnisverzerrung durch toxische Effekte der Trägersubstanzen sicher ausgeschlossen werden konnte. Nachgewiesene toxische Bestandteile der Trägersubstanzen, wie z.B. der Benzylalkohol beim Triamcinolon, wurden im Vorhinein bereits durch Aufreinigung fast vollständig entfernt (Hernandez-Ortega MC 350-51; Lang 778-88).

Nach Minimierung der möglichen Einflussgrößen, die nicht unmittelbar mit dem zu testenden Pharmakon in Verbindung gebracht werden konnten, konnte man mit Sicherheit postulieren, dass eventuelle Effekte, die beobachtet wurden, auf die getestete Substanz zurückzuführen sind. (Walter P 87-92). Damit stellt die isolierte, perfundierte, bovine Retina ein sehr sensibles Messinstrument zur Untersuchung retinaler Toxizität in-vitro dar, dessen Resultate als auf die menschliche Netzhaut übertragbar angenommen werden können. Dennoch muss bedacht werden, dass eine Organkultur die in-vivo Situation nicht vollständig abbildet. Die Ergebnisse sollten deshalb nur als richtungsweisend betrachtet und als Grundlage für weitere klinische Testungen verwendet werden.

5.2 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Wirkung von Avastin/rt-PA auf das Elektroretinogramm

Wie in der Einleitung unter 1.3.3.3 schon erwähnt, schädigt eine subretinale Blutung die Netzhaut sehr stark, zum einen durch die Unterbindung der Nährstoffversorgung im Bereich der Blutung und zum anderen durch den eigentlichen toxischen Effekt des Blutes und seiner Abbauprodukte. Ein Einsatz von rt-PA mit seiner lysierenden Funktion kann die toxische Wirkung der Blutung mindern. Da die Visusprognose bei einer subretinalen Blutung auf dem Boden einer feuchten AMD sehr schlecht ist, wurde erwägt, eine Kombination mit einer neovaskularisationshemmenden Therapie zu unternehmen. Die Neovaskularisation stellt, wie in der Einleitung schon dargestellt, eine Gefahr für

den Visus der Patienten dar und würde durch die Unterversorgung der Netzhaut bei einer subretinalen Blutung unterstützt werden. Dies würde zusätzlich zum geänderten Stoffwechsel in der geschädigten Netzhaut und zu einer weiteren Förderung der Neovaskularisation durch vermehrte Induktion der VEGF Expression führen. Daher ist eine Applikation mit Bevacizumab als Behandlung der Grundkrankheit prinzipiell sinnvoll, da die Effektivität allein schon in mehreren klinischen, allerdings unkontrollierten klinischen Studien gezeigt wurde (Michels S 1035-47; Rosenfeld PJ 1419-31; Manzano RP et 257-61). Es wurde gezeigt, dass Bevacizumab bei der feuchten AMD und Makulaödem in einer Konzentration von 1,25 mg bei intravitrealer Injektion eine effektive Behandlungsoption darstellt. Bei einem Glaskörpervolumen von ungefähr 5 ml wurde also bei einer angenommenen gleichmäßigen Verteilung eine Konzentration von 0,25 mg/ml angenommen. Bei der Wahl der Konzentration des rt-PA spielten die Beobachtungen von Johnson et al. eine Rolle, die toxische Effekte ab einer Konzentration von 50 µg/ml zeigten (Johnson MW 259-63). Daher wurden die Konzentrationen 20 µg/ml, 60 µg/ml und 200 µg/ml von rt-PA getestet. Für die Versuche in dieser Arbeit wurde bei der Kombination beider Wirkstoffe eine Konzentration von 20 µg/ml rt-PA zusammen mit 0,25 mg/ml Bevacizumab verwendet, da eine Konzentration von mehr als 20 µg im Vorfeld schon toxische Effekte gezeigt hatte (Michels S 1035-47; Rosenfeld PJ 1419-31; Manzano RP 257-61). Es galt, eine eventuelle Toxizität auf die neurosensorische Netzhaut auszuschließen. Dies wurde durch die durchgeführten Versuche bestätigt, die zeigten, dass selbst eine dreifach höhere Konzentration von 60 µg/ml rt-PA keinen toxischen Effekt auf das höhere neuronale Netzwerk der umspülten, isolierten, bovinen Retina hatten. Es konnte aber ein Effekt auf die Photorezeptoren nachgewiesen werden, der jedoch reversibel war. Dennoch wurde in vorherigen Studien, wie bereits erwähnt, beschrieben, dass eine Konzentration von mehr als 50 µg toxische Effekte zeigen kann (Johnson MW 259-63). Dies könnte etwas in Widerspruch zu den hier vorgestellten Ergebnissen stehen, lässt sich aber dadurch relativieren, dass in der zitierten Studie lediglich bei einem untersuchten Auge ein Verlust von Photorezeptoren gezeigt wurde, andere toxische Effekte wurden

erst ab 75 µg beobachtet. Außerdem konnten die hier vorgestellten Versuche zeigen, dass die Photorezeptoren wesentlich empfindlicher reagieren als das höhere neuronale Netzwerk. Zusammen mit dem Wissen, dass Bevacizumab ebenfalls keinen toxischen Effekt auf die Retina hat (Lüke M, Warga M 1178-82), scheint eine Therapiekombination in den beschriebenen Konzentration unbedenklich zu sein.

Wie in der Einleitung schon erwähnt, ist eine gewisse Toxizität von rt-PA mit dem in der Trägersubstanz enthaltenen L-Arginin assoziiert (Loewenstein A 3466-76; Rowley SA 573-78). Jedoch wurden in den Kontrollversuchen, die nur die Trägersubstanz beinhalteten, ebenfalls keine toxischen Effekte auf das höhere neuronale Netzwerk entsprechend einer der 20 µg/ml rt-PA enthaltenen Konzentration an Trägersubstanz festgestellt.

Die Versuche zeigten keine signifikante Minderung der a- und b-Wellenamplituden während der Expositions- und der Auswaschphase. Langfristige Effekte konnten mit diesem Versuchsaufbau nicht gemessen werden, nur unmittelbare Einflüsse auf die Retina. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse kann man den Einsatz von 20 µg/ml rt-PA und 0,25 mg Bevacizumab zur Behandlung einer subretinalen Blutung auf dem Boden einer AMD als bioverträgliche Therapiekonzentration ansehen, die allerdings weiterer klinischer Überprüfung bedarf. Die a-Welle zeigte den stärksten Effekt.

5.3 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Wirkung von Ranibizumab (Lucentis)

Ranibizumab ist, wie schon unter 1.3.3.1 erwähnt, ein humanisierter rekombinanter Antikörper, der sich gegen alle Isoformen des VEGF-A richtet. Nach der MARINA- und ANCHOR-Studie wurde Ranibizumab zugelassen und ist seitdem die Therapie der Wahl. Die Studienlage zur Toxizitäts- und Verträglichkeitstestung zeigte in-vitro bis jetzt keine zytotoxischen Nebenwirkungen, wohl aber proliferationshemmende (Manzano RP 257-61; Spitzer MS 1837-42). Da bisherige Untersuchungen zur direkten Wirkung, bzw. Toxizität auf die Retina nicht vorlagen, sind diese in dieser Arbeit untersucht worden. Die in 5.1 erläuterten Vorteile der perfundierten, isolierten,

bovinen Retina stellen die idealen Voraussetzungen für diese Testungen dar. In der MARINA- und ANCHOR-Studie wurden die Konzentrationen von 0,3 mg und 0,5 mg getestet. Dies erreicht man bei Injektion von 0,05 ml Ranibizumab aus einer Ampulle, die allerdings 0,23 ml enthält. Daher ist eine akzidentelle Gabe von wesentlich höheren Konzentrationen als 0,5 mg durchaus möglich. Aufgrund der Beobachtungen von Spitzer et al. erschien es daher sinnvoll, zuerst eine wesentlich höhere Konzentration zu nehmen, also 1 mg (Spitzer MS 1837-42). Die Ergebnisse aus 4.3 zeigten eine maximale Reduktion von 22.32%, die jedoch nicht signifikant war ($p=0,13$). Bei Testung der Photorezeptoren zeigte sich eine maximale Reduktion der a-Wellenamplitude von 4,0%, die ebenfalls keine Signifikanz erreichte ($p=0,18$). Daher kann man davon ausgehen, dass die Applikation von Ranibizumab in einer Konzentration von 1 mg keinen toxischen Effekt auf die perfundierte, isolierte, bovine Netzhaut hat. Dieses deckt sich auch mit der klinischen Erfahrung, die man in den klinischen Studien gesammelt hat.

Aufgrund z.B. der Vorerfahrungen mit der Trägersubstanz des Bevacizumab (Loewenstein A 3466-76) testeten wir ebenfalls alleinig die Trägersubstanz des Ranibizumab, wobei sich ebenfalls keine signifikanten Effekte auf das ERG zeigten. Langfristige Effekte konnten mit diesem Versuchsaufbau natürlich ebenfalls nicht gemessen werden, nur unmittelbare Einflüsse auf die Retina. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse kann man den Einsatz von 1 mg Ranibizumab zur Therapie der feuchten AMD als relativ sichere Therapieoption ansehen, vor allem in Anbetracht der guten klinischen Erfahrung.

5.4 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Wirkung von Triamcinolon (Volon A)

Obwohl man schon viel Erfahrung mit Triamcinolon Acetonid hat und die klinische Wirksamkeit in Bezug auf die Sehschärfe nach z.B. Makulaödem als effektiv betrachtet werden muss (Chen H 883; Jonas J 113-20; Jonas J, Spandau U 387-94), gab es klinische in vitro Studien, die einen toxischen Effekt von TA beschrieben (Yeung CK et al. 5300; Shaikh S et al. 223-36), der sich

aber nicht mit den guten klinischen Erfahrungen vereinbaren ließ und lässt. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass der direkte Kontakt der TA Kristalle mit der Zelloberfläche toxischer ist als das gelöste TA. In diesem Fall führte sogar eine kurzzeitige direkte Exposition der Zellkulturen zu einer raschen Apoptose (Szurman P 584-92;Szurman P, Sierra A 44-53). Diese Toxizität scheint nicht nur unmittelbar dosisabhängig zu sein. So konnte unter der gesättigten Konzentration von 36 µg/ml kein toxischer Effekt beobachtet werden, wohl aber ab dem Ausfallen der ersten Kristalle (Szurman P 584-92;Szurman P, Sierra A44-53). Die kristalline Form des TA ist aber auch für eine kontinuierliche und zeitverzögerte Freisetzung verantwortlich und steht damit in direktem Zusammenhang mit der Halbwertszeit (Kim H 523-30). Dies ist natürlich ein erwünschter Effekt der Kristalle und so wird es wichtig sein, die Vorteile der Kristalle zu nutzen und zugleich den unerwünschten Effekt so gering wie möglich zu halten.

Analog zu den vorbeschriebenen Beobachtungen wurden auch in den hier durchgeführten Versuchen bei einer Konzentration von 36 µg/ml keine signifikanten Effekte sowohl auf die a- als auch auf die b-Wellenamplitude während Expositions- und Auswaschphase beobachtet. Höhere Konzentrationen mit ansteigendem Anteil an Depotkristallen zeigten bei direkter epiretinale Applikation eine konzentrationsabhängige Toxizität. Die b-Wellenamplituden als Messparameter des höheren neuronalen Netzwerkes der Retina zeigten ab einer Konzentration von 8 mg/ml eine signifikante Beeinträchtigung, während das isolierte Photorezeptorpotential, die a-Wellenamplituden, schon ab einer Konzentration von 4 mg/ml signifikant beeinflusst wurden. Dennoch waren diese Effekte für alle gemessenen Konzentrationen in der Auswaschphase reversibel, bis auf die höchste Konzentration von 40 mg/ml. Hier wurde die volle Netzhautfunktion auch am Ende der Auswaschphase nicht mehr wiedererlangt. Diese Ergebnisse decken sich mit Versuchen an Kaninchen, die eine ähnliche dosisabhängige Toxizität für Konzentration von 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 4 mg/ml und 20 mg/ml zeigten (Yu SY 531-36).

Das a-Wellenpotential spiegelt die direkte Antwort der Photorezeptoren wider, während das b-Wellenpotential eine Aussage über das höhere Netzwerk macht. Hierbei kann man jedoch keine direkte Antwort über den Zustand der Ganglienzellen treffen. Daher wurde die Life/Dead[®] Viability/Cytotoxicity Färbung verwendet, mit der man zeigen konnte, dass bis zu einer Konzentration von 8 mg/ml die Ganglienzellen größtenteils unbeschadet blieben, aber ab der nächst höheren Konzentration eine steigende Zahl von apoptotischen Zelluntergängen beobachtet werden konnte. Obwohl dazu korrelierend, rein lichtmikroskopisch eine steigende Anzahl von Triamcinolonkristallen trotz Umspülung auf der Retina sichtbar war, kann eine ursächliche Lösung für die retinale Toxizität von TA nicht angeboten werden. Allerdings weisen laborexperimentelle Arbeiten darauf hin, dass eher ein chemischer, als ein mechanischer Effekt der TA Kristalle in Betracht zu ziehen ist (Szurman P 584-92;Szurman P, Sierra A 44-53), obwohl sich eine Beschädigung der Retina durch die scharfen Kanten der TA Kristalle nicht ausschließen lässt. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente, die gezeigt haben, dass alle Schichten der Retina geschädigt sind, legen nahe, dass es wahrscheinlich ist, dass der toxische Effekt der TA Kristalle durch Diffusion im Sinne einer lokalen biokompatiblen Unverträglichkeit verursacht wird.

Szurman et al. konnten zeigen, dass bei direkter Adhärenz der TA Kristalle an die Zellen die kritische toxische Konzentration bei 57,9 µg/ml liegt, ohne direkten Kontakt werden dagegen bis zu 7,7 mg/ml toleriert, eine Konzentration, die in den hier durchgeführten Versuchen an der gesamten Retina bereits toxische Effekte zeigte, die aber noch reversibel waren. Dies lässt sich dadurch erklären, dass wahrscheinlich die Lamina limitans interna eine protektive Funktion ausübt. Wahrscheinlich spielt auch die Beschaffenheit des Glaskörpers eine wichtige Rolle, indem sie direkte Kristallsedimentierungen verringert und eine diluierende Komponente hat (Szurman P, Sierra A 44-53). Trotzdem zeigten diese Versuche in vitro, dass ab einer Konzentration von 4mg/ml toxische Effekte auf die Retina auftreten.

Andere Studien, die sich mit dem Lösungsmittel des TA befassten, fanden heraus, dass die Retina durch den enthaltenen Benzylalkohol stark beeinflusst wurde (Lang Y 778-88). In diesem Wissen wurde in dieser Arbeit eine standardisiert aufgereinigte Suspension (Hernandez-Ortega MC 350-51) verwendet, womit man ausschließen konnte, dass die Trägersubstanz des TA für die beobachteten Effekte verantwortlich war. Ohne Aufreinigung der Trägersubstanz ist es eher wahrscheinlich, dass die toxischen Effekte noch weiter zunehmen werden.

Obwohl die modifizierte Perfusionskammer die intravitreale direkte Applikation in-vivo sehr genau simulieren kann, ist die Aussagekraft dadurch limitiert, dass der Versuchsaufbau nur einen „kurzen“ Beobachtungszeitraum zulässt und durch die konstante Perfusion der Retina die Möglichkeit bestand, dass während der Auswaschphase, sogar schon in der Expositionphase, Kristalle hätten abgespült werden können. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sich selbst bei den geringsten Konzentration TA Kristalle auf der Retina lichtmikroskopisch nachweisen lassen, selbst nach verlängerten Auswaschzeiten.

Klinische Beobachtungen bei Patienten zeigten, dass epiretinal sedimentierte Kristalle sich erst nach mehreren Tagen vollständig auflösten (Jaissle G 121-28). Dennoch wäre der Effekt durch die prolongierte Wirkdauer der epiretinal gelagerten Kristalle nur gravierender als in dem Modell der perfundierten Retina nach Sickel. Die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigen die in den mit Zellkulturen durchgeführten Studien (Szurman P 584-92;Szurman P, Sierra A 44-53) und zeigten eine dosisabhängige Toxizität der TA Kristalle. Die Beobachtung, dass erst ab höheren Konzentration (ab 8 mg/ml signifikant, ab 40 mg/ml irreversibel) eine signifikante Toxizität gemessen werden konnte, nicht aber für geringere, hat in Hinsicht auf die asymmetrische Verteilung der Kristalle eine große klinische Relevanz. Die punktuelle Akkumulation der Kristalle hängt von vielen Faktoren ab. Zum Beispiel von der Schwerkraft oder von der Injektionsgeschwindigkeit, Es könnte also im Extremfall sein, dass eine Injektion eine Sedimentierung der Kristalle auf nur einem Punkt der Netzhaut verursacht. Durch diese Kristallakkumulation können also starke lokale Effekte entstehen,

so dass schon eine Konzentration von mehr als 4 mg/ml risikoreich erscheint. Besondere Vorsicht sollte bei vitrektomierten Patienten geübt werden, da hier die Kristalle nicht den Glaskörper als gewisse Barriere überwinden müssen, sondern sich direkt auf der Retina ablagern können.

5.5 Bevacizumab und Ranibizumab

Mitte des Jahres 2005 wurden die ersten Studien zu Ranibizumab veröffentlicht, bis dahin gab es nur eine Marktzulassung für Pegaptanib (Macugen) und die Photodynamische Therapie. Die eigentliche Marktzulassung für Ranibizumab erfolgte in den USA erst im Juni 2006. In diesem Zeitraum begannen Retinologen schon den Ranibizumab sehr verwandten Wirkstoff Bevacizumab einzusetzen und Erfahrungen zu sammeln. Auf Grund der sehr guten Erfahrung mit Bevacizumab in der Behandlung der feuchten AMD (Freeman WR 853-58) und den sehr hohen Kosten für das Ranibizumab ist die Meinung über den Einsatz beider Wirkstoffe sehr geteilt. Auf der einen Seite steht das Ranibizumab, das in kontrollierten, klinischen Studien die Kriterien der evidenzbasierten Medizin für ein sicheres und wirksames Medikament erfüllt, auf der anderen steht der sehr hohe Kostenpunkt von diesem neuen Wirkstoff im Vergleich zu dem genauso wirksamen aber als Off-Label angewandten Bevacizumab. In einer Studie wurde zwar gezeigt, dass eine ständige Diskussion über die Kosten in der Medizin einen negativen Effekt auf die Behandlung der Patienten haben kann (Hartzband P 101-103), dennoch werden hier weitreichende Diskussionen als notwendig erachtet (Neubauer A 727-732).

Bevacizumab wird also Off-Label genutzt. Gerade vor diesem Hintergrund ist eine Untersuchung der Biokompatibilität, vor allem des Bevacizumab, sehr wichtig.

Das Toxizitäts-, bzw. Nebenwirkungsspektrum beider Substanzen war ähnlich. In dieser Arbeit zeigte sich bei der Exposition der perfundierten, umspülten, bovinen Netzhaut mit Bevacizumab kein toxischer Effekt bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml, allerdings wurde es mit rt-PA koappliziert. Die meisten klinischen Studien zum Bevacizumab verwendeten 1,25 mg zur

Injektion, was einer Konzentration von 0,25 mg/ml entspricht, wenn man von einem durchschnittlichen Glaskörpervolumen von 5 ml ausgeht. Damit wurde also die klinisch verwendete Konzentration getestet. Eine Studie, die Konzentration von 2,5 mg pro Injektion verwendete, lieferte ebenfalls keine Hinweise auf eine eventuelle retinale Toxizität (Bashshur ZF 1-9). Für das Ranibizumab verwendeten wir bereits die doppelte Konzentration der klinischen Behandlungsdosis, da wir eventuelle Überdosierungen, die aufgrund des Fläschchenvolumens entstehen, untersuchen wollten. Auch hier zeigte sich keine retinale Toxizität, so dass man für beide Wirkstoffe postulieren kann, dass die toxischen Effekte auf die Netzhaut in unserem untersuchten Modell weder vorhanden noch unterschiedlich waren. Andere Faktoren wie z.B. das Molekulargewicht, das sich erheblich unterscheidet, könnten hier eine Rolle spielen. So ist das Bevacizumab mit 145 kDa erheblich schwerer als das Lucentis mit 48 kDa. Damit ist durch die verlängerte Halbwertszeit eher mit kumulativen Effekten zu rechnen, als beim Lucentis. Die Studienlage deutet dennoch nicht daraufhin, so dass man vermuten könnten, dass dies eher ein Vorteil für das Bevacizumab sein könnte, da man eventuell ein längeres Injektionsintervall wählen könnte, bei gleichem Wirkspiegel (Freeman WR 853-58).

Auch aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichtes, könnte das Ranibizumab leichter in der Lage sein die Retina zu penetrieren. Diese anfängliche Hypothese, dass das Bevacizumab die Retina eventuell sogar überhaupt nicht penetrieren könnte, wurde 2007 von Heiduschka et al. widerlegt (Heiduschka P 2814-23). Für die Untersuchungen, die in dieser Arbeit behandelt wurden gilt, dass das unterschiedliche Molekulargewicht keinen Einfluss auf die retinale Toxizität der beiden Substanzen hat. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Diskussion um die Verwendung der einen oder anderen Substanz von den Ergebnissen in dieser Arbeit hier nicht beeinflusst wird, da weder Ranibizumab noch Bevacizumab signifikante toxische Effekte auf die perfundierte, isolierte, umspülte bovine Retina zeigten. Um diese Diskussion zu beenden, bedarf es weiterer klinischer, standardisierter Studien. Man kann nur so viel sagen, dass eine etweiige Entscheidung zu

Gunsten des einen oder anderen Medikamentes nicht von der Frage nach retinaler Toxizität entschieden werden wird.

6. Zusammenfassung

Die AMD stellt die häufigste Erblindungsursache in der industrialisierten Welt für Menschen, die älter als 65 sind, dar. 25 Millionen Individuen sind betroffen. Die exsudative Form der AMD ist durch Neovaskularisationen und einen schnell progredienten Visusverlust charakterisiert. In den letzten Jahren wurden neue, intravitreal zu applizierende Medikamente entwickelt, die sich pharmakologisch gegen diese Neovaskularisationen oder deren Komplikationen richten. In dieser Arbeit wurden die retinalen Biokompatibilitäten von Triamcinolon, einem kristallinen Depot-Kortikosteroid, der VEGF Antikörper Bevacizumab und Ranibizumab, sowie des rt-PA, einer fibrinolytischen Substanz, in Organkultur untersucht. Allen diesen Pharmaka ist gemein, dass sie intravitreal appliziert werden und ihren Effekt über den direkten Kontakt mit der Retina ausüben. Trotz millionenfacher Anwendung lagen bisher noch keine ausreichenden Daten zur Biokompatibilität vor.

Für diese Untersuchung wurde die perfundierte, isolierte, bovine Retina verwendet, ein Verfahren, mit dem es möglich ist, den Einfluss eines Pharmakons auf die Netzhautfunktion anhand elektrophysiologischer Ableitungen zu testen. Mit diesem Modell kann man Untersuchungen durchführen, die den in-vivo Bedingungen im Vergleich zu allen anderen existierenden Modellen am nächsten kommen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Kombination aus 20 µg/ml rt-PA und 0,25 mg/ml Bevacizumab, außerdem 1 mg/ml Ranibizumab, sowie 4 mg/ml Triamcinolon keinen signifikanten toxischen Effekt bei direktem Kontakt mit der neurosensorischen Retina haben. Mit diesen Ergebnissen liegen erstmals nachgewiesene unbedenkliche Konzentrationen dieser Pharmaka vor, die anhand einer perfundierten Organkultur ermittelt wurden und damit eine bessere Übertragbarkeit auf die in vivo Situation beim Menschen erlauben als Zellkultur-Ergebnisse. Insbesondere im Hinblick auf die Off-Label Anwendung (Bevacizumab, rt-PA, Triamcinolon) sind diese Grenzkonzentrationen klinisch relevant. In dieser Arbeit wurden nur kurzfristige Effekte untersucht, über Langzeiteffekte kann keine Aussage getroffen werden.

7. Abkürzungsverzeichnis:

Ang Angiopoietin

AMD Altersbedingte Makuladegeneration

cGMP zyklisches Guaninmonophosphat

CNV Choroideale Neovaskularisation

DOG Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft

DRG Deutsche Retinologische Gesellschaft

ERG Elektroretinogramm

ETDRS Early Treatment of diabetic retinopathy scale

EthD-1 Ethidium homodimer-1

FAB Fragment Antigen bindend

FAZ Foveoläre Avaskuläre zone

GDP Guanidinphosphat

GTP Guanidintriphosphat

MPS Macular Photocoagulation Study

PEDF Pigment epithelium derived growth factor

PDT Photodynamische Therapie

RPE retinales Pigmentepithel

rt-PA rekombinanter gewebspezifischer Plasminogen Aktivator

SST Submacular Surgery Trial

TAP Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy Study Group

Tie Tyrosinkinase mit Ig und EGF Homologiedomänen

VEGF Vascular epithelial growth factor

8. Abbildungsverzeichnis und Legende:

Abbildung 1: Modifiziert aus David H.Hubel (1989) Auge und Gehirn. Neurobiologie des Sehens. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg.

Abbildung 2: historische modifizierte Abbildung aus: Granit "The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve", J Physiol 1933.

Abbildung 3: a-Welle

Abbildung 4: b-Welle

Abbildung 5: „Tübinger Kammer“ Perfusionskammer

Abbildung 6: Modifizierte „Tübinger Kammer“ nach Januschowski und Lücke

Abbildung 7: Versuchsaufbau, schematisiert.

Abbildung 8: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 0,25 mg/l Bevacizumab und 20 µg/ml rt-PA

Abbildung 9: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 20 µg/ml rt-PA . Der Graph zeigt den Verlauf der Amplituden über der Zeit

Abbildung 10: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 60 µg/ml rt-PA

Abbildung 11: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 200 µg/ml rt-PA

Abbildung 12: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 1 mg Ranibizumab

Abbildung 13: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 36 µg/ml Triamcinolon

Abbildung 14: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation von 1 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml, 20 mg/ml und 40 mg/ml Triamcinolon

Abbildung 15: Dosis-Wirkungsbeziehung

Abbildung 16: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 0,25 mg/ml Bevacizumab und 20 µg/ml rt-PA

Abbildung 17: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 20 µg/ml rt-PA

Abbildung 18: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 60 µg/ml rt-PA

Abbildung 19: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 200 µg/ml rt-PA

Abbildung 20: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 1 mg/ml Ranibizumab

Abbildung 21: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 36µg/ml Triamcinolon

Abbildung 22: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation von 1 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml, 20 mg/ml und 40 mg/ml Triamcinolon

Abbildung 23: Dosis-Wirkungsbeziehung

Abbildung 24: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation der Trägerflüssigkeit von rt-PA

Abbildung 25: Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation der Trägerflüssigkeit von rt-PA

Abbildung 26: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation der Trägerflüssigkeit von Ranibizumab

Abbildung 27 : Verlauf der a-Wellenamplitude bei Applikation der Trägerflüssigkeit von Ranibizumab

Abbildung 28: Verlauf der b-Wellenamplitude bei Applikation einer Negativprobe gegen Bevacizumab

Abbildung 29: Kristallsedimentierungen

Abbildung 30: Darstellung der toten Ganglienzellen

9. Tabellen

Tabelle 1: In Tabelle 1 ist eine Übersicht über die Gliederungsmöglichkeiten der AMD gegeben. Lokalisation und Anteil der klassischen CNV am Gesamtbild sind hier als zwei wichtige Unterscheidungskriterien angegeben.

Tabelle 2: In Tabelle 2 sind die prozentualen Reduktionen der b-Wellenamplituden bei Applikation der verschiedenen Konzentrationen von Triamcinolon direkt gegenübergestellt. Die errechneten p-Werte sind jeweils darunter angegeben. Ebenfalls angegeben sind die Defizite in der Erholung der b-Wellenamplituden zum Ende der Auswaschphase hin. Die errechneten p-Werte sind jeweils darunter angegeben.

Tabelle 3: In Tabelle 3 sind die prozentualen Reduktionen der a-Wellenamplituden bei Applikation der verschiedenen Konzentrationen von Triamcinolon direkt gegenübergestellt. Die errechneten p-Werte sind jeweils darunter angegeben. Ebenfalls angegeben sind die Defizite in der Erholung der a-Wellenamplituden zum Ende der Auswaschphase hin. Die errechneten p-Werte sind wieder jeweils darunter angegeben.

Tabelle 4: In Tabelle 4 sind die prozentualen Anteile der apoptotischen Zellen, markiert durch die EthD-1 Färbung dargestellt. Die Apoptose bei verschiedenen Konzentrationen ist hier wieder gegenübergestellt. Zusätzlich kann man noch die Konfidenzintervalle und die p-Werte erkennen.

10. Literaturverzeichnis:

Aisenbrey S, Lafaut BA, Szurman P, Grisanti S, Lüke C, Krott R, Thumann G, Fricke J, Neugebauer A, Hilgers RD, Esser P, Walter P, and Bartz-Schmidt KU. Macular Translocation with 360° Retinotomy for Exsudative Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol* 120, 451-59. 2002.

Aisenbrey S, Ziemssen F, Volker M, Gelisken F, Szurman P, and Jaissle G. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for occult choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245, 941-48. 2007.

Alon T "Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity." *Nature Medicine* 1, 1024-28. 1995.

AMD Alliance International. Information on Age-related macular degeneration (AMD). www.amdalliance.org . 2009.

Avery RL, Fekrat S, Hawkins BS, and Bressler NM. Natural history of subfoveal subretinal hemorrhage in age-related macular degeneration. *Retina* 16, 183-89. 1996.

Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, and Giust MJ. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 113[363], 372. 2006.

Bashshur ZF, Bazarbachi A, Schakal A, Haddad ZA, El Haibi CP, and Nouredin BN. Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 142, 1-9. 2006.

Berrocal MH, Lewis ML, and Flynn HW Jr. Variations in the clinical course of submacular haemorrhage. *Am J Ophthalmol* 122, 486-93. 1996.

Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, de Jong PT, Klaver CC, Klein B, and Klein R. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *The*

international ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 39, 367-74. 1995.

Bressler N, Bressler S, and Fine S. "Age related macular degeneration." *Surv Ophthalmol* 32 (1988): 375-413.

Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim R, Sy JP, Schneider S, and ANCHOR Study Group. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 356, 748-50. 2007.

Challa J, Gillies MC, Penfold P, Gyory J, Hunyor A, and Billson F. Exudative macular degeneration and intravitreal triamcinolone: 18 months follow up. *Aust N Z J Ophthalmol* 26, 188-192. 1998.

Chen H, Suri C, Lockhead J, and Patel JK. Intravitreal triamcinolone for the treatment of ischemic macular edema associated with branch retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 141, 883. 2006.

Chen Y, Wiesmann C, Fuh G, Li B, Christinger HW, McKay P, de Vos AM, and Lowman H. Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J Mol Biol* 293, 865-81. 1999.

Ciulla TA, Crisswell MH, Danis RP, and Hill TE. Intravitreal triamcinolone acetonide inhibits choroidal neovascularisation in a laser-treated rat model. *Arch Ophthalmol* 119, 399-404. 2001.

Coscas G and Soubrane G. Argon laser photocoagulation of subretinal neovascularization in senile macular degeneration. Results of a randomized study of 60 cases. *Arch Ophthalmol* 100, 912-18. 1982.

Dacey DM. "Primate Retina: cell types, circuits and color opponency." *Progn Retin Eye Res.* 19 (2000): 737-63.

Danis RP, Ciulla TA, Pratt LM, and Anliker W. Intravitreal triamcinolone acetonide in exudative age-related macular degeneration. *Retina* 20, 244. 2000.

Dawson DW et al. "Pigment epithelium-derived growth factor: a potent inhibitor of angiogenesis." *Science* 285 (1999): 245-48.

Derwent JJ and Linsenmeier RA. Intraretinal analysis of the a-wave of the electroretinogram (ERG) in dark-adapted intact cat retina. *Vis Neurosci* 18, 353-63. 2001.

Du Bois-Raymond E. *Untersuchungen über thierische Electricität.* Berlin: G.Reimer . 1849.

Ferrara N. "Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects." *Curr Top Microbiol Immunol* 237, 1-30.1999.

Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, and Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy of neo-vascular age-related macular degeneration. *Retina* 26, 859-70. 2006.

Ferrara N, Gerber HP, and LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-76. 2003.

Ferris FL, FineSL, and Hyman L. "Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy." *Arch Ophthal* 102, 1640-42.1984.

Freeman WR and Falkenstein I. Avastin and New Treatments for AMD: Where Are We? *Retina* 26, 853-58. 2006.

Gaudreault J, Fei D, Rusit J, Suboc P, and Shin V. Preclinical Pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal Administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 726-33. 2005.

Gelissen F and Bartz-Schmidt KU. Makulatranslokation: Visusprognose und Patientenselektion. *Ophthalmologe* 99, 144-49. 2002.

Gelissen F, Ziemssen F, Volker M, Bartz-Schmidt KU, and Inhoffen W. Retinal pigment epithelial tears after single administration of intravitreal bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Eye* 23, 694-702. 2008.

Gillies MC, Simpson JM, and Luo W. A randomized clinical trial of a single dose of intravitreal triamcinolone acetonide for neovascular age-related macular degeneration: one year result. *Arch Ophthal* 121, 667-73. 2003.

Glatt H and Machemer R. Experimental subretinal hemorrhage in rabbits. *Am J Ophthalmol* 94, 762-73. 1982.

Granit R. The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J Physiol* 77, 239. 1933.

Hanawa I and Tateishi T. The Effect of Aspartate on the Electroretinogram of the Vertebrate Retina. *Cell Mol Life Sci* 26, 1311-12. 1970.

Haritoglou C, Kook D, Neubauer A, Wolf A, Priglinger S, Strauss R, Gandorfer A, Ulbig M, and Kampik A. Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema. *Retina* 26, 999-105. 2006.

Hartzband P, Groopman J. Money and the changing culture of medicine. *N Engl J*

Med. 360, 101-103. 2009

Haschke W and Sickel W. Das Elektroretinogramm des Menschen bei Ausfall der Ganglienzellen und partieller Schädigung der Bipolaren. Arch Ophthal 70, 162-67. 1962.

Hassan AS, Johnson MW, and Schneidermann TE. Management of submacular hemorrhage with intravitreal tissue plasminogen activator injection and pneumatic displacement. Ophthalmology 106, 1900-06. 1999.

Heiduschka P et al. "Penetration of Bevacizumab through the Retina after Intravitreal injection in the monkey." Invest Ophthalmol Vis Sci 48, 2814-23. 2007.

Hernandez-Ortega MC and Soto-Perez E. A simple and rapid method for purification of triamcinolone acetonide suspension for intravitreal injection. Ophthalmic Surg Lasers Imaging 35, 350-51. 2004.

Hesse L, Schmidt J, and Kroll P. Management of acute submacular hemorrhage using recombinant tissue plasminogen activator and gas. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 237, 273-77. 1999.

Holekamp NM, Bouck N, and Volpert O. "Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol 134.2, 220-27. 2002.

Holmgren F. Ueber die Retinaströme. Unters.Physiol.Inst.Univ.Heidelb. 3, 278-86. 1879.

Holz FG, Bindewland A, Schutt F, and Specht H. Intraocular microablation of choroidal tissue by a 308 nm AIDA excimer laser for RPE-transplantation in patients with age-related macular degeneration. Biomed Tech (Berl) 48, 82-85. 2003.

Holz FG et al. "Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane." Arch Ophthal 112.3, 402-06.1994.

Hood DC and Birch DG. A computational model of the amplitude and implicit time of the b-wave of the human ERG. Vis Neurosci 8, 107-26. 1992.

Hrach CJ, Johnson MW, Hassan AS, Lei B, Sieving PA, and Elnor VM. Retinal toxicity of commercial intravitreal tissue plasminogen activator solution in cat eyes. Arch Ophthalmol 118, 659-63. 2000.

Jager RD, Aiello P, Patel SC, and Cunningham ET Jr. Risk of intravitreal injection: A comprehensive review. *Retina* 24, 676-98. 2004.

Jaissle G, Szurman P, and Bartz-Schmidt KU. Ocular side effects and complications of intravitreal triamcinolone acetonide injection. *Ophthalmologie* 101, 121-28. 2004.

Jamison JA, Bush RA, Lei B, and Sieving PA. Characterization of the rod photoresponse isolated from the dark-adapted primate ERG. *Vis Neurosci* 18, 445-55. 2001.

Johnson MW, Olsen KR, Hernandez E, Irvine WD, and Johnson RN. Retinal toxicity of recombinant tissue plasminogen activator in the rabbit. *Arch Ophthalmol* 108 259-63. 1990.

Jonas J, Kreissig I, and Degenring R. Intravitreales Triamcinolonacetamid zur Behandlung intraokulärer ödematöser und neovaskulärer Erkrankungen. *Ophthalmologie* 101, 113-20. 2004.

Jonas J, Kreissig I, Spandau U, and Harder B. Infectious and Noninfectious Endophthalmitis After Intravitreal High-Dosage Triamcinolone Acetonide. *Am J Ophthalmol* 141, 579-80. 2006.

Jonas J, Spandau U, and Kampeter BA. Follow-up after intravitreal triamcinolone acetonide for exudative age-related macular degeneration. *Eye* 21, 387-94. 2007.

Joussen AM, Kirchhof B, and Gottstein C. "Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese." *Ophthalmologie* 100, 284-91. 2003.

Kaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implication in ocular disease. *Am J Ophthalmol* 142, 660-68. 2006.

Kanski JJ. *Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach*. 6th Edition, 405-19. 2007.

Karpe G. The basis of clinical electroretinography. *Acta Ophthal Kbh* 24, 1-118. 1945.

Kim H, Csaky KG, Gravlín L, Yuan P, Lutz RJ, Bungay PM, Tansey G, Monasterio GE, Potti F, Grimes G, and Robinson MR. Safety and pharmacokinetics of a preservative-free triamcinolone acetonide formulation for intravitreal administration. *Retina* 26, 523-30. 2006.

Klein R, Klein B, and Linton KL. "Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study." *Ophthalmology*.99, 933-43. 1992.

Lacour M, Kiilgaard JF, and Nissen MH. Age-Related Macular Degeneration: Epidemiology and Optimal Treatment. *Drugs Aging* 19, 101-33. 2002.

Lang Y, Zemel E, Miller B, Garzozi H, and Perlman I. Retinal Toxicity of Intravitreal Kenalog in Albino Rabbits. *Retina* 27, 778-88. 2007.

Loewenstein A, Zemel E, Lazar M, and Perlman I. Drug-induced retinal toxicity in albino rabbits: the effects of imipenem and aztreonam. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 3466-76. 1993.

Lüke M. "Effekte Des Phosphodiesterasehemmers Sildenafil Auf Die Funktion Der Isolierten Umströmten Vertebratennetzhaut." Diss. aus dem Institut der Neurophysiologie der Universität zu Köln, 2005.

Lüke M, Januschowski K, Warga M, Beutel J, Leitritz M, Gelissen F, Grisanti S, Schneider T, Lüke C, Bartz-Schmidt KU, and Szurman P. The retinal tolerance to bevacizumab in co-application with a recombinant tissue plasminogen activator. *Br J Ophthalmol* 91, 1077-82. 2007.

Lüke M, Warga M, Ziemssen F, Gelissen F, Grisanti S, Schneider T, Lüke C, Partsch M, Bartz-Schmidt KU, and Szurman P. Effects of bevacizumab on retinal function in isolated vertebrate retina. *Br J Ophthalmol* 90, 1178-82. 2006.

Lüke M, Wiergräber M, Brand C, Siapich SA, Banat M, Hescheler J, Lüke C, and Schneider T. The isolated perfused bovine retina-- a sensitive tool for pharmacological research on retinal function. *Brain Res Brain Res Protoc* 16, 27-36. 2005.

Lüke M, Wiergräber M, Brand C, Siarhei AS, Banat M, Hescheler J, Lüke C, and Schneider T. The isolated perfused bovine retina- A sensitive tool for pharmacological research on retinal function. *Brain Res Brain Res Protoc* 16, 27-36. 2005.

Machemer R, Sugita G, and Tano Y. Treatment of intraocular proliferations with intravitreal steroids. *Trans Am Ophthalmol Soc* 77, 171-80. 1979.

Macular Photocoagulation Study Group. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Three-year results from randomized clinical trials. *Arch Ophthalmol* 104, 694-701. 1986.

Maier M, Fischer E, Winkler von Mohrenfels C, and Lohmann CP. Intravitreale Medikamente bei der AMD. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 224, 1-23. 2007.

Makulakommission der DOG und DRG. Aktuelle therapeutische Möglichkeiten bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration. *Ophthalmologie* 104, 628-634 2007.

Manzano RP, Peyman GA, Khan P, and Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (avastin). *Retina* 26, 257-61. 2006.

Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, and Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 112, 1035-47. 2005.

Miller DW, Jousen AM, and Holz FG. "Die molekularen Mechanismen der neovaskulären AMD." *Ophthalmologie* 100, 92-96. 2007.

Miller RF and Dowling JE. Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogramm. *J Neurophysiol* 33, 323-41. 1970.

Moschos MM, Brouzas D, Apostolopoulos M, Loukianou E, and Moschos M. Intravitreal use of bevacizumab (Avastin) for choroidal neovascularization due to ARMD: A preliminary multifocal-ERG and OCT study: Multifocal-ERG after use of bevacizumab in ARMD. *Doc Ophthalmol* 114, 37-44. 2007.

Neubauer A, Holz FG, Schrader W, Back EI, Kühn T, Hirneiss C, Kampik A. Was darf Lebensqualität kosten? - Kosten-Nutzwertanalyse von Ranibizumab Lucentis® bei altersabhängiger Makuladegeneration. Cost-Utility Analysis of Ranibizumab (Lucentis) in Neovascular Macular Degeneration. *Klin Monatsbl Augenheilkd*; 224, 727-732. 2007

Oshima Y, Ohji M, and Tano Y. Pars plana vitrectomy with peripheral retinotomy following preoperative intravitreal tissue plasminogen activator: a modified procedure to drain massive subretinal hemorrhage. *Br J Ophthalmol* 91, 193-198. 2007.

Pauleikhoff D. "Neovascular Age-Related Macular Denegeration, Natural History and Treatment Outcomes." *Retina* 25, 1065-84. 2005.

Ramrattan RS et al. "Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris and the choroid in aging." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 2857-64. 1994.

Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY, and MARINA Study Group. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 14, 1419-31. 2006.

Rowley SA, Vijaysekaran S, Yu PK, McAllister IL, Yu L, and Yi D. Retinal toxicity of intravitreal tenecteplase in the rabbit. *Br J Ophthalmol* 88, 573-78. 2004.

Scupola A, Coscas G, Soubrane G, and Balestrazzi E. Natural history of macular subretinal hemorrhage in age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* 213, 97-102. 1999.

Seddon J, Cote J, Page W, Aggen S, and Neale M. The US Twin Study of Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol* 123, 321-27. 2005.

Shaikh S, Ho S, Engelmann LA, and Klemann SW. Cell viability effects of triamcinolone acetonide and preservative vehicle formulations. *Br J Ophthalmol* 90, 223-36. 2006.

Shiells RA and Falk G. Contribution of rod, on-bipolar and horizontal cell light responses to the ERG of dogfish retina. *Vis Neurosci* 16, 503-11. 1990.

Sickel W. "The isolated retina maintained in a circulating medium. Combined optical and electrical investigations of metabolic aspects of the generation of the electroretinogram." Pergamon Press, Oxford, 115-24. 1966.

Sickel W. "Retinal Metabolism in Dark and Light." Ed. Fourtes MGF. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 667-727. 1972.

Singh RP, Patel C, and Sears JE. Management of subretinal macular haemorrhage by direct administration of tissue plasminogen activator. *Br J Ophthalmol* 90, 429-31. 2006.

Spitzer MS, Yoeurck E, Sierra A, Wallenfels-Thilo B, Schraermeyer U, Spitzer B, Bartz-Schmidt KU, and Szurman P. Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245, 1837-42. 2007.

Sterling P. "Retina" in Shepard G.M.(ed.): The synaptic organization of the brain. The Oxford University press, 205-79. 1998.

Stürzlinger H, Fröschl B, and Genser D. "Wertigkeit der optischen Kohärenztomographie im Vergleich zur Fluoreszenzangiographie in der Diagnostik der altersbedingten Makuladegeneration (AMD)." HTA-Bericht (2007).

Submacular Surgery Trials (SST) Research Group. Surgery für Subfoveal Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration: Ophthalmic Findings SST Report No.11. *Ophthalmology* 111, 1967-80. 2004.

Suri C et al. "Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE 2 Receptor during Embryonic Angiogenesis." *Dev Cell* 87, 1171-80. 1996.

Szurman P, Kaczmarek R, Spitzer MS, Jaissle G, Decker P, Grisanti S, Henke-Fahle S, Aisenbrey S, and Bartz-Schmidt KU. Differential toxic effect of dissolved triamcinolone and its crystalline deposits on cultured human pigmented epithelium (ARPE19) cells. *Exp Eye Res* 83, 584-92. 2006.

Szurman P, Sierra A, Kaczmarek R, Jaissle G, Wallenfels-Thilo B, Grisanti S, Lüke M, Bartz-Schmidt KU, and Spitzer MS. Different biocompatibility of crystalline TA crystals on retinal cells in vitro and in vivo. *Exp Eye Res* 85, 44-53. 2007.

Tewari A, Dhalla MS, and Apte RS. Intravitreal bevacizumab for treatment of choroidal neovascularization in pathologic myopia. *Retina* 26, 1093-94. 2006.

Thylefors B et al. "Global data on blindness." *Bull World Health Organ* 73,115-21. 1995.

Toth CA, Morse LS, Hjelmeland LM, and Landers MB. Fibrin directs early retinal damage after experimental subretinal hemorrhage. *Arch Ophthalmol* 109, 723-29. 1991.

Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two year results of 2 randomized clinical trials-TAP report 2. *Arch Ophthalmol* 119, 198-207. 2002.

Völcker M, Peters S, Inhoffen W, and Ziemssen F. Früher antioxidativer Effekt - OCT-Monitoring nach intravitrealer Bevacizumab-Applikation. *Ophthalmologe* 103, 476-83. 2006.

Walter P, Lüke C, and Bartz-Schmidt KU. "Antibiotics and light responses in superfused bovine retina." *Cell Mol Neurobiol* 19, 87-92. 1999.

Xu X and Karwoski CJ. Current source density analysis of retina field potentials. II. Pharmacological analysis of the b-wave and M-wave. *J Neurophysiol* 72, 96-105. 1994.

Yeung CK, Chan KP, Chiang SW, Pang CP, and Lam DSC. The Toxic and Stress Responses of Cultured Human Retinal Pigment Epithelium (ARPE19) and Human Glial Cells (SVG) in the Presence of Triamcinolone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 5300. 2003.

Yu SY, Damico FM, Viola F, D'Amico D, and Young LH. Retinal toxicity of intravitreal TA acetate: a morphological study. *Retina* 26, 531-36. 2006.

11. Dank

Ich danke meinen Eltern, für Ihre Unterstützung, Liebe, aber vor allem für Ihre Geduld, sowie meinem lieben Bruder Tim Januschowski und Frau Dr. med. dent. Maren Hülber für die tatkräftige Unterstützung und Zuneigung.

Herrn Professor Dr. med. Peter Szurman für die Überlassung des Themas und seine ruhige, ordnende Hand und die Inspiration.

Dank gebührt Herrn Dr. med. Matthias Lüke, ohne dessen Betreuung, Motivation, Inspiration und Geduld ich weder diese Dissertation noch meine zukünftige Berufswahl getroffen hätte. Mein wissenschaftliches und klinisches Interesse verdanke ich ihm.

Frau Dr. med. Julia Lüke für Ihre Unterstützung.

Dem Forschungsteam aus dem Breuningerbau, das in netter und inspirierender Atmosphäre das Forschen zur Freude gemacht hat.

Professor Dr. med. Karl-Ulrich Bartz-Schmidt für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Mittel.

Der Feinmechanischen Werkstatt für Ihre unermüdliche Mühe.

Herrn Sascha Hoffmann und Oli Borst für die Diskussionen, auch und vor allem bis spät in die Nacht.

12. Lebenslauf

Geburt:

26.07.1982 in Celle

Eltern:

Choon Sa Januschowski geborene An, Fachschwester für Anästhesie und Dr. med. Rainer Januschowski, Facharzt für Gastroenterologie

Geschwister:

Tim Januschowski (18.03.1981) Dipl. math.

Taufe:

22.07.1985 in Wilhelmshaven

Grundschule:

1988-1992 katholische Grundschule Wilhelm-Oberhaus Herford

Weiterführende Schule:

Friedrichs-Gymnasium Herford 1992-2001 (Abitur)

Zivildienst:

Arche, Grundschule für Erziehungshilfe 2001-2002

Studium:

Humanmedizin Eberhard Karls Universität Tübingen WS02/03, Physikum SS04, seit April 2006 experimentelle Doktorarbeit an der Augenklinik Tübingen zum Thema „Altersbedingte Makuladegeneration“, seit Januar 2007 Förderung durch Pfizer, Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen) 03.06.2009

Bisherige wissenschaftliche Veröffentlichungen:

1. The effects of triamcinolone crystals on retinal function in a model of isolated perfused vertebrate retina.

Exp Eye Res. 2008 Jul; 87(1):22-9. PMID: 18514644 (Lüke M, Januschowski K, Beutel J, Warga M, Grisanti S, Peters S, Schneider T, Lüke C, Bartz-Schmidt KU, Szurman P.)

2. Electrophysiological effects of Brilliant Blue G in the model of the isolated perfused vertebrate retina.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008 Jun; 246(6):817-22..
PMID: 18197412 (Lüke M, Januschowski K, Beutel J, Lüke C, Grisanti S, Peters S, Jaissle GB, Bartz-Schmidt KU, Szurman P.)

3. The retinal tolerance to bevacizumab in co-application with a recombinant tissue plasminogen activator.

Br J Ophthalmol. 2007 Aug;91(8):1077-82. PMID: 17383998 (Lüke M, Januschowski K, Warga M, Beutel J, Leitritz M, Gelisken F, Grisanti S, Schneider T, Lüke C, Bartz-Schmidt KU, Szurman P; for the Tuebingen Bevacizumab Study Group.)

