

Untersuchung der Biokompatibilität von Voriconazol
(Vfend[®]) auf humane korneale Epithelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gürel, Gülhan

2015

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. E. Yörük

2. Berichterstatter:

Professor Dr. F. Lang

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Das Schönste am Menschen ist sein Auge. Es empfängt den Quell des Lebens, das Licht, und gibt es wieder zurück als Strahl der Dankbarkeit. Die Sonne schuf das Menschaugenauge, um sich selbst und ihre Schönheit darin zu bewundern. Das Weltall glüht in unseren Augen und es verglimmt in unseren Tränen.

Carl Ludwig Schleich

Inhaltsverzeichnis

1.) Einleitung	1
1.1) Keratitis	1
1.2) Mykotische Keratitis	2
1.3.) Voriconazol (Vfend®)	6
1.3.1.) Pharmakokinetik	7
1.3.2.) Unerwünschte Wirkungen	8
1.3.3.) Interaktionen	9
1.3.4.) Dosierung und Verabreichung	9
1.4.) Sulfobutylether Cyclodextrin(SBECD)	10
1.5.) Zielvorstellung und Hinführung zum Thema	12
2.) Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1.) Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2.) Reagenzien	15
2.1.3.) Geräte	16
2.2.) Methoden	17
2.2.1.) Gewinnung von menschlichen Hornhautepithelzellen	17
2.2.2.) Subkultivierung/Passagieren der Zellen	17
2.2.3.) Zellzahlbestimmung	19
2.2.4.) Aussäen der Zellen	20
2.2.5.) Herstellung der Konzentrationsreihen	22
2.2.6.) MTT-Test	23
2.2.7.) Life-Dead-Test in Kombination mit der 4'6-diamido-2 phenylindol-Färbung (DAPI)	26
2.2.8.) Phasenkontrastmikroskopie	30
2.2.9.) Statistische Analyse	31
3.) Ergebnisse	32
3.1.) MTT-Assay	32
3.2.) Live-Dead-DAPI-Färbung	34
3.3.) Phasenkontrastmikroskopie	37
4.) Diskussion	39
4.1.) Vorbemerkung	39
4.2.) Klinische Erfahrungen und Experimentelle Untersuchungen von Voriconazol	41
4.2.1.) Studien an Tieren	41
4.2.2.) Studien an Patienten ohne Pilzkeratitis	42
4.2.3.) Fallberichte an Patienten mit Pilzkeratitis	43

4.2.4.) Studien an Patienten mit Pilzkeratitis	45
4.2.5.) Studien an Zellkulturen	47
4.3.) Schlussfolgerung	49
5.) Zusammenfassung	51
6.) Literaturverzeichnis	53
7.) Erklärungen zum Eigenanteil	62
8.) Danksagung	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zentrales-Ringinfiltrat, Hypopyon (Meyer, 2006)	3
Abbildung 2: Strukturformel von Voriconazol (Henkel, 2010)	6
Abbildung 3: Skizze einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Costar®)	21
Abbildung4: MTT-Stoffwechsel (Lindl, 2002).	24
Abbildung 5: Ablaufschema MTT-Test	25
Abbildung6: Ablaufschema Live/Dead/DAPI Färbung	29
Abbildung7: Diagramm, MTT-Test, Voriconazol	33
Abbildung8: Diagramm, MTT-Test, SBECD	33
Abbildung 9: Bilder der Live/Dead/DAPI Färbung, Voriconazol	35
Abbildung 10, Bilder der Live/Dead/DAPI Färbung, SBECD	36
Abbildung 11: Bilder der Phasenkontrastmikroskopie, Voriconazol/SBECD	37

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
CD	Cyclodextrin
CGT-ase	Cyclodextrin-Glucosyl-Transferase
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Dpt	Dioptrien
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elisa	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EthD-1	Ethidium homodimer -1
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
h	Stunde
HCEC	Human Corneal Epithelial Cells
Kap.	Kapitel
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium Bromide
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Lösung (phosphate buffered solution)
PFA	Paraformaldehyd
Pg	Picogramm
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SBECD	Sulfobutylether Cyclodextrin
spp.	Plural für Spezies
U	Enzymeinheit

1.) Einleitung

1.1) Keratitis

Die Keratitis ist eine durch Erreger ausgelöste oder immunologisch bedingte Hornhautentzündung. Etwa 90 % der Keratitiden sind durch Adenovirusinfektionen bedingt, gefolgt von Herpes simplex Virus, Enterovirus und Bakterien. Daneben kommen Pilze und Parasiten sehr selten als Auslöser infrage. Risikofaktoren sind Trauma, Kontaktlinsentragen, Hornhautchirurgie, Xerophthalmie, Blepharitis, Entropium, Trichiasis, Ektropium, Immundefektsyndrome, Diabetes mellitus und HIV [Pleyer, 2014].

Durch die Entzündung können erhebliche Schmerzen auftreten. Weitere Symptome sind gerötete, tränende Augen, Fremdkörpergefühl, Photophobie und Verschlechterung der Sehschärfe.

Die Keratitis kann je nach Ursache unterschiedlich verlaufen. Es können eine oder mehrere Schichten der Hornhaut entzündet sein. Die Entzündung kann sich auf die Oberfläche der Hornhaut (Epithel) beschränken und/oder die darunterliegende Schicht der Hornhaut (Stroma) betreffen. Wird die innerste Schicht (Endothel) befallen, kann die Hornhaut aufquellen. Bei schweren Verläufen mit tiefem Hornhautulcus, der bis zur Descemet-Membran reicht, besteht die Gefahr der Perforation [Sachsenweger, 2002]. Daher können schwere Entzündungen im Auge zu problematischen und bleibenden Augenschädigungen bis hin zur Erblindung führen [Thews *et al.*, 1999; Sachsenweger, 2002]. Um Folgeschäden am Auge zu vermeiden, ist es nötig, eine richtige Therapie einzusetzen. Die Therapie der Hornhautentzündung richtet sich nach der Ursache der Entzündung [Sachsenweger, 2002].

1.2) Mykotische Keratitis

Die mykotische Keratitis ist eine durch Pilze hervorgerufene Entzündung der Hornhaut und stellt eine bedrohliche Erkrankung für das Auge dar. Dabei sind die ubiquitär vorkommenden Hefe- und Schimmelpilze klinisch relevant. Sie kommt in unseren Breiten im Vergleich zu feucht-warmen Klimazonen wie in Indien oder Florida seltener vor. Sie wird meistens zu spät erkannt und ist zudem schwierig zu behandeln. In Bereichen der Landwirtschaft und Gartenarbeit kommt sie nach einer penetrierenden oder perforierenden Verletzung mit organischem Material wie Erde, Schlamm, Abwasser, Pflanzenbestandteilen, sowie Holzsplitter vor. Zu den Hauptrisikofaktoren der Pilzkeratitis zählen Kontaktlinsen. Kontaminierte Kontaktlinsen sind meist die Folge einer unzureichenden Kontaktlinsenpflege, aber auch einer falschen Handhabung der Desinfektion oder der Verwendung selbst hergestellter Flüssigkeiten, sie können eine Pilzkeratitis auslösen. Weitere disponierende Faktoren sind vorbestehende Augenerkrankungen, lange Behandlungen mit Kortikosteroiden oder Antibiotika, sowie systemische Erkrankungen mit reduzierter Immunabwehr [Behrens-Baumann, 2009; Haller-Schober, 2010].

Klinik:

Die Entzündung entwickelt sich langsam und die klinischen Zeichen sind oft unspezifisch. Dadurch kann die Diagnosestellung zu spät erfolgen.

Anders als bei der bakteriellen Keratitis, wo sich recht schnell breite Epitheldefekte mit nachfolgender Kraterbildung entwickeln, ist anfangs bei der mykotischen Keratitis das Epithel noch intakt. In der Hornhaut finden sich landkartenartige, weißliche Infiltrate und Satellitenherde. Die Infiltrate werden mit der Pilzvermehrung dichter und größer. Sie sind durch die auswachsenden Hyphen unscharf begrenzt. Im Weiteren entwickelt sich in einem fortgeschrittenen Stadium ein Ulkus [Haller-Schober, 2010].

Weil Pilze in die Hornhauttiefe wachsen können, besteht die Gefahr, dass sie in die Augenkammer gelangen und das Augennere infizieren. Das pyramidenförmige zähe Hypopyon, welches aus Pilzhyphen, Fibrin und Leukozyten besteht, ist ein typisches Zeichen im späten Stadium. In Abbildung (Abb.) 1 ist ein Hypopyon abgebildet [Behrens-Baumann, 2009].

Fadenpilze wie *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. und *Acremonium* spp. sowie in Einzelfällen *Scedosporium apiospermum* und *Paecilomyces lilacinus* können eine mykotische Keratitis verursachen. Häufig kommen aber auch Hefepilze der Gattung *Candida* spp. als Auslöser in Betracht [Behrens-Baumann, 2009; Haller-Schober, 2010].



Abb. 1

Zentrales Infiltrat-Ringinfiltrat, Hypopyon

[Mykotische Infektion der Kornea, P. Meyer, Universitäts-Augenklinik Basel, 2006]

Diagnostik:

Um Pilze nachweisen zu können, werden Kulturen angelegt und Präparate des Infiltrates nach Gram oder PAS-Reaktion gefärbt und mikroskopisch untersucht. Bei den Kontaktlinsenträgern werden zusätzlich auch der Behälter und die Linsen einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen. Anhand der Färbepreparate lässt sich meist schon eine grobe Differenzierung zwischen Hefe- und Schimmelpilzen durchführen. Entscheidend für den Therapieerfolg sind jedoch die Ergebnisse von Kultur und Antimykogramm [Behrens-Baumann, 2009; Haller-Schober, 2010].

Therapie:

Zur Bekämpfung der Pilzinfektion werden Antimykotika verwendet, die aus entsprechenden Infusionslösungen hergestellt werden. Zu den wichtigsten Antimykotika gehören Polyene wie Natamycin und Amphotericin B, Azole wie Posaconazol, Voriconazol und Fluconazol sowie Echinocandine wie Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin [Al-Badriyeh *et al.*, 2010]. Aufgrund der Resistenzentwicklung sind ältere Azole, wie Clotrimazol, Miconazol, Ketoconazol oder Itraconazol kaum noch im Einsatz. Momentan wird als das Mittel der 1. Wahl Voriconazol eingesetzt [Behrens-Baumann, 2009].

Antimykotika wirken auf die Zellmembran oder auf die darüber liegende Zellwand ein [Fridkin and Jarvis, 1996; Imhof *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2005].

Die Behandlung der Infektion erfolgt lokal durch häufige Gabe von antimykotischen Augentropfen. Während der ersten 48 Stunden sollten die Augentropfen halbstündlich oder stündlich verabreicht werden. Damit die Tropfen auch in tiefere Schichten eindringen können, wird ein geschlossenes Hornhautepithel mittels Abrasio corneae (Kürettage) entfernt. Durch die topische Applikation von Amphotericin B werden zwar lokal hohe Konzentrationen erreicht, doch wegen des großen Molekulargewichts der

Medikamente ist die Eindringtiefe begrenzt. Deswegen sind das Offenhalten des Epithels und die häufige Gabe unerlässlich [Behrens-Baumann, 2009, Haller-Schober, 2010]. Allerdings kann Voriconazol aufgrund seines geringen Molekulargewichtes, nach lokaler Applikation auch ohne Abrasio corneae die erforderlichen Kammerwasserspiegel erreichen [Haller-Schober, 2010]

Vier bis sechs Wochen kann die Therapie der Mykose dauern, sie kann sich aber auch Monate hinziehen. Ein langwieriger Verlauf einer Keratomykose kann oft zu erheblichen Neovaskularisationen der Hornhaut führen. Sie kann damit eine optische Rehabilitation auch mittels einer Keratoplastik erschweren bzw. sogar unmöglich machen. Um die Entzündungsreaktion abzuschwächen oder vollständig zu verhindern werden Steroide eingesetzt. Bei der Kombinationstherapie mit Steroiden sollte die Steroiddosis nicht hoch gewählt werden und erst 9 Tage nach der Infektion zum Einsatz kommen, so dass es nicht zu einer vermehrten Pilzausbreitung kommt [Behrens-Baumann W., 2009; Haller-Schober, 2010].

Wissenschaftler untersuchen derzeit, ob die Kombination verschiedener Antimykotika zur besseren Therapiemöglichkeit bei der Behandlung von invasiven Pilzinfektionen beisteuern kann. Antimykotika-Kombinationen beinhalten eine Reihe von Vor- und Nachteilen. Sie können durch unterschiedliche Angriffspunkte zu einer Steigerung und Beschleunigung der Aktivität, sowie zu einer Vergrößerung des Wirkspektrums führen. Andererseits können sie durch eine antagonistische Wirkungsweise wiederum die Effektivität vermindern. Durch die Kombination entstehen des Weiteren auch höhere Kosten [Behrens-Baumann, 2009].

Je nach Bedarf können Antimykotika auch unter die Bindehaut bzw. in die Vorderkammer appliziert werden. Bei einem Verdacht auf eine intraokulare Beteiligung wird das Antimykotikum zusätzlich systemisch intravenös oder oral verabreicht. Im Falle einer Therapieresistenz oder bei einer Narbenbildung wird

eine Hornhauttransplantation durchgeführt [Behrens-Baumann 2009; Haller-Schober, 2010].

1.3.) Voriconazol (Vfend®)

Voriconazol ist eine Triazol-Verbindung, die von Fluconazol abgeleitet ist. Sie wirkt fungistatisch, indem sie die zytochromabhängige 14 α -Sterol-Demethylase hemmt [Leveque, 2006], die bei der Umwandlung von Lanosterol zu Ergosterol beteiligt ist. So hemmt sie die Biosynthese von Ergosterol. Dadurch kommt es zu einem Anstieg an toxischen Sterolen und zu einem Mangel an Ergosterol, welches die Pilze für den Aufbau ihrer Zellmembran benötigen. Voriconazol wirkt zudem fungizid. Es lagert sich in die Zytoplasmamembran der Pilze ein und zerstört ihre Struktur, so dass Zellbestandteile austreten können. In der folgenden Abbildung ist die Strukturformel von Voriconazol dargestellt (Abb. 2).

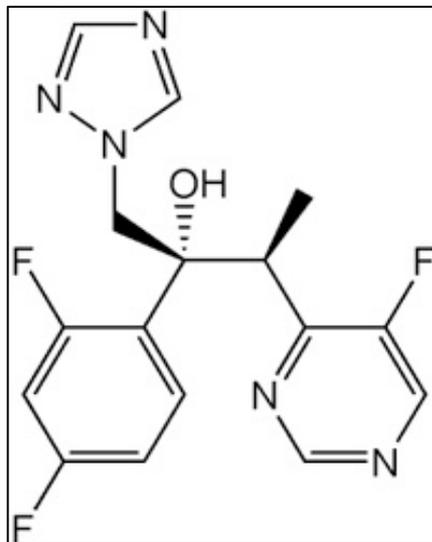


Abb. 2

Strukturformel von Voriconazol [Henkel J., Dissertation. 2010]

In-vitro weist Voriconazol eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber *Aspergillen*, *Candida* [Herbrecht, 2005], *Kryptokokken*, *Blastomyces*, *Histoplasmen* sowie *Fusarium* Arten und *Scedosporium apiospermum* auf [Jeu, 2003].

Voriconazol ist seit März 2002 in Deutschland zugelassen. Das Medikament ist hierbei zur Behandlung von Erwachsenen und Kindern über zwei Jahren mit invasiven *Aspergillose*n, schweren *Scedosporium*- und *Fusarium*-Infekten sowie Fluconazol-resistenten *Candida* Infektionen gestattet. Voriconazol kann auch in der First-Line-Therapie von Candidämien bei nicht neutropenischen Patienten eingesetzt werden [Masche, 2004; Al-Badriyeh 2010; European Medicines Agency, 2012].

1.3.1.) Pharmakokinetik

Die Applikation von Voriconazol kann oral oder intravenös erfolgen. Innerhalb ein bis zwei Stunden nach der oralen Verabreichung können maximale Plasmaspiegel erreicht werden. Voriconazol besitzt mit 96 % eine hohe biologische Verfügbarkeit. Unabhängig vom pH-Wert erfolgt die Resorption. Fettreiche Nahrungsmittel können jedoch die Resorption bis zu einem Drittel abschwächen. Der Abbau erfolgt in der Leber vorwiegend durch die Cytochrom P450 Isoenzyme CYP2C19 und in geringen Maßen über CYP3A4 und CYP2C9 [Masche, 2004]. Das CYP2C19 Isoenzym zeichnet sich durch einen genetischen Polymorphismus aus. Durch diese Polymorphismen kommt es zu individuellen Unterschieden in der Pharmakokinetik von Voriconazol. Bei 20 % der asiatischen Bevölkerung und 2 % der Kaukasier kann dieses Isoenzym homozygot fehlen. Daher können bei diesen Personen höhere Plasmakonzentrationen und in Folge dessen mehr Nebenwirkungen und unerwünschte Interaktionen auftreten [Scholz, 2009].

Voriconazol hat einen sättigbaren Metabolismus, so dass eine Dosiserhöhung zu einem nichtlinearen, überproportionalen Anstieg der Plasmakonzentration führt. Voriconazol hat eine dosisabhängige Halbwertszeit von 6-12 Stunden.

Die renale Clearance stellt bei der Elimination von Voriconazol einen zu vernachlässigenden Anteil an der Gesamtelimination dar, so dass durch eine Nierenfunktionsstörung die Pharmakokinetik von Voriconazol nicht beeinflusst wird. Bei der intravenösen Applikationsform kann es jedoch zu einer Akkumulation des Lösungsvermittlers Sulfobutylether-cyclodextrin (SBECD) kommen [Jeu, 2003; Masche, 2004; European Medicines Agency, 2012].

1.3.2.) Unerwünschte Wirkungen

Die möglichen unerwünschten Effekte von Voriconazol betreffen vor allem drei Bereiche, nämlich erhöhte Leberfunktionswerte, Hautreaktionen und Sehstörungen. All diese Nebenwirkungen sind in der Regel reversibel.

Bei der Behandlung mit Voriconazol traten bei etwa 20-30 % der Patienten vorübergehende Sehstörungen wie verschwommenes Sehen, verändertes Farbsehen oder eine Photophobie auf. Diese Sehstörungen treten in der Regel 30 Minuten nach Applikation auf und verschwinden nach weiteren 30 Minuten wieder. Ihre Häufigkeit nimmt aber im Laufe der Therapie ab. Hautnebenwirkungen wie Ausschlag oder Photosensibilisierung können häufig auftreten. Periphere Ödeme, Magenschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöe, Pyrexie, Kopfschmerzen sowie Leberenzym- und Bilirubinerhöhungen kommen sehr häufig vor. Selten können schwere Hautreaktionen wie Stevens-Johnson-Syndrom, toxische epidermale Nekrolyse, Cheilitis oder Erythema multiforme auftreten. In wenigen Fällen können nach intravenöser Verabreichung anaphylaktoide Reaktionen vorkommen [Masche, 2004; Pfizer Gebrauchsinformation 2010; European Medicines Agency, 2010].

Verglichen mit dem Amphotericin B sind die Nebenwirkungen von Voriconazol zu vernachlässigen. Es besitzt keine Nephrotoxizität und ist damit auch dem liposomalen Amphotericin B deutlich überlegen [Espinell-Ingroff *et al.*, 2008].

1.3.3.) Interaktionen

Eine Vielzahl von Medikamenten interagiert über Cytochrom P450 mit dem Abbau von Voriconazol. Sie können durch Inhibierung oder Induktion die Konzentration des Wirkstoffes relevant beeinträchtigen.

Eine starke Abnahme verursachen Cytochrom-Induktoren wie das Antibiotikum Rifampicin und Antiepileptika. Voriconazol und seine Hauptmetabolite hemmen die Cytochrome CYP2C19, CYP2C9 und CYP3A4 und können so die Plasmaspiegel von Substanzen, die über diese Zytochrome abgebaut werden, stark erhöhen. Dies betrifft Immunsuppressiva, Ciclosporine, orale Antikoagulantien, Sulfonylharnstoffe, Benzodiazepine und einzelne Statine [Jeu *et al.*, 2003; Purkins *et al.*, 2003; Masche, 2004].

1.3.4.) Dosierung und Verabreichung

Voriconazol (Vfend[®]) ist als Lyophilisat zur Infusionsherstellung (200 mg pro Fläschchen) und als Tabletten zu 50 und 200 mg erhältlich. In den kleinen Packungsgrößen ist Vfend[®] kassenzulässig [Masche, 2004].

Am ersten Behandlungstag soll eine Dosis von 2-mal 6 mg/kg intravenös oder 400 mg oral gegeben werden. Nach 24 Stunden kann die Dosis auf zweimal täglich 4 mg/kg bzw. auf 200 bis 300 mg oral reduziert werden. Bei Personen unter 40 kg halbiert sich die orale Dosis. Die Erhaltungsdosis wird bei einer verminderten Leberfunktion um die Hälfte reduziert. Bei einer Niereninsuffizienz sollte die orale Gabe von Voriconazol bevorzugt werden, da es in dieser Form kein Sulfobutylether-cyclodextrin (SBECD) enthält. Um eine mögliche Phototoxizität zu vermeiden sollten die Patienten, auf einen ausreichenden Sonnenschutz achten [Masche, 2004].

Teratogene Wirkungen waren in Tierversuchen zu erkennen. Daher ist Voriconazol in der Schwangerschaft zu vermeiden. In der Stillzeit und bei Kindern unter zwei Jahren ist die Anwendung nicht geprüft [Masche, 2004].

Vfend® darf bei Patienten, die allergisch gegen Voriconazol oder andere sonstigen Bestandteile sind, nicht angewendet werden. Auch Patienten, die Terfenadin, Cisaprid, Pimozid, Chinidin, Rifampicin, Carbamazepin, Phenobarbital, Ritonavir, Sirolimus, Johanniskraut und hochdosiertes Efavirenz nehmen, dürfen Vfend® nicht verwenden, da diese Medikamente mit Voriconazol interagieren und so die Wirkung von Voriconazol negativ beeinflussen können [Pfizer Gebrauchsinformation 2010; European Medicin Agency, 2012].

1.4.) Sulfobutylether Cyclodextrin (SBECD)

SBECD ist ein Cyclodextrin (CD) mit sieben Glucoseeinheiten. Sie ist in dem Medikament Vfend® als Zusatzstoff mit enthalten.

Cyclodextrine sind Glucose-Ringe, die lipophile Stoffe in ihrem Inneren einschließen können. Die Cyclodextrine sind α -1-4 verknüpfte Glucoseeinheiten, die einen Hohlraum im Inneren bilden. Darin können sie labile Moleküle einschließen und sie so stabilisieren oder destabilisieren. Der Hohlraum der Cyclodextrine ist sehr unpolar, die Außenfläche dagegen besitzt eine ausgeprägte Polarität. Dadurch können sie die Löslichkeit der lipophilen Substanzen deutlich verbessern [Klein und Zöller, 2008].

Cyclodextrine werden in Arzneimitteln eingesetzt um Reizungen von physiologischen Barrieren, wie zum Beispiel der Netzhaut des Auges, zu vermindern oder zu vermeiden. Durch den Einsatz von Cyclodextrinen werden die Stoffe weniger empfindlich gegenüber Licht, Hitze, Sauerstoff und Luftfeuchtigkeit, sie dienen als Stabilisatoren und erhöhen somit die Haltbarkeit. Zudem verbessern sie die Löslichkeit schwer löslicher Arzneistoffe und führen so zu einer besseren Bioverfügbarkeit [Brewster and Loftsson, 2007; Klein und Zöller, 2008].

Die Cyclodextrine werden mithilfe von bakteriellen Enzymen durch den Abbau von Stärke hergestellt. Da die natürlichen Cyclodextrine nur eine begrenzte lösungsvermittelnde Eigenschaft besitzen, wurden deshalb Derivate hergestellt, die eine bessere Wasserlöslichkeit bewirken können [Klein und Zöller, 2008].

Für die Augentropfen werden hauptsächlich nur die gut löslichen CD-Derivate eingesetzt, wie zum Beispiel das SBECD [Klein und Zöller, 2008].

Aufgrund der hohen Molmasse und der Hydrophilie bleiben die Cyclodextrine nach der Applikation in der Tränenflüssigkeit. So können sie die schlecht löslichen Arzneistoffe in Lösung halten bis sie ihn an der Hornhaut aus ihrem Hohlraum entlassen können. Dann kann der Arzneistoff in das lipophile Hornhautepithel eindringen [Klein und Zöller, 2008].

Cyclodextrine besitzen aber auch negative Effekte am Auge. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sie sich in die Hornhaut einlagern oder diese durch Herauslösen von Cholesterin und Phospholipiden schädigen. Auch starke Interaktionen mit Konservierungsstoffen wurden nachgewiesen [Rajewski, 1996; Klein und Zöller, 2008].

Mittlerweile konnten diese negativen Effekte durch Anpassung der Konzentrationsverhältnisse von Arzneistoff, CD und der weiteren Hilfsstoffe weitgehend ausgeschlossen werden [Klein und Zöller, 2008]. Dennoch sind weitere intensive Studien zur Sicherheit der CD-Derivate notwendig um eine gefahrlose lokale Behandlung mit Cyclodextrinen am Auge zu gewährleisten [Klein und Zöller, 2008].

1.5.) Zielvorstellung und Hinführung zum Thema

Bei der systemischen Applikation von Medikamenten ist eine höhere Dosis erforderlich, um die Blut-Netzhaut- und Blut-Kammerwasser-Schranke zu überwinden. Dadurch erhöht sich die Gefahr von möglichen systemischen Nebenwirkungen.

Durch lokale Applikation von Medikamenten wird versucht, die denkbaren systemischen Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten. So können maximal mögliche Konzentrationen in den gewünschten Bereichen erreicht werden, ohne den Organismus dabei groß zu belasten. Der Leberstoffwechsel kann so übergangen werden, und das betroffene Gebiet/Organ kann lokal besser und schneller erreicht werden als bei der systemischen Gabe. Außerdem ist die Applikation als Augentropfen einfach und meistens schmerzlos für die Patienten [Al-Badriyeh *et al.*, 2010]. Voriconazol Augentropfen werden aus der Injektionslösung hergestellt.

Die derzeit auf dem Markt zur Verfügung stehenden Antimykotika wurden primär für die systemische Applikationsform entwickelt und sind nur dafür zugelassen. Natamycin ist das einzige Antimykotikum auf dem deutschen Markt, das für die lokale Applikation zugelassen ist. Es war wegen der geringen 1 %-igen Konzentration am Tiermodell nicht wirksam [Al-Badriyeh *et al.*, 2010]. Obwohl Voriconazol nur für die systemische Behandlungsweise zugelassen ist, wird sie trotzdem Off-Label als Augentropfen am Patienten verwendet [Al-Badriyeh *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011].

Die topische Therapie birgt dennoch die Gefahr einer hohen lokalen Wirkstoffkonzentration mit der Möglichkeit der potentiellen Schädigung [Forbes, 2000; Bertelmann *et al.*, 2003; Burstein und Anderson, 1985; Hopkins und Pearson, 2007; Yörük, 2009]. Aus diesem Grund sind die Klärung der Biokompatibilität und die Ermittlung der Toxizitätsgrenze von Voriconazol

unerlässlich und von hoher Wichtigkeit, um sowohl dem Patienten als auch dem behandelnden Arzt mehr Sicherheit zu geben.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Klärung der möglichen Toxizität von Voriconazol (Vfend[®]) und seines Trägerstoffs SBECD. Es gingen bereits verlässliche Untersuchungen zur Wirksamkeit und Toxizität von Voriconazol und SBECD voraus. Nach derzeitigem Wissensstand gibt es aber noch keine Bestimmung der Toxizitätsgrenze von Voriconazol an primären humanen kornealen Epithelzellen. Diese Zellen werden daher in der vorliegenden Arbeit in den Versuchen eingesetzt.

2.) Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1.) Verbrauchsmaterialien

- ◆ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT), Sigma # 5655 (Sigma, Deutschland, Steinheim)
- ◆ 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Invitrogen # D1306 (Gibco, Invitrogen, Deutschland, Karlsruhe)
- ◆ Absolutes Ethanol, Merck # UN 1170 (Merck, Deutschland, Darmstadt)
- ◆ Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (D-MEM/F12), GIBCO # 31885-023 (Gibco, Invitrogen, Deutschland, Karlsruhe)
- ◆ D-PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}), GIBCO # 14190-094 (Gibco, Invitrogen, Deutschland, Karlsruhe)
- ◆ Dinatriumphosphat-Dihydrat, Merck, # A414386 (Merck, Deutschland, Darmstadt)
- ◆ Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, # 102950 (Merck, Deutschland, Darmstadt)
- ◆ Essigsäure (100 %), Merck, # 100063 (Merck, Deutschland, Darmstadt)
- ◆ Fetales Kälberserum (FCS), GIBCO, # 10270-106 (Gibco, Invitrogen, Deutschland, Karlsruhe)
- ◆ Paraformaldehyd (4 %, PFA in PBS), Merck # 104005 (Merck, Deutschland, Darmstadt)
- ◆ Penicillin/ Streptomycin, GIBCO # 15070-063 (Gibco, Invitrogen, Deutschland, Karlsruhe)
- ◆ Propidium Iodide, Sigma # (Sigma, Deutschland, Steinheim)
- ◆ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Serva, # 20783 (Serva Feinbiochemica GmbH, Deutschland, Heidelberg)
- ◆ Trypsin/ EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA), GIBCO, # 25200-720 (Gibco, Invitrogen, Deutschland, Karlsruhe)

- ◆ Viability/ Cytotoxicity Kit (EthD-1, Calcein AM,PBS), Invitrogen, # 41599A, L3224353495 (Gibco, Invitrogen, Deutschland, Karlsruhe)

Vfend[®] und SBECD

Voriconazol (Vfend[®]) und SBECD wurde von der Firma Pfizer (Vfend[®], Pfizer Inc. New York NY) bezogen. Voriconazol wurde als reine Pulverform verwendet und in einer Konzentration von 10 mg/ml (1 %) mit sterilem Wasser hergestellt. Die Verdünnung erfolgte mit Medium.

Humane korneale Epithelzellen

Bei den verwendeten humanen kornealen Epithelzellen handelte es sich um primäre Zelllinien. Die Epithelzellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Efdal Yörük, von der Hornhautbank Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Primärkulturen der kornealen Epithelzellen wurden von den Hornhäuten mehrerer Hornhautspender (nach Einverständnis durch die Angehörigen) gewonnen. Die Verwendung des menschlichen Materials erfolgte gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Universitätsklinik Tübingen.

2.1.2.)Reagenzien

- ◆ 12, 24 u. 96 Well Platten, Costar# CL S3997-50EA (Sigma-Aldrich, USA, Missouri)
- ◆ Deckgläser (Æ 13 mm), Menzel, # 4714884 (Menzel, Deutschland, Braunschweig)
- ◆ Deckgläser (Æ 18 mm), Menzel, # 9161062, CB00180RA1(Menzel, Deutschland, Braunschweig)

- ◆ Millex GS 0,22 µm und 0,45 µm Sterilfilter, Millipore, Billerica, MA, # SLGSO33SS (Millipore Corporation, USA, Billerica)
- ◆ Petrischale, (Greiner bio-one, Deutschland, Frickenhausen)
- ◆ PP-Test tubes=Plastikröhrchen (15 ml, steril), Greiner bio-one, Cat. No.# 188271 (Greiner bio-one, Deutschland, Frickenhausen)
- ◆ Pippettenspitzen (20 µl, 100 µl, 1000 µl), (Greiner bio-one, Deutschland, Frickenhausen)
- ◆ Skalpell, Aesculap Division (Aesculap AG, Deutschland, Tuttlingen)
- ◆ Spritzen (10 ml, 20 ml) (Greiner bio-one, Deutschland, Frickenhausen)
- ◆ Zellkulturflaschen Cellstar (Greiner bio-one, Deutschland, Frickenhausen)

2.1.3.) Geräte

- ◆ ELISA-Reader, SLT 400 ATX
- ◆ Magnetrührer, Heidolph; Reax 1R
- ◆ Zeiss Axiovert 135
- ◆ Zeiss Axioplan 2
- ◆ Multikanalpipetten, Eppendorf
- ◆ Neubauer-Zählkammer, Neubauer - Assistent
- ◆ Pipetten, Eppendorf
- ◆ Schüttelmaschine für die Mikrotiterplatten, CAT SH 26
- ◆ Waage, Sartorius LA 120 S
- ◆ Wasserbad, GFL
- ◆ Zellkulturschrank/ CO₂-Inkubator, Heraeus (Thermo Elektron Corporation)
- ◆ Zentrifuge, Heraeus Biofuge fresco
- ◆ Kühlschrank
- ◆ Autoklavierbare Dispenser
- ◆ Halbautomatische Absaugsysteme
- ◆ Lammer-Air Flow Werkbank

2.2.) Methoden

2.2.1.) Gewinnung von menschlichen Hornhautepithelzellen

Die Isolierung und Kultivierung der Zellen erfolgte unter der Werkbank. Zu Kultivierung von kornealen Epithelzellen wurden Biopsate mit einer Stanze vom Limbus corneae gewonnen und mit 3 mg/ml Dispase II für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend mit 0,25 % Trypsin/EDTA behandelt und für 15 Minuten in einer Petrischale bei 37 °C weiter inkubiert.

Nach den 15 Minuten wurde mit Kulturmedium überschichtet. In einem Inkubator wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen gezüchtet und kultiviert. Dreimal pro Woche wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Etwa eine Woche später wuchsen aus diesen Explantaten die Epithelzellen heraus.

2.2.2.) Subkultivierung/Passagieren der Zellen

Adhärenente Kulturen müssen zuvor enzymatisch und mechanisch von der Unterlage abgelöst werden bevor die gewünschte Zellzahl eingestellt und die Zellen in ein neues Zellkulturgefäß überführt werden können.

In der Regel werden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70-80 % passagiert, da sonst bei steigender Zellzahl sowohl das Nährstoffangebot als auch der pH-Wert des Mediums sinkt und so eine ungünstige Bedingung entsteht.

Wenn die Kultur über den Punkt der Konfluenz hinaus kultiviert wurde, konnten vereinzelt Zellcluster beobachtet werden. Solche Zellcluster sind ein Anzeichen für ein baldiges Absterben der gesamten Kultur, da es zu einer Kontaktinhibition durch die Epithelzellen kommt. Dies kommt deswegen zu Stande, weil der Platz für eine Zellvermehrung fehlt [Lindl, 2002; Schmitz, 2011].

Unmittelbar vor Erreichen der vollständigen Konfluenz wurden die Zellen zur Subkultivierung mit PBS-Puffer gewaschen. Da das Aktivitätsoptimum vom PBS und Trypsin bei 37 °C liegt, wurden sie zuvor kurz vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Dabei wurde zuerst das alte Medium ohne den Zellrasen zu berühren abgesaugt. Anschließend erfolgte das Waschen des Zellrasens mit etwa 10 ml der vorgewärmten PBS-Lösung. Dabei wird PBS nicht direkt auf die Zellen gegeben, sondern auf den Flaschendeckel. Danach wurde das PBS geschwenkt und abgesaugt.

Als nächstes wurde zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden 1 ml Trypsin/EDTA direkt auf die Zellen gegeben und durch Schwenken am Flaschenboden verteilt. Anschließend wurde das Ganze für 2-3 min bei 37 °C in den Brutschrank gestellt.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Flasche herausgenommen und durch kräftiges schwenken, und zusätzliches Klopfen an der Flasche wurden die Zellen vom Boden gelöst. Das Ablösen des Epithelzellrasens vom Boden der Kulturflasche konnte mit dem bloßen Auge betrachtet werden. Um dennoch zu kontrollieren, ob sich die Zellen auch vollständig vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde die Ablösung unter dem Mikroskop überprüft. Im Idealfall waren einzelne runde Zellen sichtbar, die frei im Medium flottierten.

Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 10 ml serumhaltigem Medium gestoppt. Durch behutsames Auf- und Abpipettieren und anschließender Filterung wurden mögliche Zellcluster beseitigt, diese würden sonst die Zelldichte negativ beeinflussen. Dabei musste ein Aufschäumen und Blasenbildung vermieden werden. Im Anschluss erfolgte die Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer [Lindl, 2002; Schmitz, 2011].

Für unsere Versuchsreife wurden die humanen kornealen Epithelzellen der dritten Passage verwendet. Daher wurden die nicht verwendete Zellsuspensionen zur Subkultivierung je nach Zellzahlkonzentration, als 1-2,5 ml Portionen in die Zellkulturflasche gegeben und bis zur 15 ml Marke mit Dulbecco's Modified Eagle's Kulturmedium/F12 aufgefüllt und im Brutschrank liegend bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt.

2.2.3.) Zellzahlbestimmung

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer erfolgte die Zellzahlbestimmung. Die Neubauer-Zählkammer ist eine Glasplatte mit den Maßen 3*8*5 cm. Sie besitzt quadratische Felder mit definierter Größe. Die Zellzahl pro Volumeneinheit errechnet sich durch die Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Zellen. Die Neubauerzählkammer besteht aus neun Großquadraten wobei jedes Großquadrat eine Fläche von 1 mm² hat. Bei einer Tiefe von 0,1 mm ergibt dies ein Volumen von 0,1 µl. Die Zählkammer wird durch ein plangeschliffenes, geeichtes Glasdeckgläschen abgedeckt [Lindl, 2002; Schmitz, 2011].

Zu Beginn wurde die Zählkammer und das dazugehörige Deckglas mit Ethanol gereinigt werden. Dann wurde das Deckglas durch Anhauchen befeuchtet und auf die Zählkammer gelegt. Wenn das Deckglas richtig angelegt ist werden Newton'sche Ringe, sogenannte Interferenzfarben sichtbar. Diese zeigen, dass die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt ist (0,1 mm).

Es folgte die Füllung der Zählkammer mit der Zellsuspension. Dafür wurde die Pipette jeweils an die beiden offenen Kanten der Zählkammer gesetzt und 20 µl der Zellsuspension wurden aufgetragen. Durch die Kapillarkräfte wurde die Suspension dann in den Zwischenraum zwischen Kammer und Deckglas gesaugt. Die Kammer darf dabei weder über- noch unterfüllt werden, da sonst Oberflächenspannungen das Volumen der Kammer verändern können.

Anschließend wurde die Zählkammer unter das Mikroskop gelegt und so lange bewegt, bis die Einteilungslinien der Kammer sichtbar wurden.

Nun mussten vier große Quadrate mit je 1 mm^2 ausgezählt und der Mittelwert errechnet werden. Dabei war es wichtig, dass die Zellen auf den Linien nicht zweimal gezählt wurden. Dieses Problem kann zum Teil dadurch behoben werden, dass nur die Zellen mitgezählt werden, die oben und links vom Betrachter auf den Linien liegen.

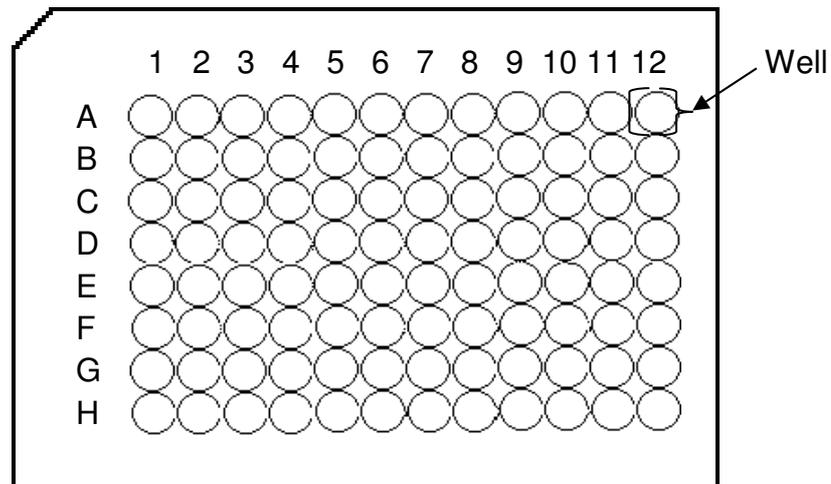
Um die Zellzahl zu berechnen wurde der Mittelwert aus den vier Großquadraten mit 10^4 multipliziert. Dies ergab die Zellkonzentration pro Millimeter. Das Volumen der Zellsuspension multipliziert mit der Zellzahl ergab dann die Gesamtzahl. Der Verdünnungsfaktor der Zellsuspension wurde dabei mitberücksichtigt.

Die gewünschte Zellzahl bei einer 96-Well-Platte ist $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml,
 $1 \cdot 10^4$ Zellen/Well, $100 \mu\text{l}/\text{Well}$

2.2.4.) Aussäen der Zellen

Nach der Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension in einen Urinbecher umgefüllt und mit Medium auf die gewünschte Zellzahl verdünnt. Diese Zellsuspension wurde dann auf die 96-Well-Mikrotiterplatten (Abb. 3) mit flachem Boden ausgesät. Dafür wurde mit der Pipette in jedes Well $100 \mu\text{l}$ dieser Suspension pipettiert.

Vor der Überführung der Zellsuspension in die 96-Well-Platte musste eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleistet werden. Die Durchmischung erfolgte durch das wiederholte Aufziehen der Zellsuspension mit der Pipette im Reservoir.

**Abb. 3**

Skizze einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Costar[®])

Die äußeren Wells der 96-Well-Platten, die einer größeren Verdunstung ausliefert waren, wurden mit 100 µl Kulturmedium befüllt. Dadurch wurde ein Austrocknen der äußeren Wells vermieden. Diese Platten (Abb. 3) wurden dann 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert und waren nun für die folgenden Versuche einsatzbereit.

2.2.5.) Herstellung der Konzentrationsreihen

Folgende Konzentrationsreihen wurden hergestellt:

1.) Voriconazol-Konzentrationen

2	mg/ml
1	mg/ml*
0,5	mg/ml
0,3	mg/ml*
0,1	mg/ml
0,05	mg/ml*
0,025	mg/ml
0,005	mg/ml
0,001	mg/ml*

2.) SBECD- Konzentrationen

32	mg/ml
16	mg/ml*
8	mg/ml
4,8	mg/ml*
1,6	mg/ml
0,8	mg/ml*
0,4	mg/ml
0,08	mg/ml
0,016	mg/ml*

Für die Live-Dead-DAPI Färbung und die Phasenkontrastmikroskopie wurden nur die mit Sternchen (*) markierten Konzentrationen verwendet.

Die Konzentrationsreihen wurden unmittelbar nach dem Aussäen der Zellen erstellt. Für die Herstellung der Verdünnungsreihen wurde Kulturmedium verwendet. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden diese in kleine verschließbare, sterile Röhrchen gefüllt und im Kühlschrank gelagert. Kurz vor der Durchführung der Tests wurden sie aus dem Kühlschrank geholt und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, bevor sie mittels Pipette auf die adhären Zellen in der Mikrotiterplatte gegeben wurden.

Je Well wurde 100 µl der entsprechenden Substanzkonzentration oder des Kontrollmediums zugegeben. Dabei wurden pro Substanzkonzentration und Kulturmedium jeweils 6 Wells gefüllt.

Es wurden jeweils zwei Platten mit Zellen ausgesät eine für die Voriconazol- und die andere für die SBECD-Konzentrationen. Für die Kontrolle wurden pro Platte jeweils 6 Wells mit je 100 µl Kulturmedium gefüllt. Die äußeren Wells der

Mikrotiterplatte wurden nicht mit Zellen ausgesät, sondern nur mit Medium versehen, um das Verdampfen des Volumens zu verhindern.

2.2.6.) MTT-Test

An dieser Stelle wird das in unseren Versuchen verwendete Verfahren, der MTT-Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen, vorgestellt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Vitalität einer Zelle zu bestimmen. Für unsere Zwecke war der MTT-Test besonders geeignet. Es kann vor allem einfach photometrisch bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Vitalität von Zellen wurde der MTT-Test nach T. Lindl durchgeführt [Lindl, 2002]. Mit dem MTT-Test wird die Aktivität von den mitochondrialen Dehydrogenasen in lebenden Zellen bestimmt, unabhängig davon ob diese zu diesem Zeitpunkt DNA synthetisieren oder nicht.

Für den MTT-Test wurden die zuvor vorbereiteten 96-Well-Mikrotiterplatten mit dem Zellmonolayer nach 24-stündiger Kultivierung aus dem Brutschrank geholt. Ohne den Zellrasen zu berühren wurde dann das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und durch 100 µl klare Arzneistofflösung Voriconazol oder SBEDD in verschiedenen Konzentrationen, die zuvor gevortext wurden, ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 22 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden 10 µl der MTT-Test Lösung Nr. 1 (5 mg MTT/ml PBS) in jedes Well hinzugegeben. Zuvor wurde die MTT 1 Lösung, im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Damit sich die MTT-Lösung in den Wells gleichmäßig verteilen kann, wurden die Platten vorsichtig geschüttelt.

Dann wurden die Platten wieder für zwei Stunden in den Brutschrank gelegt.

Die im Mitochondrium lokalisierten Dehydrogenasen von lebenden Zellen können Tetrazolium Salze reduzieren. Die schwach gelb gefärbte MTT-Lösung

Nr. 1, (3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) dringt in die Zellen ein, woraufhin die aktiven mitochondrialen Dehydrogenasen den Tetrazolium-Ring aufbrechen. Es entsteht als Reduktionsprodukt das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan. Für diese Reduktionsreaktion (siehe Abb. 4) werden funktionsfähige Mitochondrien benötigt. Intakte Mitochondrien befinden sich nur in lebenden Zellen, sie werden bereits kurz nach dem Absterben der Zelle inaktiviert [Mosmann, 1983].

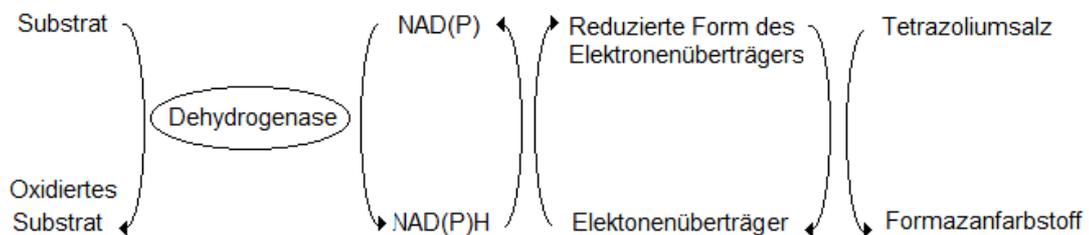


Abb. 4

MTT-Stoffwechsel, Reduktion des MTT-Reagenz in schwerlösliches Formazan-Salz (Modifiziert nach T. Lindl, 2002).

Nach Ablauf der Zeit wurde vorsichtig der Überstand abgesaugt und 80 µl der MTT-Test-Lösung Nr. 2 in jedes Well pipettiert. Dimethylsulfoxid (DMSO) und Sodiumdodecylsulfat (SDS) wurden hier zum Lysieren der Zellen eingesetzt, aber auch um das Formazan freizusetzen und es in dieser gelösten Form zu halten.

Nach einer fünfminütigen Ruhephase wurden die Platten vorsichtig erneut geschüttelt. Der nun entstandene Farbumschlag von gelb nach lila blau zeigte, dass Formazan entstanden war. Mit dem Elisa Reader wurde die Intensität der alkoholischen Formazan-Konzentration photometrisch bestimmt. Die Testwellenlänge war 570 nm und die Referenzwellenlänge 680 nm. Dabei ist die Intensität des Farbstoffs proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen. So kann relativ einfach die Vitalität der Zellen bestimmt werden, da die gemessene Absorption des Formazans ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Zelle liefert [Mosmann, 1983; Frank 2010]. In dem folgenden Schema (Abb. 5) unten wird zu Verdeutlichung kurz der Ablauf des MTT-Tests dargestellt.

Ablaufschema MTT-Test an Monolayer

Zellmonolayer im Medium

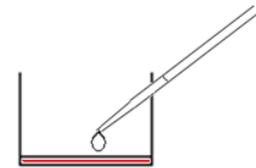
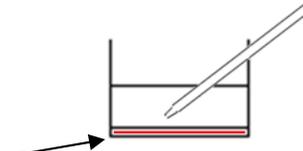


Medium absaugen

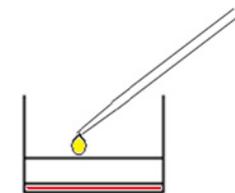


Epithelzellmonolayer
Zugabe von 100 μ l
der zu testenden Substanz
(verschiedene Konzentrationen
von Voriconazol/SBEC/Dein
als Kontrollsubstanz,
pro Konzentration 6 Wells)
Inkubation von 22 Stunden bei
37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte

Zellmonolayer



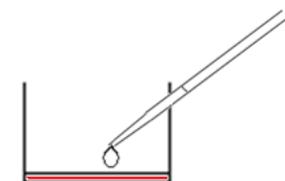
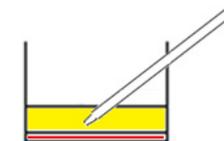
Zugabe von 10 μ l der
MTT-Test-Lösung Nr. 1
Inkubation von 2 Stunden bei
37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte



Lösung absaugen



Zugabe von 80 μ l der
MTT-Test-Lösung Nr. 2
Inkubation für 5 Minuten
bei Raumtemperatur,
anschließend leicht
schütteln



Photometrische Messung
mit dem ELISA-Reader bei
Testwellenlänge 570 nm
Referenzwellenlänge 680 nm



Abb. 5

Ablaufschema MTT-Test an Epithelzellmonolayer

2.2.7.) Life-Dead-Test in Kombination mit der 4'6-diamido-2-phenylindol-Färbung (DAPI)

Lebende und tote Zellen können unter Einsatz der Life-Dead-Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen differentiell dargestellt werden. Dieser Test soll das Ergebnis des MTT-Tests bestätigen und zeigen, ob und wie stark Voriconazol im Vergleich zur Kontrolle toxisch wirkt. Mittels des Life-Dead-Tests können unter dem Fluoreszenzmikroskop durch die Esterase-Aktivität und der Plasmamembran-Integrität der kornealen Epithelzellen, tote und lebende Zellen durch unterschiedliche Färbung sichtbar gemacht werden. Der Test wurde zu besserer Darstellung der Zellen mit einer anschließenden DAPI-Färbung der Zellkerne kombiniert durchgeführt.

Die intrazelluläre Esterase-Aktivität der lebenden Zellen kann durch enzymatische Umwandlung sichtbar gemacht werden. Dafür wird Calcein AM verwendet. Bei diesem Versuch wird nicht sichtbares und fluoreszierendes Calcein durch die intrazelluläre Esterase in ein grün fluoreszierendes, sichtbares Calcein umgewandelt.

Um die toten Zellen nachweisen zu können, wird Ethidium homodimer-1 (EthD-1) verwendet. Bei lebenden Zellen kann EthD-1 durch die intakte Zellmembran nicht eindringen. Aufgrund der zerstörten Zellmembran kann EthD-1 in die toten Zellen eindringen und sich dort an Nukleinsäuren binden. Dieser Umstand wird durch eine rote Fluoreszenz sichtbar.

Die DAPI-Färbung wird für die Zellkernfärbung verwendet. Das blau fluoreszierende 4'6-diamido-2-phenylindol (DAPI) kann nach Fixierung der Zellen und nach Zerstörung der Zellmembran in die Zellen eindringen. Nach Verbindung mit den Zellkernen können diese dann gut unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden [Frank, 2010].

Auch für den Life-Dead-DAPI-Test wurden die zuvor vorbereiteten 96-Well-Mikrotiterplatten mit dem Zellmonolayer verwendet. Nach 24-stündiger

Kultivierung wurden die Platten aus dem Inkubator geholt. Ohne den Zellrasen zu berühren wurde dann das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und durch 100 µl klare zuvor noch gevortexte Arzneistofflösung von Voriconazol oder SBEDD in verschiedenen Konzentrationen (in Kap. 2.2.5 mit Sternchen gekennzeichnet) ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchte im Zellkulturschrank inkubiert.

Ein Tag später wurde anhand der Anzahl der Wells die benötigte Menge der Farbstofflösungen ermittelt und die Farbstofflösungen für den Test angesetzt. Benötigt wurden dafür Calcein Am, Ethidium homodimer-1, Phosphatgepufferte Lösung (PBS), 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS und DAPI. Dabei wurde zum einen die Mischung aus Calcein, Ethidium homodimer-1, PBS und 4 % PFA in PBS zum anderen die Mischung DAPI und PBS hergestellt und im Dunkel inkubiert.

Dabei wurden folgende Mischungsverhältnisse berücksichtigt:

- Calcein AM (4 mM): 1:4000 in PBS -> 1 µM
- Ethidium homodimer (2 mM): 1:1000 in PBS -> 2 µM
- DAPI 1 µg/ml in PBS (1:2000)
- 4 % PFA in PBS

Im Anschluss wurden die Testsubstanzen und Kontrollmedien für die Fluoreszenzfärbung von den Wells sorgfältig ohne den Zellrasen zu berühren abgesaugt. In jedes Well wurde dann 100 µl von der Viability/Cytotoxicity Kit-Lösung pipettiert und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Nach den 30 Minuten wurden die Farbstoffe aus den Wells abgesaugt und zweimal vorsichtig mit PBS gespült. Als nächstes wurden die Zellen durch Zugabe von 300 µl einer 4 %-igen PFA/PBS Lösung fixiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nach der Fixierung wurden die Zellen nochmal mit PBS gewaschen und bei schwachem Licht mit der DAPI-Lösung (100 μ l/Well) benetzt und für weitere fünf Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur erneut inkubiert.

Danach wurden die DAPI-Lösungen abgesaugt und in jedes Well 100 μ l PBS zugegeben. Abschließend wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop die toten bzw. lebenden Zellen sowie die Zellkernfärbung visualisiert und fotografiert.

In dem folgenden Schema (Abb. 6) wird kurz der Ablauf der Live-Dead-DAPI-Färbung dargestellt.

Ablaufschema Live-Dead-DAPI Färbung am Monolayer

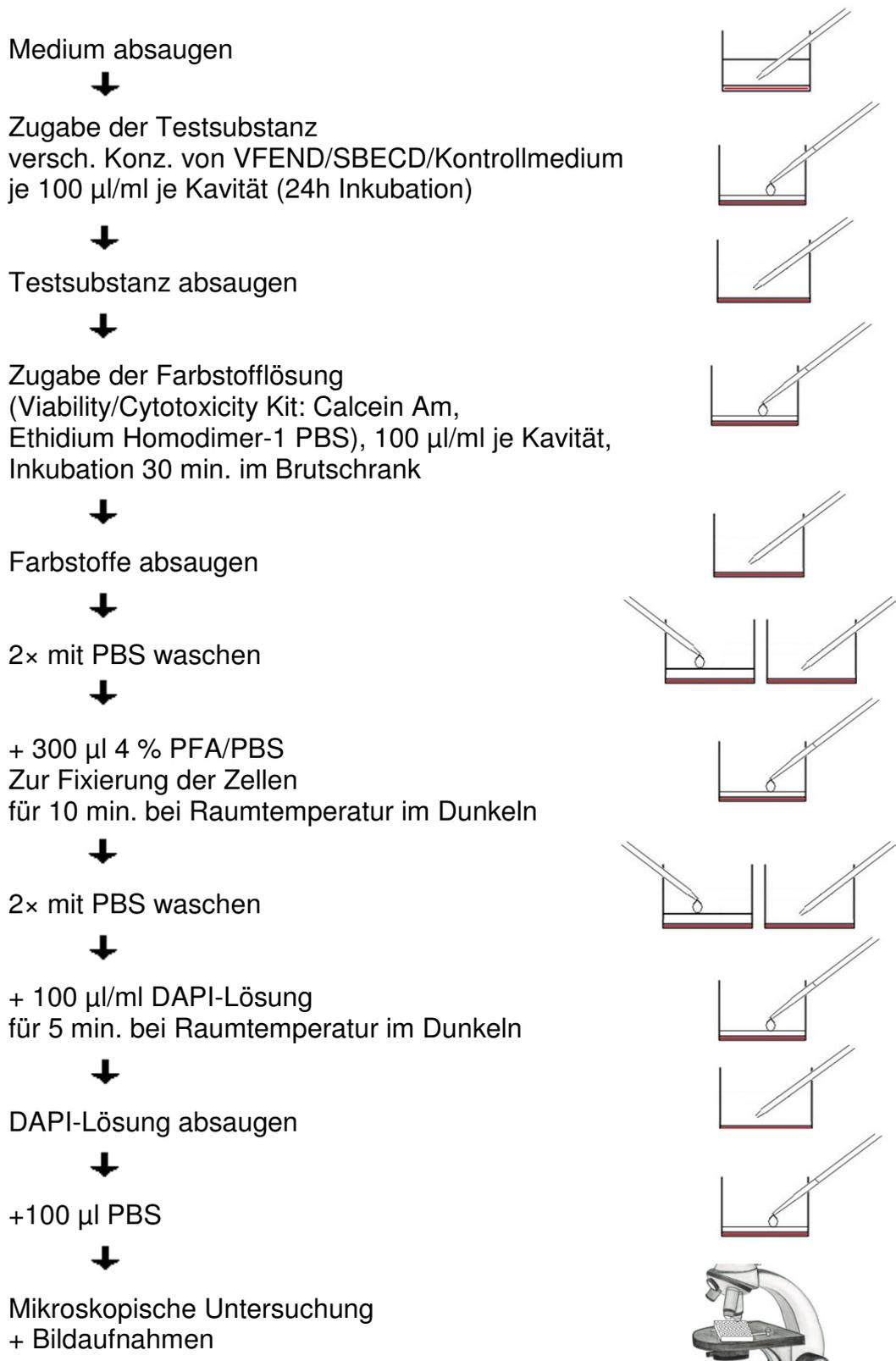


Abb. 6

Ablaufschema Live/Dead/DAPI Färbung an Monolayer

2.2.8.) Phasenkontrastmikroskopie

Um strukturelle Besonderheiten und den Einfluss von schädigenden Substanzen auf das Gewebe zu überprüfen, bedient man sich histologischer, mikroskopischer Untersuchungsmethoden. Bei der phasenkontrastmikroskopischen Beobachtung von Zellen, die im normalen Lichtmikroskop nahezu unsichtbar sind, ergeben sich kontrastreiche Bilder ohne die Notwendigkeit einer Färbung. Die Zellmorphologie wird als das maßgebliche Kriterium für die Aufrechterhaltung der Klarheit und Vitalität der Hornhaut angesehen und deswegen im Phasenkontrast-Mikroskop bestimmt [Yörük, 2009].

Um Vfend® und SBECD hinsichtlich toxischer Eigenschaften gegenüber kornealen Epithelzellen zu untersuchen und zu visualisieren wurde in unserer Arbeit die Phasenkontrastmikroskopie gewählt. Für die Phasenkontrastmikroskopie wurden die in Kap. 2.2.5 hergestellten, mit Sternchen (*) markierten Konzentrationen von Vfend® und SBECD verwendet.

Für die Phasenkontrastmikroskopie wurde die Zellsuspension diesmal auf eine 24-Well-Mikrotiterplatte mit flachem Boden ausgesät. Dafür wurde mit der Pipette in jedes Well 500 µl dieser Zellsuspension ($2 \cdot 10^5$ Zellen/ml) pipettiert. Diese Platten wurden dann 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte im Inkubator kultiviert. Nach Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit wurde das Kulturmedium behutsam, ohne den Zellrasen mitabzusaugen entfernt und durch 500 µl klare Arzneistofflösung Voriconazol/SBECD in verschiedenen Konzentrationen, oder Kulturmedium, ersetzt. Anschließend kamen die Platten erneut für 24 Stunden in den Brutschrank.

Die Morphologischen Veränderungen wurden nach 24-stündiger Exposition mit den verschiedenen Konzentrationen von Voriconazol und SBECD unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht, mit der Kontrollgruppe verglichen und fotografiert.

Ein besonderer Augenmerk lag dabei auf Anzeichen von zellulären Schäden wie Pleomorphismus, Störung der interzellulären Barrierefunktion, geschwollene oder prominente Zellkerne, zytoplasmatische Vakuolisierung, geschrumpftes Zytosol und der Ruptur von Plasmamembran oder Zellkernmembran [Han *et al.*, 2011].

2.2.9.) Statistische Analyse

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Der Student-t-Test wurde verwendet, um die Mittelwerte zwischen SBECD/Voriconazol und Kontrollgruppe zu vergleichen. Die Anzahl lebensfähiger Zellen von SBECD/Voriconazol wurde mit der Zahl der lebensfähigen Zellen der Kontrolle sowohl im MTT-Assay als auch im Live-Dead DAPI Färbung verglichen. $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet und in den Diagrammen (Abb. 7 und 8) mit einem Sternchen gekennzeichnet. Alle statistischen Analysen wurden mit einer kommerziellen Software (SPSS Version 19.0, SPSS Inc.) durchgeführt.

3.) Ergebnisse

3.1.) MTT-Assay

Beim MTT-Test wird die mitochondriale Zellaktivität gemessen, es dient zur Ermittlung der Toxizität und der Bestimmung der Auswirkung auf die Zellproliferation von Voriconazol und SBECD. Mit den hergestellten Konzentrationsreihen/Kontrollmedium werden die Zellmonolayer für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgt die photometrische Messung. Im Verlauf einer steigenden Voriconazol/SBECD Konzentration wird eine kontinuierlich fallende mitochondriale Aktivität gemessen.

Für den MTT-Test werden die in Kap 2.2.5. hergestellten Konzentrationsreihen von Vfend® und SBECD eingesetzt, um Vfend® und SBECD hinsichtlich toxischer Eigenschaften gegenüber kornealen Epithelzellen zu untersuchen. Das Ausmaß von Zellschäden in verschiedenen Konzentrationen von Voriconazol und SBECD wird mit dem der Kontrollgruppe verglichen.

Der MTT-Test zeigt mit zunehmender Konzentrationen von Voriconazol/SBECD eine dosisabhängige toxische Wirkung auf die kultivierten primären Epithelzellen der menschlichen Hornhaut.

Bei den Voriconazol-Konzentrationen bis zu 0,025 mg/ml können wie es in dem Diagramm bei der Abbildung 7 ersichtlich wird, keine signifikanten Toxizitäten festgestellt werden. Bei den Konzentrationen $\geq 0,025$ mg/ml werden signifikant erhöhte Toxizitäten auf die kultivierten Epithelzellen beobachtet.

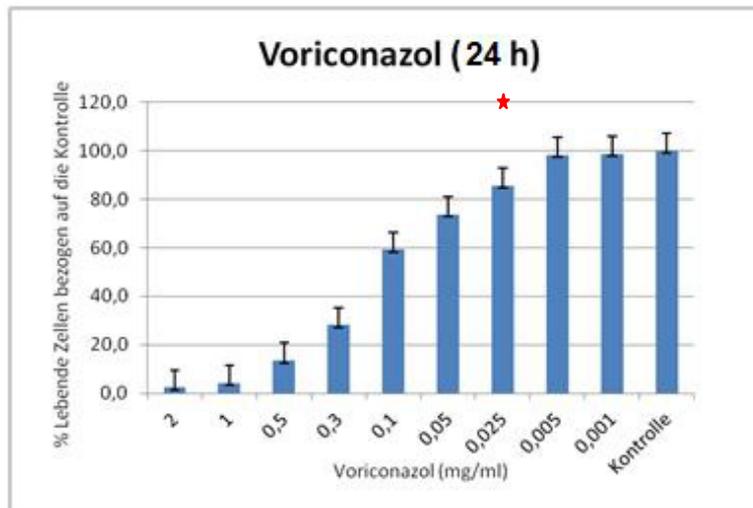


Abb. 7

MTT-Test nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit steigenden Voriconazol-Konzentrationen bezogen auf die Kontrollgruppe (Medium + Zellen). ★ = statistisch signifikant

In dem nächsten Diagramm (Abb. 8) ist der MTT-Test nach einer 24-stündigen Inkubation des Zellmonolayers mit den verschiedenen SBECD-Konzentrationen und der Kontrollgruppe dargestellt. Nur bis zu der SBECD-Konzentration von 0,016 mg/ml wird keine Toxizitäten festgestellt. Bei der Konzentration von 0,08 mg/ml wird es schon signifikant toxisch. Höheren Konzentrationen führen zu einer Zunahme der Toxizität.

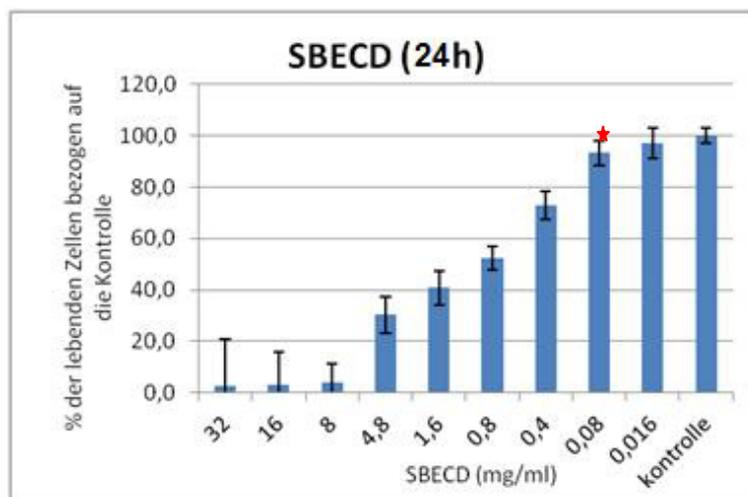


Abb. 8

MTT-Test nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit steigenden SBECD-Konzentrationen bezogen auf die Kontrollgruppe (Nährmedium + Zellen). ★ = statistisch signifikant

3.2.) Live-Dead-DAPI-Färbung

Für diesen Test werden die in Kap 2.2.5. hergestellten und mit Sternchen (*) markierten Konzentrationsreihen von Vfend® und SBECD eingesetzt, um Vfend® und SBECD hinsichtlich toxischer Eigenschaften gegenüber kornealen Epithelzellen zu untersuchen (Vfend®: 1; 0,3; 0,05; 0,001 mg/ml und SBECD: 16; 4,8; 0,8; 0,016 mg/ml).

Das Ausmaß von Zellschäden in verschiedenen Konzentrationen von Voriconazol und SBECD wird mit dem der Kontrollgruppe verglichen.

Nach einer Inkubation von 24 Stunden werden mithilfe der Fluoreszenzfärbung die lebenden und die toten kornealen Epithelzellen dargestellt. Mittels Calcein AM werden dabei die lebenden Zellen und mittels EthD-1 die toten Zellen angefärbt. Um die Zellstruktur abgrenzen zu können werden die Zellkerne zusätzlich mit 4',6'-diamidino-2phenylimdole (DAPI) angefärbt. In Abb. 9 sind die Zellen nach der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Voriconazol und der Kontrolle dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit versch. Konzentration von SBECD und Kontrolle wird in Abb. 10 gezeigt.

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe sind bei der Voriconazol-Konzentration von 0,001 mg/ml und der SBECD-Konzentration von 0,016 mg/ml noch keine toxischen Effekte, rot gefärbten Zellen, nachweisbar. Bei der Voriconazol-Konzentration von 0,05 mg/ml und der SBECD-Konzentration von 0,8 mg/ml sind schon deutliche rote Fluoreszenzen sichtbar, so dass von toten Zellen auszugehen ist. Mit steigender Konzentration von Voriconazol und SBECD ist eine deutliche Abnahme der Zellvitalität zu erkennen. Die Zahl der grün gefärbten, lebenden Zellen nimmt ab und die Zahl der rot gefärbten, toten Zellen nimmt zu.

Diese konzentrationsabhängige Reduktion der Lebensfähigkeit des Zellmonolayers ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten MTT Test.

Live-Dead Bilder mit verschiedenen Konzentrationen von Voriconazol

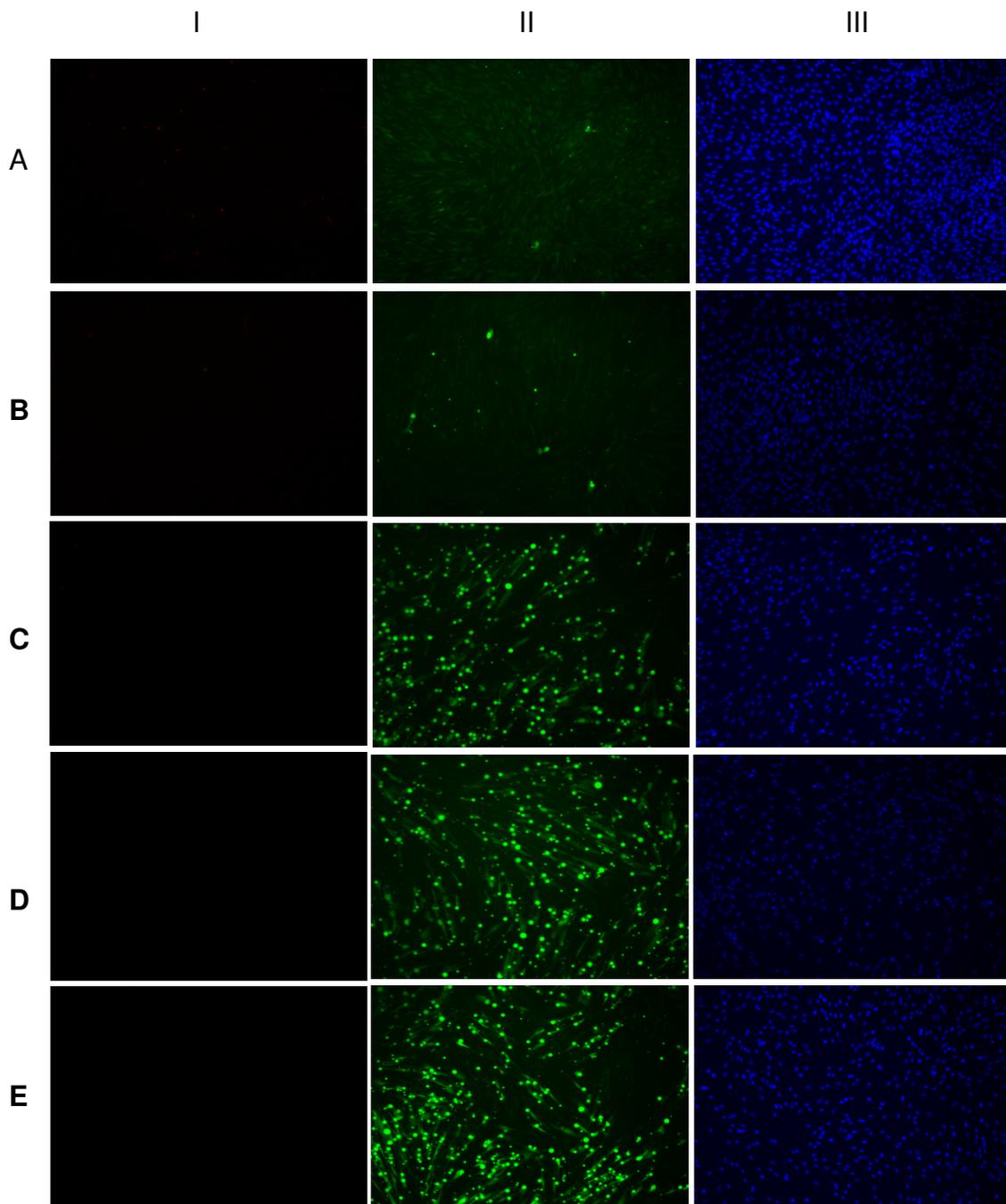


Abb. 9, Live/Dead/DAPI Färbung

Gezeigt sind die Zellen nach der Behandlung mit den verschiedenen Konzentrationen von Voriconazol (A: 1; B: 0,3; C: 0,05; D: 0,001 mg/ml; E: Kontrolle). Rote Ethidium-Homodimer-Färbung der toten Zellen (I), grüne Calcein-Färbung der vitalen Zellen (II), blaue Dapi-Färbung der Zellkerne (III). Als Kontrolle dienten die Zellen mit dem Nährmedium. Mit steigender Konzentration von Voriconazol ist eine deutliche Abnahme der Zellvitalität zu erkennen.

Live-Dead Bilder mit verschiedenen Konzentrationen von SBECD

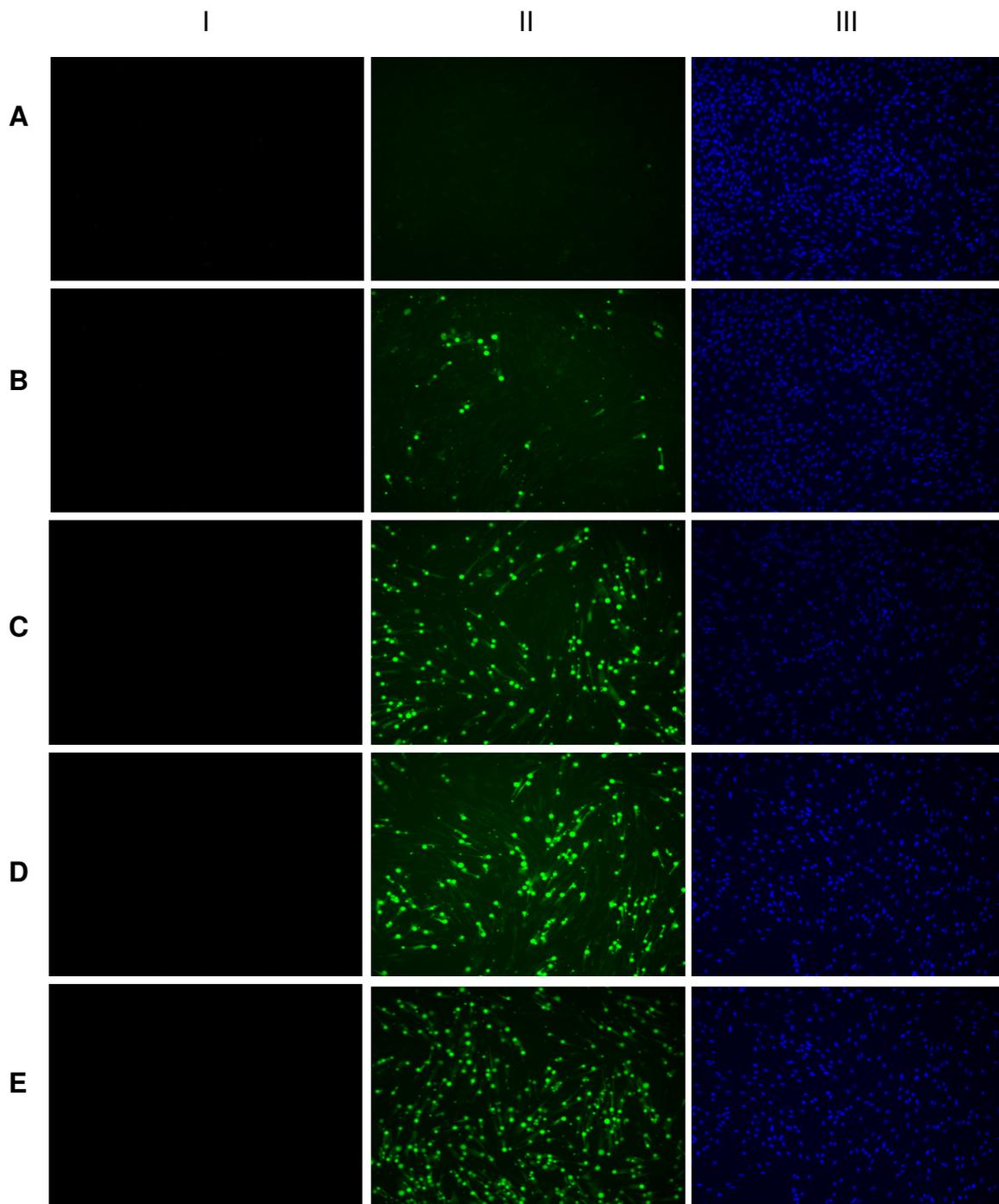


Abb. 10, Live/Dead/DAPI Färbung

Gezeigt sind die Zellen nach der Behandlung mit den verschiedenen Konzentrationen von SBECD (A: 16; B: 4,8; C: 0,8; D: 0,016 mg/ml; E: Kontrolle). Rote Ethidium-Homodimer-Färbung der toten Zellen (I), grüne Calcein-Färbung der vitalen Zellen (II), blaue Dapi-Färbung der Zellkerne (III). Als Kontrolle dienten die Zellen mit dem Nährmedium. Mit steigender Konzentration von SBECD ist eine deutliche Abnahme der Zellvitalität zu erkennen.

3.3.) Phasenkontrastmikroskopie

Mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie ist es möglich, anhand der morphologischen Veränderungen die Schädigung der Zellen durch zytotoxische Substanzen zu überprüfen.

Nach der 24-stündigen Exposition des Zellmonolayers mit verschiedenen Konzentrationen von Voriconazol/SBECN und der Kontrolle werden konzentrationsabhängige morphologische Veränderungen gesichtet. Diese sind in der Abbildung 11 dargestellt.

Steigende Konzentrationen von Voriconazol/SBECN führten zu den typischen Anzeichen von Zellulärschäden einschließlich Pleomorphismus, Plasmamembranruptur, geschrumpftes Zytosol und Aufbruch der interzellulären Verbindungskomplexe.

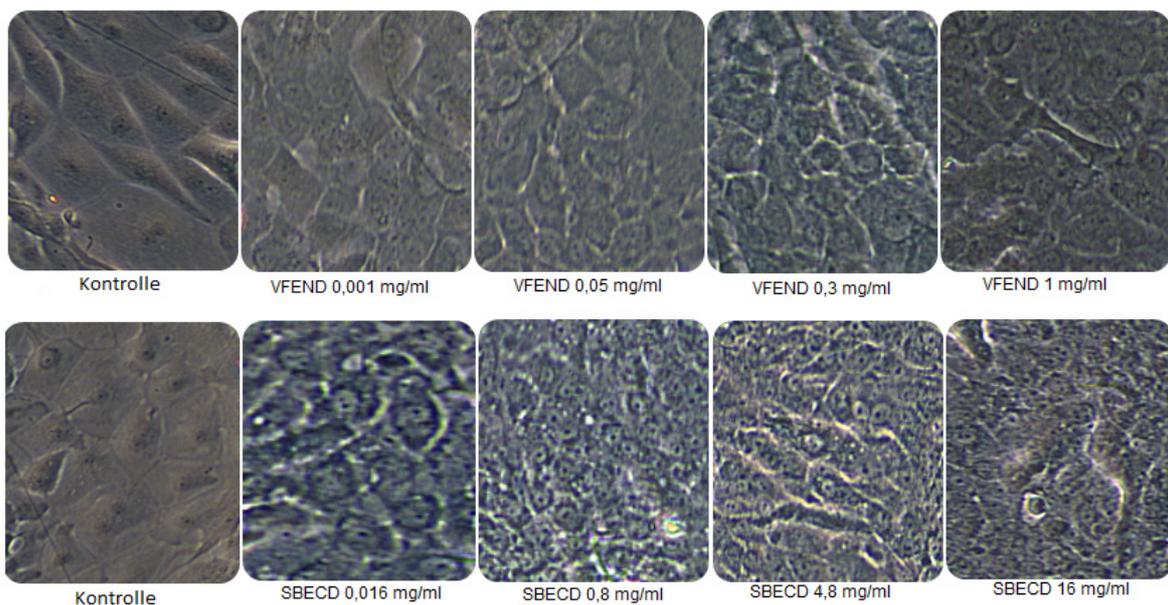


Abb. 11

Gezeigt sind die Epithelzellen(10-fache Vergrößerung) nach einer 24-stündigen Exposition mit Voriconazol in den Konzentrationen 0,001; 0,05; 0,3; 1 mg/ml und SBECN in den Konzentrationen 0,016; 0,8; 4,8; 16 mg/ml, im Vergleich zu einer Zellkontrolle mit reinem Kulturmedium.

Bei der Voriconazol-Konzentration von 0,001 mg/ml sehen die Zellen noch völlig unverändert aus. Bei einer Konzentration von 0,05 mg/ml wird eine leichte Veränderung der Zellmorphologie erkennbar. Da das Zytosol schrumpft beginnen die Zellen sich zusammenzuziehen. Bei der Konzentration von 0,3 mg/ml wird eine deutlich angeschwollene Zellmembran sichtbar, die Zellen bekommen ein bläschenartiges Aussehen, die auf ein baldiges Ablösen der Zellen von der Kultivierungsoberfläche hindeuten. Diese Reaktion ist bei der Konzentration von 1 mg/ml noch deutlicher ausgeprägt. Die Zellen ballen sich zu Agglomeraten zusammen. Ihre Oberfläche wirkt nicht mehrgleichmäßig, und es sind einige freigesetzte Zellfragmente zu erkennen, die auf eine Lyse der Zellen hindeuten. Die verbleibenden Zellen haben kaum noch Ähnlichkeiten mit den Ausgangszellen.

In den oben dargestellten Phasenkontrastbildern ist gut zu erkennen, dass das SBECD schon in den niedrigsten von uns getesteten Konzentrationen toxisch wird. Bei einer Konzentration von 0,8 mg/ml sind deutliche Veränderungen, wie die Anschwellung der Zellmembran wahrnehmbar. Bei höheren Konzentrationen sind ebenfalls die oben aufgeführten Veränderungen mit einer stärkeren Ausprägung sichtbar.

Die Ergebnisse der Phasenkontrastmikroskopie stimmen mit unseren MTT-Test und der Live-Dead-DAPI Färbung überein.

Abschließend lässt sich sagen, dass das Voriconazol und SBECD eine dosisabhängige toxische Wirkung auf die kultivierten primären humanen kornealen Epithelzellen aufweist. Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass Voriconazol bis zu einer Konzentration von 0,025 mg/ml die Lebensfähigkeit der Epithelzellen nicht verringert. Voriconazol-Konzentrationen von über 0,05 mg/ml erhöhen das Risiko von irreversiblen Epithelschäden an der Hornhaut. SBECD wirkt schon bei der Konzentration von 0,08 mg/ml toxisch, wobei schon mit Epithelschäden gerechnet werden kann.

4.) Diskussion

4.1.) Vorbemerkung

Für die adäquate Behandlung invasiver Mykosen stehen momentan eine Reihe verschiedener Medikamente mit unterschiedlichen Substanzklassen zur Verfügung. Allerdings ist die Behandlung invasiver Mykosen durch eine sehr aufwendige Diagnostik und durch ein hohes Nebenwirkungspotential der bestehenden Antimykotika erschwert [Henkel, 2010].

Resistenzentwicklungen stellen kein zentrales Problem bei der Anwendung von Antimykotika dar. Es gibt Problemfelder in der Therapie invasiver Mykosen, die es unumgänglich machen die Forschung und Entwicklung voranzutreiben [Henkel, 2010].

Eine weitere signifikante Erhöhung des Therapieansprechens mit den bestehenden Antimykotika konnte zuletzt nicht mehr erzielt werden. Sinnvoll ist es daher, die Behandlung durch den optimalen Einsatz der vorhandenen Medikamente zu verbessern. Eine Änderung der Dosierung stellt hierbei eine wichtige Option dar [Al-Badriyeh *et al.* 2010].

Die Biokompatibilität von Voriconazol auf humane korneale Epithelzellen wurde unseres Wissens noch nicht ermittelt. Angesicht der zunehmenden Nutzung von Voriconazol führen wir deshalb diese Studie durch, um über die möglichen zytotoxischen Wirkungen der verschiedenen Konzentrationen von Voriconazol und seiner Trägersubstanz SBEDD auf kultivierte primäre menschliche Epithelzellen der Hornhaut zu untersuchen, um so die optimale therapeutische Dosis zu bestimmen.

Voriconazol ist ein Triazol der zweiten Generation, sie besitzt ein breites antifugales Wirkspektrum. Die antimykotische Aktivität ergibt sich aus einem

komplexen multimechanischen Prozess durch die Hemmung von Cytochrom P450, welches an der Biosynthese von Ergosterol, nämlich von CYP51 beteiligt ist. CYP51 katalysiert durch oxidative Reduktion die Entfernung von 14 α – Methylgruppe von Lanosterol oder Eubricol. Dies führt zu einer Erschöpfung von Ergosterol, somit stört sie die Integrität und Funktion der Zellmembran von Pilzen und führt dadurch zu Zellyse. Dieses antimykotische Medikament ist ein synthetisches Derivat von Fluconazol. Durch das Anhängen einer Methylgruppe an den Propylrest und durch Substitution eines modifizierten Triazolrestes an einer Fluorpyrimidin Gruppe wird sie synthetisiert. Sie besitzt dadurch eine höhere Affinität für die 14 α -Demethylase von Pilzen. So verfügt sie über eine ausgezeichnete Wirksamkeit gegenüber einer Vielzahl an okularen Pilzinfektionen beim Patienten.

Voriconazol wirkt effektiv gegen invasive Pilzinfektionen, auch bei Infektionen, die nicht auf andere Antimykotika ansprechen, ist sie wirksam. Dadurch wurde es von der US Food and Drug Administration und der Europäischen Arzneimittelagentur für die Behandlung von invasiven und schweren *Aspergillose* Infektionen und schweren Infektionen, die durch *Fusarium* Arten und *Scedosporium apiospermum* hervorgerufen wurden und resistent gegen andere Mykotika sind, zugelassen. Zunehmend wird Voriconazol zur Behandlung von Infektionen am Auge wie die Pilzkeratitis und Endophthalmitis verwendet [Masche, 2004; Han et al., 2011].

In vielen Studien wurde bereits die Wirksamkeit von Voriconazol selbst bei widerspenstigen Pilzinfektionen am Auge berichtet. Obwohl Voriconazol nur für die systemische Applikationsform zugelassen ist, wird sie dennoch lokal verabreicht.

In dem folgendem Abschnitt werden einige Studien über Voriconazol aufgelistet, die sich zwar in der Versuchsdurchführung und der Zielsetzung nicht mit unseren Arbeiten decken, uns aber zunächst ein Überblick über die bisher durchgeführten Studien von Voriconazol verschaffen soll. Darüberhinaus

soll es uns die Bewertung der Biokompatibilität von Voriconazol etwas erleichtern. Außerdem werden hier die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen früherer Studien sofern es möglich ist verglichen.

4.2.) Klinische Erfahrungen und Experimentelle Untersuchungen von Voriconazol

4.2.1.) Studien an Tieren

Es wurden mehrere Studien an Tieren durchgeführt, um das Eindringen und die Verträglichkeit von Voriconazol zu testen.

In einer Studie von Sponzel *et al.*, wurden 10 Kaninchen mit *Paecilomyces lilacinus* Infektionen mit topischem Voriconazol (5 und 10 µg/ml) behandelt. Voriconazol zeigte eine gute und tiefe Penetration in die Kaninchenaugen. Es wurden ausreichende Konzentrationen im Gewebe gemessen und die Keratitis erfolgreich behandelt [Sponzel *et al.*, 2006].

Clode *et al.*, untersuchten die topische Behandlung mit 0,5 %-, 1,0 %- und 3 %-igen Voriconazol Konzentrationen an sechs gesunden Pferden. Dabei wurden jeweils vier Augen mit derselben Konzentration behandelt. Auch bei dieser Studie konnten gute Eindringtiefen erreicht und ausreichend nachweisbare Mengen an Voriconazol gemessen werden [Clode *et al.*, 2006].

Fazit

Die Epithelschicht stellt die äußerste Barriere der Hornhaut dar und ist lipophil. Daher haben lipophile Substanzen eine bessere Penetrationsmöglichkeit durch die Hornhaut als hydrophile. Voriconazol Augentropfen als lipophile Verbindung besitzt dadurch eine bessere Penetration [Al-Badriyeh *et al.*, 2010].

Kaninchen zum Beispiel haben im Vergleich zum Menschen eine sehr niedrige Blickfrequenz und eine große epitheliale Hornhautoberfläche, die es dem lipophilen Voriconazol ermöglicht ohne besondere Schwierigkeiten durch das Epithel einzudringen [Thiel *et al.*, 2007].

Die Entwässerungsgeschwindigkeit beim Menschen ist jedoch doppelt so hoch als beim Kaninchen [Jtirvinen und Urtti, 1995; Sponset *et al.*, 2006].

Die Daten von Tierexperimenten sind alleine nicht zuverlässig genug, um sie auf den Menschen zu übertragen.

4.2.2.) Studien an Patienten ohne Pilzkeratitis

In der prospektiven Studie von Vermulakonda *et al.*, wurden 13 Patienten, bei denen eine Vitrektomie geplant wurde, gewählt. Sie wurden alle zwei Stunden mit einer 1 %-igen Voriconazol Lösung behandelt. 24 Stunden nach der letzten Dosis (\pm 14 Minuten) wurde die Kammerwasserkonzentration von Voriconazol gemessen. Voriconazol wurde von den Augen der Patienten gut toleriert, und es wurden ausreichende Konzentrationen ermittelt, die gegenüber vielen Pathogenen wirksam sind [Vermulakonda *et al.*, 2008].

Al-Badriyeh *et al.*, untersuchten in einer Studie die Penetration einer 2 %-igen Voriconazol Lösung (Voriconazol gelöst in 0,01 %-igen Benzalkonium Chlorid) und verglichen sie mit der 1 %-igen Form. Nebenwirkungen und Toxizitäten wurden nicht gesichtet. Er konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen der 2 %-igen und der 1 %-igen Voriconazol Lösung feststellen. Allerdings betrug die Augentropfen-Gabe nur vier Stunden. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Penetration durch die (gesunde, intakte) Hornhaut nicht konzentrationsabhängig ist [Al-Badriyeh *et al.*, 2009]. Dieses würde auch die Studie von Clode *et al.*, bestätigen, wo ein Wechsel der Konzentration von 1 % zu 3 % den Voriconazol-Spiegel an den (mit *Fusarium* infizierten) Hornhäuten von Pferden nicht signifikant veränderte [Clode *et al.*, 2006].

Fazit

Zurzeit ist weiterhin unklar, ob eine 2 %-ige Form von Voriconazol gegenüber einer 1 %-igen effektiver ist. Bei der Studie von Al-Badriyeh und Clode et al. wurden beide Konzentrationen miteinander verglichen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden [Al-Badriyeh et al., 2009, Clode et al., 2006]. Allerdings bei dem Pferd-Modell von Clode et al., traten bei der Behandlung mit den 3 %-igen Voriconazol-Tropfen okuläre Toxizitäten auf [Clode et al., 2006].

4.2.3.) Fallberichte an Patienten mit Pilzkeratitis

Eine von den ersten veröffentlichten Fallberichten, bei der eine Pilzkeratitis mit Voriconazol behandelt wurde, war die von Reis et al., im Jahr 2000. Es wurde über eine 16-Jährige berichtet, die nach dem Schwimmen in einem See an einer *Fusarium solani* Keratitis erkrankte. Sie wurde anfangs mit topischem Amphotericin B und Fluconazol ohne Erfolg behandelt. Daher wurde die Therapie mit topischem (1 %) und oralem Voriconazol weitergeführt. Die Behandlung konnte nach 8 Wochen mit Erfolg beendet werden [Reis et al., 2000].

In einem Fallbericht von Klont et al., wurde ein 23-jähriger Patient mit einer *Fusarium* Keratitis aufgrund der vorhandenen Behandlungsresistenz mit Amphotericin B und Itraconazol auf Voriconazol umgestellt. Behandelt wurde der Patient mit einer 1 %-igen Voriconazol-Lösung topisch und systemisch. Nach 13 Tagen wurde die Konzentration von Voriconazol im Kammerwasser und im Plasma ermittelt. Durch die zusätzliche topischen Applikation konnten höhere Konzentrationen im Kammerwasser erreicht werden als mit der oralen Applikation alleine. Nach 6 Wochen konnte die Behandlung erfolgreich beendet werden [Klont et al., 2005].

Prats *et al.*, berichteten von einer erfolgreichen Behandlung eines 19-jährigen Patienten mit einer *Scedosporium apiospermum* Keratitis durch die Gabe von oralem und topischem Voriconazol (1 %) [Prats *et al.*, 2004].

Bei dem Fallbericht von Jones *et al.*, wurde über eine 52-jährige Frau mit einer *Aspergillus niger* Keratitis berichtet, die nach einer erfolglosen Behandlung mit Amphotericin B, in einer Kombination von topischem und oralem Voriconazol (1 %) therapiert wurde. Die Therapie war wirksam und konnte nach 5 Wochen beendet werden [Jones und Muhtaseb, 2009].

In dem Artikel von Tu *et al.*, wurden über zwei Patienten berichtet, die an einer Fusarium Keratitis litten. Sie wurden mit einer Kombinationstherapie aus 1 %-igem topischem und intravitrealen Voriconazol behandelt. Die Therapie mit Voriconazol schien anfangs erfolgreich zu sein, musste jedoch wegen einer von der systemischen Applikation ausgelösten Lebertoxizität abgebrochen werden. Die Behandlung wurde anschließend mit Posaconazol weitergeführt [Tu *et al.*, 2007].

Lin *et al.*, berichteten über die erfolgreiche intrakamerale Gabe von Voriconazol bei drei Fällen einer Pilz-Endophthalmitis [Lin *et al.*, 2008].

Der Fallbericht von Al-Badriyeh *et al.*, berichtete über eine gelungene Therapie mit 1 %-igen Voriconazol-Tropfen bei einer 54-jährigen Patientin mit *Scedosporium apiospermum* Keratitis. Nach einer unbefriedigenden Therapie mit Natamycin (5 %) wurde auf Voriconazol-Augentropfen (1 %) umgestellt. In 5 Tagen verbesserte sich die Sehkraft und eine Woche danach war der Epitheldefekt soweit wieder geheilt [Al-Badriyeh *et al.*, 2009].

In einem Fall von Al-Badriyeh *et al.*, wurde ein 48-jähriger Mann mit einer *Candida albicans* Infektion der Hornhaut mit 1 %-igen Voriconazol-Lösung erfolgreich behandelt. Das geschädigte Epithel war komplett geheilt und die Sehkraft in 7 Tagen wieder hergestellt [Al-Badriyeh *et al.*, 2009].

Fazit

In all den anderen klinischen Fallberichten wurde die Wirksamkeit von Voriconazol-Augentropfen demonstriert [Reis *et al.*, 2000; Prats *et al.*, 2004; Klont *et al.*, 2005; Clode *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008; Vermulakonda *et al.*, 2008; Al-Badriyeh *et al.*, 2009; Jones und Muhtaseb, 2009; Prajna *et al.*, 2010/2013; Sharma *et al.*, 2013]. Nur in dem Fallbericht von Tu *et al.*, musste die Therapie mit Voriconazol beendet werden. Das Scheitern der Behandlung war aber nicht durch die mangelnde Wirksamkeit von Voriconazol bedingt, sondern wegen den verursachten Nebenwirkungen durch die systemische Applikationsform [Tu *et al.*, 2007].

Voriconazol als Augentropfen stellen die bessere Option im Vergleich zu der systemischen Verwendung dar. Der Wirkort kann so besser erreicht werden, der Leberstoffwechsel umgangen und die Gefahr von systemischen Nebenwirkungen ist geringer. Zudem können die Kosten für das Medikament durch die lokale Applikation gesenkt werden, da die systemische Form sehr kostenintensiv ist [Al-Badriyeh *et al.*, 2010].

Die Beweise für die klinische Wirksamkeit von Voriconazol beruhen mehr auf Fallberichten als auf klinische Studien. Gut konzipierte klinische Studien die die Wirksamkeit von Voriconazol bei Patienten mit aktiver Pilzkeratitis belegen sind schwer durchzuführen und fehlen daher. Die schwere Durchführbarkeit solcher Studien ergibt sich aufgrund der geringen Häufigkeit an Pilz-Keratitis sowie die Notwendigkeit einer langen Behandlungsdauer [Al-Badriyeh *et al.*, 2010].

4.2.4.) Studien an Patienten mit Pilzkeratitis

Im Jahre 2010 wurde in einer Studie von Prajna *et al.* die Wirksamkeit von topisch applizierten Natamycin (5 %) und dem ebenfalls topisch appliziertem Voriconazol (1 %) bei Patienten mit einer mykotischen Ulzeration der Hornhaut miteinander verglichen. Beurteilt wurden dabei die Therapieergebnisse bezogen

auf Sehschärfe, Narbengröße und Perforationsrate. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede in den Therapieergebnissen zwischen Natamycin und Voriconazol festgestellt werden [Prajna *et al.*, 2010].

In der Studie von Sharma *et al.* aus dem Jahre 2013 wurden 40 Patienten mit einer mykotisch verursachten Hornhautulzeration, die zwei Wochen nach Therapiebeginn mit topischem Natamycin (5 %) noch keine Besserung gezeigt hatten, für die Studie rekrutiert. In dieser Studie erhielten 20 der Patienten Voriconazol (1 %) in topischer Form und die restlichen 20 Patienten als intrastromale Injektion (50 µg/0,1 ml). Dabei wurde bei allen 40 Patienten die Behandlung mit Natamycin weitergeführt. In dieser Studie zeigte die topische Kombinationstherapie von Voriconazol und Natamycin ein deutlich besseres Ergebnis, als wenn Voriconazol Intrastromal verabreicht wurde. Bei Pilz-Keratitis, die auf eine Monotherapie mit topischem Natamycin nicht ansprachen, stellte die Kombination mit topischem Voriconazol eine günstige Ergänzung dar [Sharma *et al.*, 2013].

In einer neueren Studie von Prajna *et al.* (2013) wurde erneut die Wirksamkeit von Natamycin (5 %) und Voriconazol (1 %) bei Patienten mit *Fusarium*-Keratitis verglichen. Dabei wurde der einen Hälfte der Patienten Natamycin und der anderen Hälfte Voriconazol, topisch verabreicht. Hierbei schnitt Natamycin in der klinischen als auch in der mikrobiellen Untersuchung besser ab als Voriconazol. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von Prajna *et al.* eine Monotherapie mit Voriconazol bei *Fusarium*-Keratitis nicht empfohlen. Zudem verglichen Prajna *et al.* ihre Ergebnisse mit den Ergebnissen von Sharma *et al.* (2013) und vermutete, dass die Diskrepanz in den Ergebnissen eventuell an der unterschiedlichen Zusammensetzung der *Fusarium*-Stämme bei den Infektionen liegen könnte. Außerdem ist eine Synergie bei der topischen Kombinationstherapie zwischen Voriconazol und Natamycin bei der Studie von Sharma *et al.* nicht auszuschließen. Ein weiteres Problem stellte außerdem der unterschiedliche Aufbau der beiden Studien dar. Bei Sharma *et al.* bekamen die Patienten zunächst zwei Wochen lang Natamycin in topischer Form und erst

danach wurde die Therapie mit topischem Voriconazol kombiniert fortgesetzt. In der Studie von Prajna *et al.* dagegen bekamen die Patienten jeweils Natamycin oder Voriconazol, topisch als Monotherapie verabreicht [Prajna *et al.*, 2013].

Fazit

Um die Wirksamkeit von Natamycin und Voriconazol miteinander vergleichen zu können, sind weitere Versuche notwendig, die in ihrem Versuchsaufbau identisch sind. Ob eine Synergie zwischen Voriconazol und Natamycin vorliegt müsste überprüft werden. Außerdem sollte speziell die Wirksamkeit von Natamycin und Voriconazol bei Infektionen mit bestimmten Pilzarten untersucht werden.

4.2.5.) Studien an Zellkulturen

Gao *et al.*, demonstrierte in seiner Studie, dass die intrakamerale Injektion von dem Antimykotikum Voriconazol bis zu den Konzentrationen von 25 µg/ml zu keinen elektroretinographischen Veränderungen und histologischen Abnormalitäten in der Rattenretzhaut führte. Doch bei Voriconazol-Konzentrationen von über 50 µg/ml kam es zu Schäden an der Rattenretzhaut [Gao *et al.*, 2004]. Diese Studie deckt sich mit unseren Ergebnissen.

Han *et al.*, berichtete eine dosisabhängige, signifikante Toxizität an kultivierten menschlichen Hornhautendothelzellen. Dabei waren bis zu der Konzentration von 50 µg/ml keine signifikanten Schäden feststellbar, sondern erst bei Konzentrationen ≥ 100 µg/ml war mit erheblichen Toxizitäten zu rechnen [Han *et al.*, 2011]. Auch diese Studie deckt sich mit unseren Ergebnissen.

In der Studie von Kernt *et al.*, wird gezeigt dass Voriconazol Konzentrationen bis zu 250 µg/ml keine signifikante Toxizität bei primären Pigmentepithelzellen der

Netzhaut aufweist. Außerdem wird bei einer weiteren Studie von Kernt dargelegt, dass Konzentrationen von Voriconazol bis zu 10 mg/ml bei immortalisierten humanen Hornhautendothelzellen und Pigmentepithelzellen der Netzhaut keine signifikanten Toxizitäten zu beobachten sind [Kernt *et al.*, 2009].

Die aufgeführten Berichte von Kernt weisen eine Diskrepanz mit dem Ergebnissen unserer Studie auf. Allerdings verwendete Kernt bei seiner Studie keine primären Kulturen, sondern immortalisierte Zellkulturen. Dies lässt vermuten, dass diese Zellkulturen im Vergleich zu den primären nicht modifizierten Zellkulturen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit bei der Behandlung mit höheren Dosen von Voriconazol besitzen. Die Untersuchungen an genetisch veränderten Zellen lassen sich nur bedingt auf den Menschen übertragen [Döhning, 2009]. Deswegen wurden bei unseren Versuchen primäre, humane Epithelzellen der Hornhaut verwendet.

Fazit

Mittels Zellkultursysteme können heutzutage viele grundlegende zelluläre Prozesse untersucht werden, ohne dass Versuchstiere in klassischen Tierversuchen zu Schaden kommen. Jedoch ist zu beachten, dass Tiere auch zur Gewinnung von Organ- und Zellkulturen und der Herstellung von Seren und anderen Zusätzen benötigt werden. Trotzdem stellt die Zellkultur häufig einen sinnvollen Ersatz für Tierversuche dar [Schmitz, 2011]).

Die toxische Wirkung eines Arzneistoffes kann in Zellkulturexperimenten über die Beobachtung des morphologischen Erscheinungsbildes oder über die quantitative Bestimmung von in lebenden Zellen angereicherten Farbstoffen ermittelt werden [Döhning, 2009]. Die Reaktion der Zellkulturen auf die Testsubstanzen liefert gut reproduzierbare Daten zur Quantifizierung der toxischen Wirkung dieser Stoffe. Ein direkter Vergleich zwischen den

schädigenden Konzentrationen In-vivo und In-vitro ist jedoch oft nicht möglich. Die Zellkultur ermöglicht nur eine Einteilung in eine Rangordnung der relativen schädigenden Potentiale [Scaife, 1985].

In-vitro-Modelle können zwar nie die komplexen Verhältnisse am lebenden Organismus wiedergeben, doch mit mehreren Alternativmethoden (physikalisch-chemischen Methoden, Computer Modelling und neuronale Netzwerke) lassen sich verschiedene Teilinformationen gewinnen, die zusammen weitgehend an die Ergebnisse des zu ersetzenden Tierversuches herankommen [Döhning, 2009; Schmitz, 2011].

4.3.) Schlussfolgerung

In dieser Studie wurde unseres Wissens nach die Toxizität von Voriconazol und SBECD auf die Epithelzellen zum ersten Mal untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt die dosisabhängige Toxizität von Voriconazol und dem Transporterstoff SBECD an kultivierten primären Hornhautepithelzellen. Voriconazol scheint in den therapeutischen Konzentrationen von bis zu 25 µg/ml sicher zu sein. Die SBECD-Konzentrationen dagegen weisen schon bei niedrigen Konzentrationen von 0,08 mg/ml Toxizitäten auf. Die Ergebnisse dieser Studie decken sich mit den Studienergebnissen von Gao *et al.* und Han *et al.* [Gao *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2011].

Die vorliegende Studie hat die Beschränkung, dass die Ergebnisse von In-vitro-Experimenten nicht direkt in die In-vivo-Situation übersetzt werden können. Erstens kann die Sensibilität auf toxische Agenzien durch die mehrfache Passage verändert werden. Zweitens existieren multiple Mechanismen in der vorderen Augenkammer, die zum Schutz der Hornhautzellen beitragen [Döhning, 2009].

Außerdem enthält die 1 % Voriconazol Dosis zusätzlich 160 mg/ml SBECD als Transportmittel. Bereits in früheren Studien wurden über negative Effekte von Cyclodextrinen, wie zum Beispiel die Schädigung der Hornhaut durch das Herauslösen von Cholesterin und Phospholipiden berichtet. Deshalb werden die Cyclodextrine nur in geringen Mengen in Arzneimitteln verwendet und sind weiterhin begrenzt im Einsatz [Klein und Zöller, 2008]. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Wirkung von SBECD zu untersuchen oder einen Ersatz dafür zu finden, die eine bessere Verträglichkeit bzw. eine geringere Toxizität besitzt.

5.) Zusammenfassung

Invasive Pilzinfektionen sind schwierig zu behandeln, da das Spektrum der gesamten Antimykotika für die Pilzinfektion nach wie vor unzureichend ist. Deshalb müssen neue Medikamente entwickelt oder bereits bestehende Antimykotika wie Voriconazol auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit hin überprüft und gegebenenfalls verbessert werden [Döhring, 2009; Al-Badriyeh, 2010; Haller-Schober, 2010].

Voriconazol (Vfend[®]) ist ein Azol-Antimykotikum mit dem Wirkmechanismus einer Ergosterolbiosynthese-Hemmung. Es besitzt ein breites Wirkspektrum und ist zur Behandlung der invasiven *Aspergillose*n zugelassen, sowie zur Therapie von *Fluconazol*-resistenten, schweren invasiven *Candida-Infektionen* und weiteren speziellen Pilzinfektionen. Es ist liquorgängig und deswegen auch bei Mykosen des zentralen Nervensystems, insbesondere *Aspergillose*n, einsetzbar. Auch Itraconazol- und Amphotericin B-resistente *Aspergillen* sprechen auf Voriconazol an. Voriconazol steht sowohl zur oralen als auch zur parenteralen Therapie zur Verfügung. Sie wird jedoch auch als Off-Label-Medikament in Form von Augentropfen zubereitet und beim Patienten lokal appliziert. [Masche, 2004; Henkel, 2010; Al-Badriyeh, 2010].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit, war die Ermittlung der Toxizitätsgrenze von Voriconazol (Vfend[®]) auf kultivierte menschliche Epithelzellen der Hornhaut. Zusätzlich wurde auch die Toxizität von SBEDD mit untersucht, da sie als Lösungsvermittler in Vfend enthalten ist.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde unter Verwendung von MTT-Test und Live-Dead-Test bestimmt. Zellschäden wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie nach einer 24-stündigen Exposition von Voriconazol bewertet. Dadurch sollte die optimale Konzentration ermittelt werden, bei der keine schädigende Wirkung auf die getesteten Zellen besteht.

Durch diese Zytotoxizitätstests konnte die dosisabhängige Wirkung von Voriconazol auf humanen kornealen Epithelzellen demonstriert werden.

Sowohl im MTT-Assay als auch im Live-Dead-DAPI-Assay konnte bei einer Konzentration bis 0,025 mg/ml keine signifikanten toxischen Effekte festgestellt werden. Voriconazol-Konzentrationen von $\geq 0,025$ mg/ml führten jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Lebensfähigkeit dieser Zellen.

Die Phasenkontrastmikroskopie zeigte ebenfalls die toxischen Effekte bei höheren Konzentrationen von Voriconazol. Es kam zu einer dosisabhängigen Veränderung der morphologischen Merkmale. Während die Zellmorphologie bis 0,05 mg/ml nur wenige Alterationen aufwies, beobachteten wir bei 0,3 mg/ml eine veränderte Zellarchitektur mit Zellpleomorphismus.

Fazit

Die Schädigung der kornealen Epithelzellen kann zu einer ernsthaften Störung wie Hornhauttrübung und infolge dessen zu einer Sehschärfeverminderung führen. Deshalb muss ein Antimykotikum biokompatibel sein, um In vivo eingesetzt werden zu können. Die Daten der vorliegenden Studie tragen zum Verständnis der Pharmakokinetik bei und sind daher wichtig für die Erhöhung der Sicherheit in der klinischen Anwendung des Antimykotiums.

In dieser Studie wurde ein dosisabhängiger toxischer Effekt von Voriconazol und SBECD auf die kornealen Epithelzellen unter In-vitro-Bedingungen festgestellt. Die Voriconazol-Konzentrationen ab 0,025 mg/ml und SBECD-Konzentrationen ab 0,08 mg/ml waren epithelzytotoxisch. Daher sollte Voriconazol mit SBECD in höheren Konzentrationen mit Vorsicht verwendet werden. Hier sind weitere Studien erforderlich, um die In-vivo-Toxizität von Voriconazol auf die kornealen Epithelzellen zu untersuchen.

6.) Literaturverzeichnis

- Al-Badriyeh D, Leung L, Davies GE, Stewart K, and Kong D (2009) Successful salvage treatment of *Scedosporium apiospermum* keratitis with topical voriconazole after failure of natamycin. *Ann Pharmacother* 43:1139-42
- Al-Badriyeh D, Leung L, Roydhouse T, Fullinfaw R, Daniell M, Davies GE, Stewart K and Kong D (2009) Prospective Open-Label Study of the Administration of Two-Percent Voriconazole Eye Drops. *Ann Pharmacother*43: 3153-55
- Al-Badriyeh D, Leung L, Davies GE, Stewart K and Kong D (2009) Successful use of topical voriconazole 1% alone as first-line antifungal therapy against *Candida albicans* keratitis. *Ann Pharmacother* 43(12):2103–107
- Al-Badriyeh D, Neoh CF, Stewart K and Kong D (2010) Clinical utility of voriconazole eye drops in ophthalmic fungal keratitis. *Clinical Ophthalmology* 4:391–405
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molekular Biology of the Cell*. Gerland Science, 4. Auflage ISBN 0-8153-4072-9
- Audus KL, Bartel RL, Hidalgo IJ, Borchardt RT (1990) The Use of Cultured Epithelial and endothelial Cells for Drug Transport and Metabolism Studies. *Pharm. Res.* 7 (5):435-51
- Bang S, Edell E, Eghrari AO, Gottsch JD (2010) Treatment with voriconazole in 3 eyes with resistant *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 149(1):66-9
- Beck T, Langhage P (1995) Auge und visuelles System. *Pharmazeutische Zeitung*, 140:51-2
- Behrens-Baumann W (2009) Diagnostik und Therapie der Keratomykose. *Ophthalmologe*106: 471-481
- Bertelmann E, Knapp S, Rieck P, Keipert S, Hartmann C, Pleyer U (2003) Transkornealer-parakornealer Penetrationsweg für lokal applizierte Pharmaka am Auge. *Ophthalmologe* 100:696–701
- Bhatia SK, Yetter AB (2008) Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. *Cell Biol Toxicol Jul*;24(4):315-19
- Borenfreund E, Puerner JA (1985) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Meth Cell Sci* 9 (1), 7-9

Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N (1988) Comparisons of two In Vitro Cytotoxicity Assays – The Neutral Red (NR) And Tetrazolium MTT Test. *Toxicol In Vitro* 2(1):1-6

Breit S, Hariprasad S, Mieler W, Shah G, Mills M and Grand M (2005) Management of endogenous fungal endophthalmitis with voriconazole and caspofungin. *Am J Ophthalmol* 139(1):135–40

Brewster ME and Loftsson T (2007) Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv Rev.* 59:645-66

Burgalassi S, Monti D, Brignoccoli A, Fabiani O, Lenzi C, Pirone A, Chetoni P (2004) Development of Cultured Rabbit Corneal Epithelium for Drug Permeation Studies : A Comparison with Excised Rabbit Cornea. *J Ocul Pharmacol Therap* 20(06):518-32

Burstein NL, Anderson JA (1985) Review: Corneal Penetration and Ocular Bioavailability of Drugs. *J Ocul Pharmacol* 1 (3):309-26

Chalabi RGE (1996) Primär- und Subkultur humaner zentraler Corneaepithelzellen, Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

Clode A, Davis J, Salmon J, Michau T and Gilger B (2006) Evaluation of concentration of voriconazole in aqueous humor after topical and oral administration in horses. *Am J Vet Res* 67(2):296–301

Cursiefen C (2007) Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy* 92:50-7

Döhring S (2009) Entwicklung und Charakterisierung von organotypischen Cornea-Konstrukten mit unterschiedlichen Epithelien für In-vitro-Permeations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen, Dissertation, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Dupuis A, Tournier N, Le Moal G and Venisse N (2009) Preparation and stability of voriconazole eye drop solution. *Antimicrob Agents Chemother* 53(2):798–99

Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N and Funderburgh JL (2005) Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells.* 23:1266-75

El-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponec M (2002) Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *Br J Dermatol* 147:230-43

Engelmann K, Böhnke M, Friedl P (1988) Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:1656-62

Espinel-Ingroff A, Johnsons E, Hockey H and Troke P (2008) Activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B in vitro against 590 moulds from 323 patients in the voriconazole Phase III clinical studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61:616–20

Forbes B (2000) Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies, *Pharm Sci & Technol Today* 3(1):18-27

Foster CS, Lass JH, Moran-Wallace K, Giovanoni R (1981) Ocular toxicity of topical antifungal agents. *Arch Ophthalmol* 99(6):1081–84

Frank C (2010) Quervernetzte Hyaluronsäure als Glaskörper, Dissertation, Universität Tübingen

Freeman PD, Kahook MY (2009) Preservatives in topical ophthalmic medications: Historical and practical review of benzalkonium chloride. *Expert Rev Ophthalmol* 4(1):59-64.

Freshney RI (1990) Tierische Zellkulturen. Ein Methoden- Handbuch. De Gruyter, Berlin

Freshney RI (2005) Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique, Wiley-Liss, 5. Auflage

Fridkin SK and Jarvis WR (1996) Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9:499-511

Gao H, Pennesi M, Shah K, Qiao X, Hariprasad SM, Mieler W, Wu S, and Holz ER (2004) Intravitreal voriconazole: an electroretinographic and histopathologic study. *Arch Ophthalmol* 122:1687-92

Haller Schober EM (2010) Augenmykosen-mykotische-Keratitis-und-mykotische-Endophthalmitis, Infektiologie-Hygiene. Universimed, Jatro Infektiologie 4:|24-|25.

Han SB, Shin YJ, Hyon JY, Wee WR (2011) Cytotoxicity of Voriconazole on Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother* 55(10):451-9

Hariprasad SM, Mieler WF, Lin TK, Sponsel WE, Graybill JR (2008) Voriconazole in the treatment of fungal eye infections: a review of current literature. *Br J Ophthalmol* 92:871-78

Henkel J (2010) Voriconazolplasma Spiegel nach enteraler Applikation als Emulsion bei abdominalchirurgischen, postoperativen Intensivpatienten, Dissertation, Medizinischen Hochschule Hannover

Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PF and de Pauw B (2002) Voriconazol versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 347: 408-15

Herbrecht R, Nivoix Y, Fohrer C (2005) Management of systemic fungal infections : alternatives to itraconazole. *J Antimicrob Chemo* 56:i39-i48

Hoevel MM (2007) Untersuchung zur pharmakokinetischen Variabilität des Fungistatikums Voriconazol, Dissertation, Universität Heidelberg

Hopkins G, Pearson R (2007) Ophthalmic Drugs – Diagnostic and Therapeutic Uses, Elsevier, 5. Auflage

Huang AJW, Tseng SCG, Kenyont KR (1989) Paracellular Permeability of Corneal and Conjunctiva.Epithelia; *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 (4):684-89

Huang HS, Schoenwald RD, Lach JL (1983) Corneal Penetration Behavior of beta-Blocking Agents III: Assessment of Barrier Contributions. *J Pharm Sci* 72(17):1272-79

Hyland R, Jones BC and Smith DA (2003) Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. *Drug Metab Dispos* 31:540-47

Imhof A, Schneemann M and Schaffner A (2005) Medikamente zur Therapie von invasiven Pilzinfektionen. *Schweiz Med Forum* 5:136-44

Irie T and Uekama, K (1997) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 3. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sciences* 86:147-62

Jelinek A (2001) In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Jeu L, Piacenti FJ, Lyakhovetskiy AG and Fung HB (2003).Voriconazole. *Clinical Therapeutics* 25, 1321–81

Johnson LB, and Kauffman CA (2003) Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* 36:630-7

Jones A and Muhtaseb M (2008) Use of voriconazole in fungal keratitis. *J Cataract Refract Surg* 34(2):183–84

Jtirvinen K, Urtili A. Ocular absorption following topical delivery. *Adv Drug Del Rev.* 1995;16(1):3–19.

Jurkunas U, Langston D and Colby K (2007) Use of voriconazole in the treatment of fungal keratitis. *Int Ophthalmol Clin* 47(2):47–59

Kanski JJ and Spitznas M (1987) *Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie*, 1. Auflage Thieme-Verlag, Stuttgart, New York

Kernt M and Kampik A (2009) Intracameral voriconazole: in vitro safety for human ocular cells. *Toxicology* 258:84-93

Kernt M, Neubauer AS, De Kaspar HM and Kampik A (2009) Intravitreal voriconazole: in vitro safety-profile for fungal endophthalmitis. *Retina* 29:362-70

Kinsey A (1983) Die Permeabilität der Hornhaut. In: Dolder R, Skinner FS (Hrsg) *Ophthalmika – Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Klein S and Zöller T (2008) Cyclodextrine, Molekulare Zuckertüten für Arzneistoffe. *Pharmazeutische Zeitung online*, Ausgabe 26

Klein S and Zöller T (2008) Cyclodextrine, Wundertüten in Pharmazie und Alltag *Pharmazeutische Zeitung online*, Ausgabe 28

Klont R, Eggink C, Rijs A, Wesseling P, Verweij P (2005) Successful treatment of *Fusarium* keratitis with cornea transplantation and topical and systemic voriconazole. *Clin Infect Dis* 40(12):e110–e112.

Koch S, Haefner H, Huenger F, Haase G, Wildberger J and Lemmen SW (2005) Diagnostik und Therapie invasiver Pilzinfektionen auf der Intensivstation. *Der Anaesthesist* 54:1047-66

Kramer M, Kramer MR, Blau H, Bishara J, Axer-Siegel R and Weinberger D (2006) Intravitreal voriconazole for the treatment of endogenous *Aspergillus* endophthalmitis. *Ophthalmology* 113:1184-6.

Lanaspa M, Pouz L, Diaz de Heredia C, Bastida P, Olivé T, Pujol M, Soler P, Martín A, Rosellós E, Sanchez de Toledo J and Figueras C (2009) Therapeutic Drug Monitoring in the treatment of invasive Fungal Infection with Voriconazole in Children. *ICAAC* GI-1545

Lau D, Fedinands M, Leung L, Fullinfaw R, Kong D, Davies G, Daniell M and Franzco F (2008) Penetration of voriconazole, 1%, eyedrops into human aqueous humor: A prospective open-label study. *Arch Ophthalmol* 126(3):343–46

Leveque D, Nivoix Y and Herbrecht R (2006) Clinical pharmacokinetics of Voriconazole. *Int J Antimicrob Agents* 27:274–84

Leydhecker W (1990) *Augenheilkunde*, Springer Verlag, Berlin, 24. Auflage

- Lin RC, Sanduja N and Hariprasad SM (2008) Successful treatment of postoperative fungal endophthalmitis using intravitreal and intracameral voriconazole. *J Ocul Pharmacol Ther* 24:245-8.
- Lindl T (2002) *Zell und Gewebekultur*, Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer Heidelberg Berlin, 5. Auflage, S. 73-137
- Loftsson T and Duchene D (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 329:1-11
- Loftsson T and Stefansson E (2002) Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye. *Acta Ophthalmol. Scand* 80, Nr. 2:144-50
- Masche UP (2004) Caspofungin und Voriconazol. Zwei neue Antimykotika. *pharma-kritik* ISSN 1010-5409, Jahrgang 26 Nr. 2
- Meyer P (2006) *Mykotische Infektionen der Kornea*. Universitäts-Augenklinik Basel. S. 12
- Morell M, Fraser VJ, Marin H, Kollef (2005) Delaying the Empiric Treatment of Candida Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality. *Antimicrob Agents. Chemother* 49 (9); 3640-5
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63
- Niederman MS (2006) Use of Broad-Spectrum Antimicrobials for the Treatment of Pneumonia in Seriously Ill Patients: Maximizing Clinical Outcomes and Minimizing Selection of Resistant Organisms. *Clin Infect Dis* 42:72-81
- Nolla-Salas J, Sitges-Serra A, Leon-Gil C, Martinez-Gonzalez J, et al. (1997) Candidemia in non-neutropenic critically ill patients: analysis of prognostic factors and assessment of systemic antifungal therapy. Study group of fungal infection in the ICU. *Intensive Care Med* 23:23-30
- Nulens E, Eggink C, Rijs AJMM, Wesseling P and Verweij PE (2003) Keratitis caused by *Scedosporium apiospermum* successfully treated with a cornea transplant and voriconazole. *J Clin Microbiol* 41(5):2261-64
- Ozbek Z, Kang S, Sivalingam J, Rapuano CJ, Cohen EJ and Hammersmith KM (2006) Voriconazole in the management of *Alternaria* keratitis. *Cornea* 25:242-44
- Pfizer GmbH, Gebrauchsinformation Vfend (2010) 200mg Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung

Polizzi A, Siniscalchi C, Mastromarino A and Sacca S (2004) Effect of voriconazole on a corneal abscess caused by fusarium. *Acta Ophthalmol Scand* 82(6):762–64

Prajna NV, Mascarenhas J, Krishnan T, Reddy PR, Prajna L, Srinivasan M, Vaitilingam CM, Hong KC, Lee SM, McLeod SD, Zegans ME, Porco TC, Lietman TM, Acharya NR (2010) Comparison of natamycin and voriconazole for the treatment of fungal keratitis. *Arch Ophthalmol* 128:672-8

Prajna NV, Krishnan T, Mascarenhas J, Rajaraman R, Prajna L, Srinivasan M, Raghavan A, Oldenburg CE, Ray KJ, Zegans ME, McLeod SD, Porco TC, Acharya NR, Lietman TM (2013) The Mycotic Ulcer Treatment Trial: a randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. *Arch Ophthalmol* 131:422-9

Prajna NV, O'Brien KS, Acharya NR, Lietman TM (2013) Voriconazole for Fungal Keratitis. *Ophthalmology* 120(9):.doi10.1016/j.ophtha.2013.06.016

Prats CH, Tello FL, Jose ABS, Otaolaurruchi JS and Baines JPO (2004) Voriconazole in fungal keratitis caused by *Scedosporium apiospermum*. *Ann Pharmacother* 38(3):414-17

Prausnitz MR, Noonan JS (1998) Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J Pharm Sci* 87:1479-88

Purkins L, Wood N, Ghahramani P, Love ER, Eve MD, Fielding A (2003) Coadministration of voriconazole and phenytoin: pharmacokinetic interaction, safety, and toleration. *Br J Clin Pharmacol Dec*;56 Suppl 1:37-44.

Reichl S (2003) Entwicklung porciner und humaner organotypischer cornealer Zellkulturmodelle für in vitro Permeationsuntersuchungen, Dissertation, TU Braunschweig

Reis A, Sundmacher R, Tintelnot K, Agostini H, Jensen HE and Althaus C (2000) Successful treatment of ocular invasive mould infection (fusariosis) with the new antifungal agent voriconazole. *Br J Ophthalmol* 84:932-3

Sachsenweger M., *Augenheilkunde*, Thieme, Stuttgart, 2. Auflage, S.100-29, 2002.

Scaife MC (1985) An In Vitro Cytotoxicity Test To Predict The Ocular Irritation Potential Of Detergents and Detergent Products. *Food Chem Toxic* 23 (2):253-258

Sharma N, Chacko J, Velpandian T, Titiyal JS, Sinha R, Satpathy G, Tandon R, Vajpayee RB (2013) Comparative evaluation of topical versus intrastromal

voriconazole as an adjunct to natamycin in recalcitrant fungal keratitis. *Ophthalmology* 120:677-81

Schmitz S (2011) *Der Experimentator Zellkultur*, Spektrum, Akademischer Verlag Heidelberg, 3. Auflage, S. 35-214

Schwarz LR (1996) Cytotoxizität. *Toxikologie* (Hrsg.: Greim/Demel), Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, S. 117-34

Sen P, Gopal L and Sen PR (2006) Intravitreal voriconazole for drugresistant fungal endophthalmitis: case series. *Retina* 26:935-9

Sharif NA, Wiernas TK, Howe WE, Griffin BW, Offord EA, Pfeifer AM (1998) Human corneal epithelial cell functional responses to inflammatory agents and their antagonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2562-2571

Shen YC, Wang MY, Wang CY, Tsai TC, Tsai HY, Lee HN and Wei LC (2009) Pharmacokinetics of intracameral voriconazole injection. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2156-7

Scholz M (2009) *Klinische Untersuchung der Pharmakokinetik, der Bioverfügbarkeit und des Metabolismus des Antimykotikums Voriconazol*. Dissertation. Universität Heidelberg

Smith J, Safdar N, Knasinski V, Simmons W, Bhavnani SM, Ambrose PG and Andes D (2006) Voriconazole therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4):1570-72

Sponsel W, Chen N, Dang D, Paris G, Graybill, Najvar LK, Zhou L, Lam KW, Glickman R and Scribbick (2006) Topical voriconazole as a novel treatment for fungal keratitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(1):262–68

Stern G, Buttross M (1991) Use of corticosteroids in combination with antimicrobial drugs in the treatment of infectious corneal disease. *Ophthalmology* 98(6):847–53

Theuretzbacher U, Ihle F and Derendorf H (2006) Pharmacokinetic/ pharmacodynamic profile of voriconazole. *Klinikal Pharmacokinet* 45(7): 649-63

Thews G, Mutschler E, Vaupel P (1999) *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 5. Auflage, S. 729-30

Thiel MA, Zinkernagel AS, Burhenne J, Kaufmann C and Haefeli WE (2007) Voriconazole concentration in human aqueous humor and plasma during topical or combined topical and systemic administration for fungal keratitis. *Antimicrob Agents Chemother* 51(1):239–44

Thygeson P (1939) Cultivation in vitro of human conjunctival and corneal epithelium. *Am J Ophthalmol* 22:649-54

Tu E, Mc Cartney D, Beatty R, Springer K, Levy J and Edward D (2007) Successful treatment of resistant ocular fusariosis with posaconazol. *AM J Ophthalmol* 143(2):22-27

Tu E (2009) *Alternaria* keratitis: Clinical presentation and resolution with topical fluconazole or intrastromal voriconazole and topical caspofungin. *Cornea* 28(1):116–19

Ueda K, Nannya Y, Kumano K, Hangaishi A, Takahashi T, Imai Y and Kurokawa M (2009) Monitoring trough concentration of voriconazole is important to ensure successful antifungal therapy and to avoid hepatic damage in patients with hematological disorders. *Int J Hematol* 89(5):592-9

Vfend [Package insert]. New York, NY: Pfizer Inc.; March 2008.

Vemulakonda GA, Hariprasad SM, Mieler WF, Prince RA, Shah GK and Van Gelder RN (2008) Aqueous and vitreous concentrations following topical administration of 1% voriconazole in humans. *Arch Ophthalmol* 126(1):18-22

Weitz B (1998) *Atlas der Anatomie – Organsysteme und Strukturen in 439 Abbildungen*, Weltbild Verlag

Whitcher J, Srinivasan M, Upadhyay M (2001) Corneal blindness: A global perspective. *Bull World Health Organ.* 79(3):214–21

Yörük E. (2009), *Korneale Biokompatibilität von Off Label Medikamenten in der Ophthalmologie*, Habilitationsschrift Universität Tübingen.

7.) Erklärungen zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Biokompatibilität von Voriconazol (Vfend[®]) auf humane korneale Epithelzellen“, ohne unzulässige Hilfe, selbständig verfasst und nur unter Nutzung der in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die sämtlichen Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglied Johanna Hofmann, von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Unterstützung durch Bianka Sobolewska, durch mich.

Ich habe die Dissertation bisher keiner anderen Hochschule zur Promotion eingereicht. Zudem versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

8.) Veröffentlichung

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Sobolewska B.*, Guerel G.*, Hofmann J., Tarek B., Bartz-Schmidt K. U., Yoeruek E.; Cytotoxic Effect of Voriconazole on Human Corneal Epithelial Cells; Ophthalmic Research; 06/2015 54(1), 41-47; DOI: 10.1159/000371712

9.) Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. E. Yörük für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei dessen Bearbeitung sowie die herzliche Betreuung danken.

Ich möchte mich bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Breunigerbaus für die besonders freundliche Atmosphäre, für ihre wertvollen Ratschläge und die hilfreiche Unterstützung bedanken.

Speziell möchte ich Frau J. Hoffman, Frau M. Rittgarn, Frau Dr. B. Sobolewska und Frau Dr. S. Julien sowie Herr Dr. I. Kaya für ihre tolle Unterstützung meinen Dank aussprechen.

Ein besonderer Dank gebührt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mir stets den Rücken gestärkt und mich tatkräftig unterstützt haben. Ihre Unterstützung und ihr Vertrauen bilden die Grundlage für mein Studium der Zahnmedizin und zur Fertigstellung dieser Promotionsarbeit.