

Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

**Elektrophysiologische Prüfung verschiedener
Konzentrationen von Tempol am Modell der isolierten
und umströmten Vertebratennetzhaut**

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

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

vorgelegt von

Dollinger, Rebecca Natalie

2020

Dekan (komm.):

Professor Dr. D. Wallwiener

1. Berichterstatter:

Professor Dr. K. Januschowski

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. K. Stingl

Tag der Disputation:

18.05.2020

“Per aspera ad astra”

(Seneca)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Einleitung	7
1.1 Oxidativer Stress.....	11
1.2 Relevante Krankheitsbilder am Auge	12
1.3 Tempol	17
1.4 Elektrophysiologische Grundlagen.....	22
1.4.1 Aufbau und Funktion der Retina	22
1.4.2 Das ERG	24
1.4.3 Das ERG im Versuchsmodell	30
2. Ziel der Arbeit.....	31
3. Material und Methoden.....	32
3.1 Gewinnung und Präparation der isolierten Retina.....	33
3.2 Perfusionskammer	34
3.3 Perfusionslösung.....	35
3.4 Versuchsaufbau	36
3.5 Versuchsprotokoll.....	38
3.6 Ableitung und Interpretation des ERGs.....	41
3.7 Ergebnisverarbeitung	43
4. Ergebnisse	44
4.1 Konzentration von 0,5 mM Tempol in Kombination mit O ₂	44
4.1.1 Auswirkung auf die b-Welle	44
4.2 Konzentration von 1mM Tempol in Kombination mit O ₂	45
4.2.1 Auswirkung auf die a-Welle	45
4.2.2 Auswirkung auf die b-Welle	46

4.3 Konzentration von 2mM Tempol in Kombination mit O ₂	47
4.3.1 Auswirkung auf die a-Welle	47
4.3.2 Auswirkung auf die b-Welle	48
4.4 Konzentration von 5mM Tempol in Kombination mit O ₂	49
4.4.1 Auswirkung auf die a-Welle	49
4.4.2 Auswirkung auf die b-Welle	50
4.5 Konzentration von 10mM Tempol in Kombination mit O ₂	51
4.5.1 Auswirkung auf die a-Welle	51
4.6 Hypoxietestung (ohne Tempol, N ₂ oder O ₂)	52
4.6.1 Auswirkung auf die a-Welle	52
4.7 Hypoxietestung in Kombination mit N ₂ (ohne Tempol und O ₂).....	53
4.7.1 Auswirkung auf die a-Welle	53
4.8 Ergebnisauswertung.....	54
4.8.1 Auswirkung der Konzentrationen von Tempol auf die b-Welle	54
4.8.2 Auswirkung der Konzentrationen von Tempol auf die a-Welle	60
4.8.3 Auswirkung der Hypoxietestung auf die a-Welle.....	64
5. Diskussion.....	67
5.1 Tempol als neuroprotektive Substanz	67
5.2 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Wirkung von Tempol auf das ERG	70
5.3 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Hypoxietestung auf das ERG	71
5.4 Vor- und Nachteile eines in-vitro Modells anhand der isolierten und perfundierten Vertebratenretina	72
5.5 Weitere bovine Versuchsmodelle in der Ophthalmologie	75
5.6 Tempol in der klinischen Anwendung – ein Ausblick.....	76
6. Zusammenfassung	78
7. Literaturverzeichnis.....	80

8. Erklärung zum Eigenanteil.....	91
9. Veröffentlichung	92
10. Danksagung	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stufen der retinalen Pathologie.....	9
Abbildung 2: Redoxreaktion von Tempol.....	19
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Netzhaut.	22
Abbildung 4: ERG Ableitungen einer narkotisierten Katze (Granit 1933).....	25
Abbildung 5: ERG eines Rochens (Pepperberg, Brown et al. 1978).....	26
Abbildung 6 : ERG Ableitung beim Menschen (a-. b- und c-Welle).	27
Abbildung 7: ISCEV Protokoll.	29
Abbildung 8: a-Welle und b-Welle in Labview ®.	30
Abbildung 9: Trägermodell für die perfundierte Retina nach Januschowski und Lücke.....	34
Abbildung 10: Aufbau des Modells der isolierten und perfundierten Retina.....	37
Abbildung 11: Protokoll eines Versuches der isolierten und perfundierten Retina.....	38
Abbildung 12: a-Welle in Labview ®.	42
Abbildung 13: b-Welle in Labview ®.	42
Abbildung 14: b-Wellen bei Exposition von 0,5mM Tempol.....	44
Abbildung 15: a-Wellen bei Exposition von 1mM Tempol.....	45
Abbildung 16: b-Wellen bei Exposition von 1mM Tempol.....	46
Abbildung 17: a-Wellen bei Exposition von 2mM Tempol.....	47
Abbildung 18: b-Wellen bei Exposition von 2mM Tempol.....	48
Abbildung 19: a-Wellen bei Exposition von 5mM Tempol.....	49
Abbildung 20: b-Wellen bei Exposition von 5mM Tempol.....	50
Abbildung 21: a-Wellen bei Exposition von 10mM Tempol.....	51
Abbildung 22: a-Wellen mit Hypoxie, ohne Exposition von Tempol.	52
Abbildung 23: a-Wellen mit Hypoxie, ohne Exposition von Tempol.	53

Abbildung 24 : b-Wellen verschiedener Tempol Konzentrationen.	55
Abbildung 25: Messpunkte zeigen die Amplitude der b-Welle bei verschiedenen Konzentrationen zum Zeitpunkt 70.min.	56
Abbildung 26 : a-Wellen verschiedener Tempol Konzentrationen.	61
Abbildung 27: Messpunkte zeigen die Amplitude der a-Welle bei verschiedenen Konzentrationen zum Zeitpunkt 70. min.	61
Abbildung 28: Messpunkte zeigen die gemittelte Amplitude der a-Welle bei verschiedenen Konzentrationen im Zeitfenster der 115.-170.min.....	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Produktinformation von Tempol.	18
Tabelle 2: Berechnungen der Ansätze für versch. Tempolkonzentrationen in der Sickellösung.	40
Tabelle 3: Prozentuale Veränderung der gemittelten Amplituden und p-Werte der b-Welle bei den Endpunkten vor dem Auswaschen (70. min) und am Ende des Auswaschens (170. min) gegenüber dem Ausgangswert (25. min).....	55
Tabelle 4: Mittelwert (mean) und Standardabweichung (SD) der ERG b-Welle Amplitude.....	59
Tabelle 5: Prozentuale Veränderung der gemittelten Amplituden und p-Werte der a-Welle bei den Endpunkten vor dem Auswaschen (70. min) und am Ende des Auswaschens (170. min) gegenüber dem Ausgangswert (25. min).....	60
Tabelle 6: Mittelwert (mean) und Standardabweichung (SD) der ERG a-Welle Amplitude.....	63
Tabelle 7: Prozentuale Veränderung der gemittelten Amplituden und p-Werte der a-Welle bei den Endpunkten vor dem Auswaschen (70. min) und am Ende des Auswaschens (170. min) gegenüber dem Ausgangswert (25. min).....	65
Tabelle 8: Mittelwert (mean) und Standardabweichung (SD) der ERG a-Welle Amplitude.....	66

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGE	Advanced Glycation Endproduct
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
AREDS	Age-Related Eye Disease Study
BCOP	Bovine Cornea Opacity Permeability Test
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Kalziumchlorid Dihydrat
CAS	Chemical Abstracts Service
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	diabetische Retinopathie
ERG	Elektroretinogramm
ETDRS	Early Therapy Diabetic Retinopathy Study
et al.	et alii, et aliae oder et alia = und andere
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Hydrolaseenzym, welches an GTP bindet und es zu GDP hydrolysiert
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICG	Indocyaningrün
IRMA	intraretinale mikrovaskuläre Anomalien
ISCEV	International Society for Clinical Electrophysiology of Vision
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LDH	L-Lactatdehydrogenase
mean	Mittelwert
mfERG	Multifokales Elektroretinogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgCl ₂ •6H ₂ O	Magnesiumchlorid Hexahydrat
mg	Milligramm
min	Minuten
mM	Millimolar
ml	Milliliter
mlx	Millilux
mol	Stoffmenge Mol/molare Masse
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
μs	Mikrosekunde
μV	Mikrovolt
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NADP(H)	Nicotinamidadeninnukleotid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NPDR	nicht proliferative diabetische Retinopathie
O ₂	Sauerstoff
OCED	Organisation for Economic Co-operation and Development
OP	Operation
OSE	oxidation-specific epitopes
PC	Personal Computer

PDR	proliferative diabetische Retinopathie
pH	Potentia Hydrogenii = Maß für Wasserstoffionenaktivität/konzentration in einer Lösung
ppV	pars-plana-Vitrektomie
ROS	reactive oxygen species / reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinales Pigmentepithel
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZAV	Zentralarterienverschluss
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Bereits 2050 wird die Zahl der Menschen, die an einer Erkrankung der Netzhaut mit potentiell irreversibler Schädigung leiden, mehr als doppelt so hoch sein wie 2010. Diese Aussage bezieht sich auf Daten, erhoben in den USA (<http://www.nei.nih.gov/eyedata>). Zu diesen Erkrankungen gehören unter anderem die diabetische Retinopathie (DR), retinale Gefäßverschlüsse, die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) und das Glaukom. Bei allen oben genannten Erkrankungen spielt oxidativer Stress eine bedeutende Rolle für Veränderungen der retinalen Zellen, die bis zu einem Funktionsverlust führen können (Campochiaro 2015). Oxidativer Stress ist verbunden mit einer Hypoxie des Gewebes, welche primär in den inneren Netzhautschichten zu ischämischen Bereichen führt und sich durch Verlust der Zellen und Veränderung der Dicke abzeichnet (Schmid, Renner et al. 2014). Längere Hypoxiezeiten über 90 Minuten haben eine Schädigung der äußeren Netzhautschichten zur Folge (Hughes 1991).

Neuroprotektion zum Schutz vor einem irreversiblen neuronalen Zelluntergang ist daher ein sehr gefragtes Thema und stark erforschtes Gebiet in der Medizin in den letzten Jahrzehnten. Besonders am Auge als Teil des ausgelagerten zentralen Nervensystems ist Neuroprotektion von großer Bedeutung. Ein Netzwerk aus hochauflösenden Neuronen am Auge ist die Netzhaut, die auf eine optimale Sauerstoffzufuhr angewiesen ist.

Im Klinikalltag sieht man verschiedene Krankheitsbilder als Auslöser für einen definierten Bereich der Netzhautischämie. Am häufigsten ist das bei Diabetikern der Fall. Hier zeichnet sich ein regelrechter Teufelskreis ab, indem durch einen Ischämieerz neue, pathologische Gefäße entstehen, die jedoch durch ihre Gefäßwandinstabilität zur Leckage und wiederum zur nicht ausreichenden Sauerstoffversorgung führen (Kanski and Bowling 2012). Unzureichende Sauerstoffzufuhr führt zu einer reduzierten Funktion und kann in Folge zum Untergang von Netzhautzellen durch oxidativen Stress führen.

Weiterhin gibt es einen Fundus hypertonicus, der auf einen dauerhaft erhöhten Blutdruck und damit verbundene Gefäßveränderungen zurück zu führen ist. In schweren Fällen spricht man von einer hypertensiven Retinopathie. Auch arteriosklerotische Veränderungen der Gefäße, die zu einer Mangelversorgung der Netzhaut beitragen, sind meist Folge einer systemischen Erkrankung wie Diabetes oder arterielle Hypertonie (Resch, Suveges et al. 2013). Diese können zu retinalen Arterienverschlüssen führen. Ein akuter, meist irreversibler Visusverlust, von welchem sich nur 8% über die Zeit wieder erholen, ist die Folge (Varma, Cugati et al. 2013). Auch Verschlüsse der Venen oder gemischte Formen bei einem okulären Ischämiesyndrom können auftreten.

Im Alter sinkt die Produktion der Antioxidantien und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden sich, oxidativer Stress entsteht (Golden, Hinerfeld et al. 2002). AMD ist eine Augenerkrankung der älteren Bevölkerungsgruppe. Sie wird in eine trockene und eine feuchte Form eingeteilt. Die trockene AMD zeichnet sich durch Drusen und einen deutlich reduzierten Visus aus (Bhutto and Luty 2012). Drusen bestehen hauptsächlich aus Lipofuscin, welches sich als Zellmetabolit in der Netzhaut ablagert, wenn mehr vorhanden ist als vom retinalen Pigmentepithel (RPE) abgebaut werden kann (Sparrow and Boulton 2005). Das RPE ist aufgrund seines hohen Sauerstoffverbrauchs und der ständigen Lichtexposition sehr anfällig für die Ausbildung von ROS. Drusen sind ein Zeichen für eine RPE Degeneration. Die feuchte AMD zeichnet sich durch choroidale Neovaskularisationen aus. Das sind brüchige Gefäße, die sich innerhalb der Bruchmembran oder unter dem RPE bilden. Es kommt zu Blutungen aus den Gefäßen, die eine akute Sehminderung verursachen (Masuda, Shimazawa et al. 2017). Oxidativer Stress, der vom Körper nicht adäquat beseitigt wird, kann zu pathologisch veränderten Proteinen, Lipiden und DNA führen, welche zu strukturellen Molekülveränderungen führen. Diese neuen Modifikationen führen zu ‚oxidation-specific epitopes‘ (OSE), welche in der Makula bei AMD Patienten zu finden sind (Datta, Cano et al. 2017).

Eine akute Form der Hypoxie, bei der die Versorgung der Netzhaut mit Sauerstoff nicht mehr gewährleistet ist, ist die Netzhautablösung. Hierbei wird

die neuronale Schicht vom Pigmentepithel abgelöst. Die Ablösung wird meist hervorgerufen durch einen Riss oder ein Loch in der peripheren Netzhaut. In seltenen Fällen kann sie auch durch eine Flüssigkeitseinlagerung unterhalb der Netzhaut auftreten (Kanski and Bowling 2012).

Darüber hinaus hat man festgestellt, dass oxidativer Stress auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung von chronisch neurodegenerativen Krankheiten spielt. Darunter fällt zum Beispiel eine Schädigung des Sehnervs, wie das bei einem Glaukom der Fall sein kann. Als Folge degenerieren retinale Ganglienzellen (Yoles and Schwartz 1998).

Das Glaukom und auch die Netzhautablösung haben einen Anstieg der Glutamatkonzentration gemeinsam (Dreyer, Zurakowski et al. 1996, Diederer, La Heij et al. 2006, Bertram, Bula et al. 2008). Auch bei der diabetischen Retinopathie ließ sich ein Anstieg von Glutamat erkennen (Ambati, Chalam et al. 1997). Glutamat ist unter physiologischen Bedingungen ein natürlicher Botenstoff zwischen den Synapsen im kompletten zentralen Nervensystem und der inneren Netzhautschichten (Ientile, Macaione et al. 2001, Mali, Cheng et al. 2005). Ein übermäßiger Anstieg des Neurotransmitters Glutamat führt jedoch zur Exzitotoxizität aufgrund der ständigen Reizüberflutung und in Folge zur Apoptose der Nervenzelle (Vorwerk, Naskar et al. 2000).

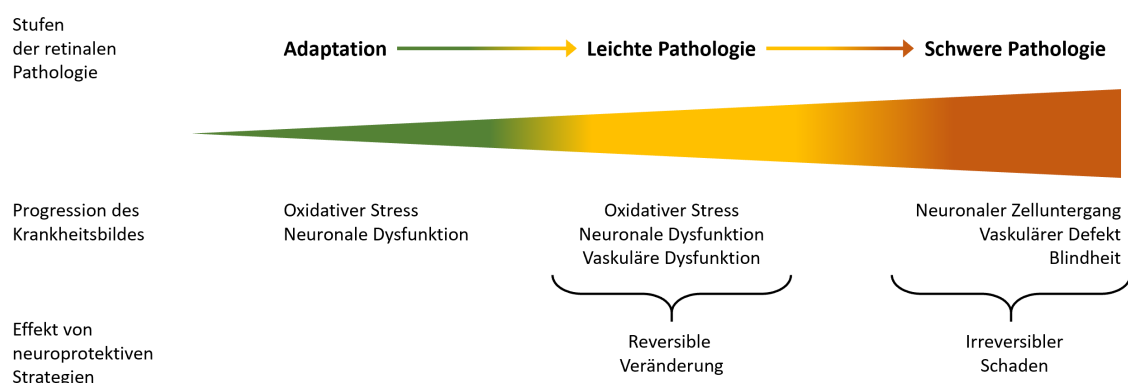


Abbildung 1: Stufen der retinalen Pathologie.
Quelle: eigene Darstellung, modifiziert nach (Pardue and Allen 2018)

Um einen Erhalt des Sehapparates bei den oben genannten Erkrankungen zu gewährleisten, sollte am besten früh eine ursächliche Therapie für das jeweilige Krankheitsbild begonnen werden. Erkrankungen an der Netzhaut schreiten bei den meisten Patienten langsam über Monate bis Jahre voran (Abb1.). Das erste Stadium einer retinalen Pathologie stellt oxidativer Stress und neuronale Dysfunktion dar. In diesem Stadium werden einige endogene Abwehrmechanismen aktiviert, um das interzelluläre Gleichgewicht im betroffenen Gewebe aufrechtzuerhalten. Bei Fortschreiten der Erkrankung bricht das Abwehrsystem zusammen, oxidativer Stress nimmt zu und zur neuronalen Dysfunktion kommt eine vaskuläre Dysfunktion hinzu. Bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung ohne Therapie kommt es zu einer irreversiblen Schädigung mit vaskulären Defekten wie Blutungen und Neurovaskularisationen, die bis hin zur Erblindung führen können (Pardue and Allen 2018). Leider kommen Patienten meist in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung in die Klinik, da sie dann auch über eine Sehverschlechterung klagen. Das macht Studien mit neuroprotektiven Substanzen nicht einfach, da zu diesem späten Zeitpunkt kaum eine subjektive Besserung zu erzielen ist.

Zudem ist bei einer Operation von einer zusätzlich schädlichen Beeinträchtigung durch mechanische Einflüsse, helle Lichtoptiken oder schnelle Flussraten durch die Perfusionslösungen auszugehen. All diese Faktoren verursachen zusätzlichen Stress auf die Netzhaut, welche einen neurotoxischen Schaden bedingen können (Januschowski, Maddani et al. 2012, Schultheiss, Januschowski et al. 2013, Januschowski, Irigoyen et al. 2018). Somit ist es von äußerster Wichtigkeit, die Therapie mit Beginn der pathologischen Kaskade zu starten.

Um einem drohenden Untergang von Netzhautzellen bei fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung schnell Abhilfe zu leisten, bedarf es neuer Ansätze. Ziel ist es eine Therapie zu finden, die auch zügig wirken kann, um beispielsweise die Zeit bis zur Wirkung einer Intervention wie einer Lysetherapie bei Zentralarterienverschluss oder einer Pars-Plana-Vitrektomie (ppV) bei Netzhautablösung zu überbrücken und somit möglichst viele Zellen vor dem

Untergang zu bewahren. Eine entsprechende Maßnahme ist die Neuroprotektion des betroffenen Gewebes. Auch mit Einsetzen einer neuroprotektiven Therapie zu einem früheren Zeitpunkt erzielt man den besten Erfolg im Erhalt von neuronalen Zellen. Zu diesem Zeitpunkt kann eine Neuroprotektion die Veränderungen im Gewebe wieder beseitigen und vor einem Verlust des Sehens bewahren. Der in dieser Arbeit untersuchte Stoff Tempol ist ein Kandidat für einen solchen neuroprotektiven Therapieansatz.

1.1 Oxidativer Stress

Eine wichtige Rolle beim Zelluntergang durch Apoptose spielt oxidativer Stress, der zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen und Nitroxiden führt (Beit-Yannai, Zhang et al. 1996, Lipman, Tabakman et al. 2006). Man spricht dabei von einem Ungleichgewicht zwischen Antioxidantien und Oxidantien, bei welchem die reaktiven Sauerstoffmoleküle und Nitroxide im Überschuss zur Entstehung des oxidativen Stresses beitragen. Die Sauerstoffradikale können sowohl endogen im Körper, als auch durch exogene Quellen entstehen. Zytostatika, inflammatorische Zytokine, Umwelttoxene, ionisierende Strahlung oder auch UV Licht sind mögliche exogene Quellen. Im Körper finden sich in den Mitochondrien unter anderem Cytochrom P450, Cytochrom-c Reduktase, Peroxisomen, Lipooxygenasen und NADPH-Oxidasen als mögliche Auslöser (Finkel and Holbrook 2000).

ROS können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Es gibt instabile Superoxidanionen und stabile Wasserstoffperoxide sowie Hydroxylradikale. Antioxidantien lassen sich ebenfalls in zwei Gruppen einteilen. Zum einen gibt es die Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase und zum anderen die nicht enzymatischen Stoffe wie die Vitamine E und C, Glutathion und β -Carotin. Enzyme neutralisieren die Sauerstoffradikale, während nicht enzymatische Stoffe Radikale durch Bindung in nicht aktive Komponenten umwandeln (Klaunig and Kamendulis 2004).

Oxidativer Stress führt zur Schädigung der DNA und zu molekularen Veränderungen von Proteinen und Lipiden (Finkel and Holbrook 2000).

Aus Aminosäuren können durch Oxidation mit ROS neue Protein-Protein Verbindungen oder Proteinspaltungen entstehen (Finkel and Holbrook 2000, Stadtman 2006). ROS kann durch Lipidperoxidation Membranen und DNA durch Einzelstrangbrüche und Veränderung der Zuckermoleküle schädigen. Körpereigene Reparaturmechanismen können dadurch außer Gefecht gesetzt werden (Sedelnikova, Redon et al. 2010).

Durch Veränderung von Transkriptionsfaktoren, Phosphatasen oder Kinasen können ROS auch verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen und in Alterungsprozesse oder Apoptosevorgänge eingreifen (Hekimi, Lapointe et al. 2011). So nehmen sie Einfluss in der Entstehung von vielen Erkrankungen (Valko, Leibfritz et al. 2007).

1.2 Relevante Krankheitsbilder am Auge

Diabetische Retinopathie:

Die diabetische Retinopathie ist eine der häufigsten Erkrankungen weltweit, die zur Erblindung im Erwerbstätigenalter führt und betrifft über 280 Millionen Menschen (Yau, Rogers et al. 2012). In Industrieländern ist sie sogar die häufigste Erkrankung, die bei Erwerbstätigen zu einem irreversiblen Verlust des Gesichtsfeldes führt (Grassi, Tikhomirov et al. 2012). Hauptursächlich für die Erkrankung sind die retinalen Gefäßveränderungen auf dem Boden der chronischen Hyperglykämie beim Diabetes. Es gibt eine Klassifikation nach der Early Therapy Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), die zwischen einer nicht proliferativen diabetischen Retinopathie (NPDR) und einer proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR) unterscheidet. Bei der NPDR gibt es eine Einteilung von sehr leicht über leicht, moderat und schwer bis sehr schwer. Anfangs sind am Fundus nur Mikroaneurysmen zu erkennen, dann können auch Exsudate, Netzhautblutungen oder Cotton-Wool-Herde entstehen. Wenn diese zunehmen spricht man bereits von einem moderaten Stadium. Bei der schweren NPDR gilt eine 4-2-1 Regel, die besagt, dass schwere Blutungen in allen vier Quadranten, Perlschnurvenen in mindestens zwei Quadranten und/oder intraretinale mikrovaskuläre Anomalien (IRMA) in mindestens einem

Quadranten vorhanden sein müssen (Kanski and Bowling 2012). Bei der PDR sind Neovaskularisationen erkennbar, die entweder an der Papille oder papillenfern liegen. Dies kann zu größeren Netzhautblutungen oder auch Blutungen in den Glaskörperraum führen, mit Entstehung von fibrovaskulären Strängen und als Folge eine Netzhautablösung verursachen. Makulaödeme können sich in jedem Stadium der diabetischen Retinopathie zeigen (Tang and Kern 2011). Es zeigte sich, dass oxidativer Stress ursächlich für mikrovaskuläre Veränderungen beim Diabetes und vor allem bei der diabetischen Retinopathie ist (Cui, Xu et al. 2006). Bereits in den 90er Jahren konnte festgestellt werden, dass eine Verbindung besteht zwischen Hyperglykämie und der Anreicherung von Advanced Glycation Endproducts (AGE), welche bei der endogenen Glykation im Körper entstehen. Vermehrte AGEs führen zu Freisetzung von ROS und andersherum und verursachen so viele schädliche Veränderungen an Zellen und Gewebe im Rahmen des Diabetes (Mullarkey, Edelstein et al. 1990). Auch ist bekannt, dass bei Hyperglykämie das Level an SOD und anderen Antioxidantien im Körper erniedrigt und somit ein natürlicher Neutralisierer von Radikalen wie ROS nur vermindert vorhanden ist. Andere Untersuchungen zeigten, dass ROS verschiedene Kaskaden steuern, die zu einer vaskulären Entzündung und Veränderung der Funktion führen. Unter anderem nimmt ROS auch Einfluss auf die Entwicklung der Zelle, welche sich dann fehlerhaft ausbilden kann. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch oxidativen Stress mit Ausbildung von ROS, Hyperglykämie oder vielen anderen proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α oder IL-1 β , ausgelöst. Als wichtiger Mediator des Immunsystems führt er zur Ausbildung von Diabetes und arteriosklerotischen Gefäßveränderungen. Auch die Produktion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) wird durch Hypoxie, Hyperglykämie, AGE und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B initiiert (Evans, Goldfine et al. 2002).

Retinale Gefäßverschlüsse:

Die folgenreichste Form eines retinalen Gefäßverschlusses ist vermutlich der Zentralarterienverschluss (ZAV), der hier exemplarisch dargestellt werden soll. Er ist einem akuten Schlaganfall im Auge gleichzusetzen und in vielen Fällen ein Vorbote für einen cerebralen Apoplex (Varma, Cugati et al. 2013). Risikofaktoren sind dieselben wie bei einem Apoplex oder einem Myokardinfarkt. Die häufigste Ursache ist eine Arteriosklerose, die durch Verschluss des Gefäßes zu einer Ischämie im zu versorgenden Gebiet führt (Varma, Cugati et al. 2013). Die Retina hat bei einer akuten Ischämie nur eine gewisse Toleranzzeit bevor Nervengewebe irreversibel geschädigt wird. Man fand heraus, dass sich bereits nach spätestens vier Stunden irreversible Veränderungen an der Netzhaut abzeichneten (Hayreh, Zimmerman et al. 2004). Bei einem kompletten Verschluss, der sich nicht selbst reperfundiert, kommt es bereits nach 15 Minuten zu einem Verlust von Nervengewebe (Tobalem, Schutz et al. 2018).

Auch retinale Venenverschlüsse führen zu einer Ischämie im Bereich der Netzhaut. Die führt zu einer vermehrten ROS Produktion, die noch nach Reperfusion des Gefäßes anhalten kann und zu einem Ganglienzelluntergang führen kann (Peters, Back et al. 1998). Venöse Gefäßverschlüsse sind oft auch mit einer diabetischen Retinopathie vergesellschaftet (Masuda, Shimazawa et al. 2017). Ursächlich für einen Gefäßverschluss ist oft auch eine erhöhte Blutviskosität, die durch eine Erythrozytendeformität verursacht sein kann. Hierfür kann oxidativer Stress in Erythrozyten mit ROS Produktion und Membranlipidperoxidation verantwortlich sein (Becatti, Marcucci et al. 2016). Beispielsweise spielen Antiphospholipidantikörper bei der Entstehung von venösen Gefäßverschlüssen eine Rolle, da hierdurch oxidativer Stress in endothelialen Zellen entsteht (Simoncini, Sapet et al. 2005).

Altersbedingte Makuladegeneration:

Die altersbedingte Makuladegeneration ist in den Industrienationen die häufigste Erblindungsursache. Es handelt sich um eine chronisch fortschreitende Erkrankung mit irreversiblen Verlust des retinalen Pigmentepithels (RPE) und der Photorezeptoren im Bereich der Makula, der Stelle der Netzhaut mit den dicht gepacktesten Photorezeptoren (Ung, Pattamatta et al. 2017). Risikofaktoren sind ein höheres Alter, Umwelteinflüsse wie UV-Licht, Nikotinkonsum, geringe Zufuhr von Antioxidantien, fettreiche Ernährung und eine genetische Disposition (Smith, Assink et al. 2001). All diese Faktoren können zu oxidativem Stress führen (Rahman and MacNee 1996, Smith and Hansch 2000). 40 Gene wurden bisher mit AMD in Verbindung gebracht, die für Proteine kodieren, welche eine Rolle in der Pathophysiologie des oxidativen Stresses spielen. Studien unterstützen die Hypothese, dass die Entstehung der AMD auf einen Schaden der mitochondrialen DNA zurückzuführen sei. Dies führe zu einer fehlgeleiteten Redoxreaktion der Mitochondrien, in Folge zu einer Funktionslosigkeit des RPEs und letztendlich zum Zelltod (Liang and Godley 2003). In einer genomweiten Assoziationsstudie konnte sogar ein Gen auf Chromosom 10 identifiziert werden, welches bei oxidativem Stress vermutlich betroffen ist, da es für mitochondriale Antioxidantien kodiert (Chandra, Mitry et al. 2014). Zu den Aufgaben des RPE gehört der Erhalt der Photorezeptoren und die Aufrechterhaltung der Choriokapillaris, indem täglich durch Phagozytose die Außensegmente der Photorezeptoren abgebaut werden. Weiterhin ist das RPE verantwortlich für die Lichtabsorption, Hitzeregulation, Vitamin A Metabolismus und den Ausstoß von VEGF für den Aufbau des Endothels der Choriokapillaris (Saint-Geniez, Kurihara et al. 2009). Somit entstehen aufgrund des hohen metabolischen Umsatzes im RPE auch jede Menge ROS in den Mitochondrien (Jager, Mieler et al. 2008). Die Makula ist aufgrund dessen eine der Stellen am menschlichen Körper mit dem höchsten Blutdurchfluss und großen Sauerstoffpartialdrücken (Winkler, Boulton et al. 1999).

Bis jetzt gibt es keine ursächliche, zugelassene Therapie für die trockene AMD. Die Age-Related Eye Disease Study (AREDS) hat jedoch gezeigt, dass antioxidativ wirkende Ernährungsergänzungsmittel wie β -Karotin, Vitamin C, Vitamin E und Zink ein Fortschreiten der Erkrankung hinauszögern können (2001). Für die feuchte AMD hat sich eine VEGF Antikörper Therapie bewährt. Nachteil dieser Therapie ist die Anwendung mit einer intravitrealen Injektion und der damit verbundenen Gefahr einer Infektion. Zudem ist die Therapie recht kostspielig.

Glaukom:

Das Glaukom ist weltweit eine der häufigsten Erkrankungen, die zur irreversiblen Erblindung führt (Flaxman, Bourne et al. 2017). Hierbei handelt es sich um eine fortschreitende Optikusneuropathie mit Verlust der Nervenfasern, welche zu Ausfällen im Gesichtsfeld des Patienten führen können (Weinreb and Khaw 2004, Kwon, Fingert et al. 2009). Grund hierfür ist unter anderem ein erhöhter Augeninnendruck. Es gibt jedoch auch ein Fortschreiten des Nervenfaserverlusts bei Patienten mit normalen Augeninnendruckwerten. Daher ist die tatsächliche Genese der Entstehung eines Glaukoms in den letzten Jahren ein sehr gefragtes Thema in der Forschung und es bieten sich neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Therapien (Jutley, Luk et al. 2017, He, Stankowska et al. 2018). Es zeigte sich, dass ein Glaukom hauptsächlich durch einen sekundären, apoptotischen Zelluntergang der retinalen Ganglienzellen hervorgerufen wird (Anderson 1989, Casson, Chidlow et al. 2012). Dieser Mechanismus tritt auch in ischämischen Erkrankungen, wie beispielsweise bei einem Apoplex und bei Morbus Parkinson, auf. ROS spielen ebenfalls eine Rolle in der Entstehung eines Glaukoms, auch wenn diese Pathomechanismen noch nicht vollständig erforscht sind (Ung, Pattamatta et al. 2017). Man fand heraus, dass ROS einen Schaden an endothelialen Zellstrukturen des Trabekelmaschenwerks verursachen und hierdurch den Kammerwasserabfluss im Schlemm'schen Kanal beeinträchtigen. Zudem finden sich im Bereich des Trabekelmaschenwerks viele antioxidativ wirkende Enzyme wie SOD, Katalase

und Glutathion, die beim Glaukom jedoch funktionell verändert erscheinen (Izzotti, Bagnis et al. 2006).

Bisherige Therapien:

Den oben beschriebenen Erkrankungen ist allen gemein, dass bisher nur unzureichende Therapieformen in der Klinik Anwendung finden. Bei der diabetischen Retinopathie wird versucht, durch Laserkoagulation der Netzhaut, den Ischämieereiz zu reduzieren. Hierdurch wird jedoch auch gesundes Gewebe zerstört. Durch Anti-VEGF-Therapie, die sowohl bei diabetischem Makulaödem als auch bei einer exsudativen AMD angewendet werden kann, wird die sekundäre Gefäßeinsprossung gedrosselt, jedoch gibt es Menschen, die darauf nicht ausreichend ansprechen (Agarwal, Afridi et al. 2015). Um die Progression einer trockenen AMD aufhalten zu können, gibt es bisher noch keine zugelassene Therapie. Und auch bei Gefäßverschlüssen am Auge kommt bisher keine Therapie zum Einsatz, die einen bleibenden Schaden am Auge zuverlässig verhindern kann. Manöver wie Gabe von Acetazolamid, Mannitol oder okulärer Massage zeigten in Studien keinen Vorteil gegenüber einer Behandlung mit Placebo (Fraser and Adams 2009). Beim Glaukom wird in erster Linie versucht, den Augeninnendruck durch Augentropfen oder Operationen, die den Kammerwasserabfluss verbessern, zu regulieren. Hier haben augeninnendrucksenkende Substanzen wie selektive α_2 -Adrenozeptor-Agonisten einen zusätzlichen neuroprotektiven Effekt gezeigt (Nizari, Guo et al. 2016). Jedoch haben nur wenige der bisherigen Therapien einen neuroprotektiven Ansatz und einen Schutz vor oxidativem Stress zum Ziel.

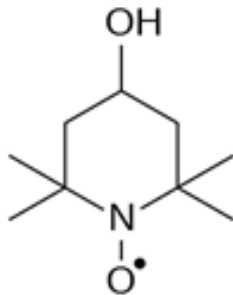
1.3 Tempol

Tempol ist ein Radikalfänger und sehr gut membranpermeabel. Es kann somit auch die Blut-Retina-Schranke durchdringen (Mitchell, Samuni et al. 1990). Es besitzt strahlenprotektive und antiproliferative Eigenschaften (Tempol).

Tabelle 1: Produktinformation von Tempol.

Quelle: entnommen und angepasst aus

<http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/TEMPOL-CAS-2226-96-2> Calbiochem, EMD_BIO-581500. Zugegriffen am 30.12.2018

CAS Nummer	2226-96-2
Synonym	4-Hydroxy-TEMPO 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl
Gestalt	Orangene Kristalle lichtgeschützt aufzubewahren
Molare Masse	172,24 g/mol
Summenformel	$C_9H_{18}NO_2$
Strukturformel	

Tempol ist ein SOD Mimetikum. Das Enzym SOD verwandelt Superoxidradikale in Wasserstoffperoxid, welches dann durch Katalase in Wasser und Sauerstoff weiter umgesetzt wird (Abb.2) (Sies 1997).

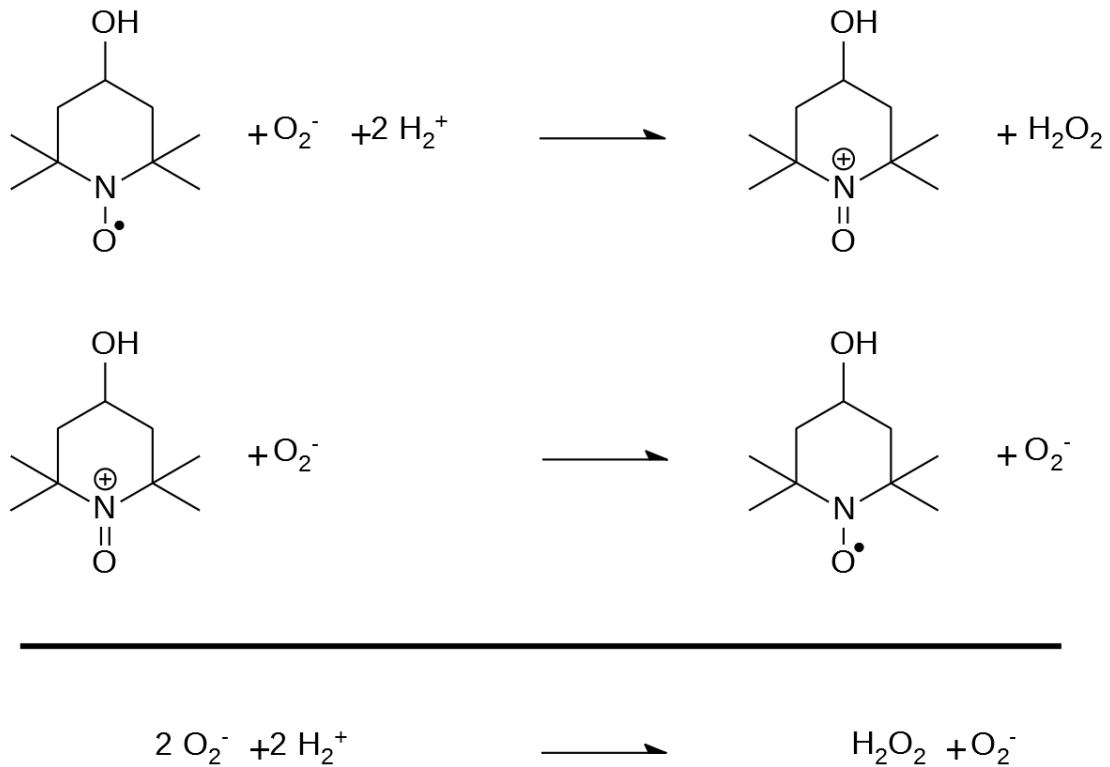


Abbildung 2: Redoxreaktion von Tempol.

Quelle: eigene Darstellung, erstellt mit <http://bkchem.zirael.org/> am 02.07.2019

Tempol wurde bereits auf einen neuroprotektiven Effekt hin an retinalen Ganglienzellen der Ratte getestet (Thaler, Fiedorowicz et al. 2010). Man testete den Effekt von Tempol bei Eisenüberladung, was u.a. bei traumatischen oder ischämischen Gehirnverletzungen, bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington (Riederer, Sofic et al. 1989, Davalos, Castillo et al. 2000, Rak, Chao et al. 2000, Ke and Ming Qian 2003, Mehta, Webb et al. 2004, Millan, Sobrino et al. 2007) und bei altersbedingter Makuladegeneration der Retina (Wong, Richa et al. 2007) eine Rolle spielt. In der Studie konnte mit Hilfe von Immunhistochemie gezeigt werden, dass Tempol sowohl nach Eisenvorbehandlung als auch ohne einen neuroprotektiven Effekt für retinale Ganglienzellen erzielen kann. Optimale Erfolge wurden bei einer Dosis von 20mg/kg Körpergewicht (KG) erzielt. Eine Tempoldosis von 1mg/kg KG und 5mg/kg KG erwiesen sich als nicht effektiv (Thaler, Fiedorowicz et al. 2010).

Tempol wurde bereits erfolgreich in-vivo und in-vitro an neuronalen Zellen bei Hirntraumen, bei Ischämie bedingten Schlaganfällen und Parkinson getestet. Es zeigte sich ein geringfügigerer Parenchymschaden und ein schnellerer Rückgang eines Hirnödems. Jedoch war eine zeitnahe Gabe ausschlaggebend für den Erfolg, da es bereits entstandene Schäden nicht rückgängig machen konnte. Tempol bewies sich als guter Radikalfänger für Peroxynitride, die bei einem Schlaganfall in zellulären Kaskaden in Mitochondrien entstehen können. Zudem zeigte Tempol in einem in-vitro Modell für Parkinson eine Reduktion der L-Lactatdehydrogenase (LDH) Ausschüttung um 70%, einen Rückgang der Aktivität von Caspase-3, welches für die Apoptose von Zellen verantwortlich ist, um 30% und verbesserte die Funktion der Mitochondrien um 33% (Beit-Yannai, Zhang et al. 1996, Lipman, Tabakman et al. 2006, Singh, Sullivan et al. 2007). Darüber hinaus verbesserte es das Überleben von retinalen Ganglienzellen bei $\text{TNF-}\alpha$ und Hypoxieeinwirkung (Tezel and Yang 2004).

Auch in der Kataraktprävention übernimmt Tempol eine Aufgabe. Bei der Entstehung einer Katarakt spielen oxidative Schäden eine wichtige Rolle, die normalerweise von linseneigenen Abwehrmechanismen bekämpft werden. Hier spielt neben Glutathion und der Katalase auch das körpereigene Enzym SOD eine wichtige Rolle. Bei einer Katarakt hat sich jedoch eine verminderte Funktion der Enzyme in Rinderaugen gezeigt (Ohrloff, Hockwin et al. 1984). Tempol greift hier ein und schützt die Linsenepithelzellen vor einem H_2O_2 Schaden (Reddan, Sevilla et al. 1993, Reddan, Giblin et al. 1999). Auch bei einer Kataraktentwicklung aufgrund von Strahlung und damit einhergehendem DNA-Schaden am Epithel der Linse konnte bei in-vivo Versuchen am Kaninchen ein Erfolg von Tempol als Radioprotektor gezeigt werden (Sasaki, Lin et al. 1998). Allerdings hat sich bis jetzt keine Anwendung in der klinischen Praxis etabliert.

Zukünftiges Einsatzgebiet von Tempol

Eine klinische Zulassung für Tempol liegt bisher noch nicht vor. Neben zahlreichen experimentellen Studien gibt es vor allem im Bereich der

kardiovaskulären Erkrankungen und bei Folgen der Strahlentherapie klinische Studien, in denen Tempol zum Einsatz am Menschen kommt:

- The Effect of Antioxidants on Skin Blood Flow During Local Heating (<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03680638>, zugegriffen am 27.06.2019) → *Studie ist abgeschlossen*
- The Effect of Local Antioxidant Therapy on Racial Differences in Vasoconstriction (<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03680404>, zugegriffen am 27.06.2019) → *Studie aktuell rekrutierend*
- Efficacy Study of Tempol to Prevent Hair Loss From Radiotherapy to the Brain (<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00801086>, zugegriffen am 27.06.2019) → *Studie ist beendet*
- Safety and Preliminary Efficacy Study of MTS-01 for the Prevention of Alopecia Induced by Whole Brain Radiotherapy (<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00713154>, zugegriffen am 27.06.2019) → *Studie ist beendet*
- Topical MTS-01 for Dermatitis During Radiation and Chemotherapy for Anal Cancer (<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01324141>, zugegriffen am 27.06.2019) → *Studie ist beendet*
- Treatment of Radiation and Cisplatin Induced Toxicities With Tempol (<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03480971>, zugegriffen am 27.06.2019) → *Studie aktuell rekrutierend*

Ein weiterer Einsatz von Tempol lässt sich anhand bisheriger experimenteller Ergebnisse ableiten für neurodegenerative Erkrankungen, Ischämien, Diabetes und Alterungsprozesse. Alle Erkrankungen haben eines gemeinsam, sie entstehen unter anderem durch oxidativen Stress in den Zellen, durch welchen unterschiedliche Kaskaden angestoßen werden, die dann letztendlich zum klinischen Bild führen. Da sich diese Veränderungen in gewisser Weise auch am Auge zeigen können, bleibt Tempol zukünftig auch in der Ophthalmologie vielversprechend für das therapeutische Ziel der Neuroprotektion.

1.4 Elektrophysiologische Grundlagen

1.4.1 Aufbau und Funktion der Retina

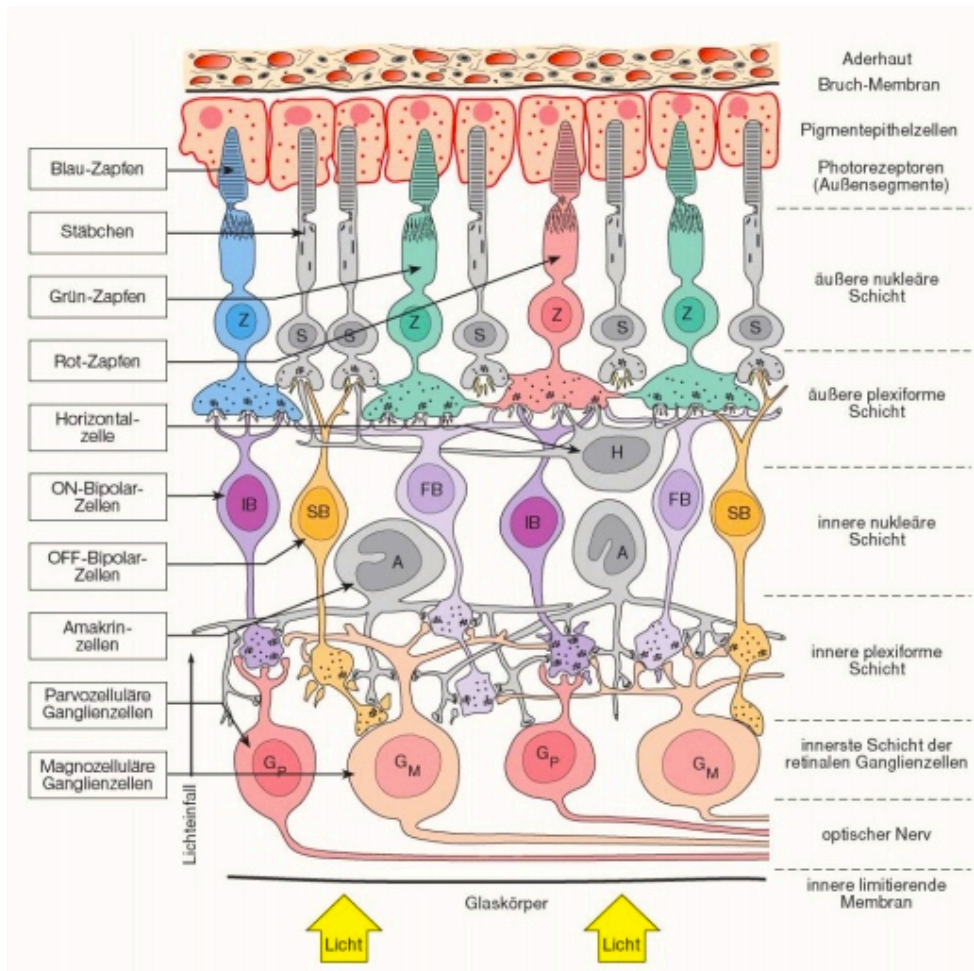


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Netzhaut.

Quelle: modifiziert aus Deetjen, Speckmann, Hescheler (2005) Physiologie, 4. Auflage. München, Urban & Fischer Verlag

Die Retina besteht aus mehreren differenzierten Schichten. Entgegengesetzt dem Lichteinfall betrachtet, also vom äußeren Auge -angrenzend an die Aderhaut- nach innen gehend in Richtung Glaskörper, haben wir zunächst die Photorezeptoren (1. Neuron der Retina), welche durch Phagozytose ihrer Außensegmente vom umgebenden Pigmentepithel versorgt werden. Die äußere nukleäre Schicht bilden dann die Zellkörper der einzelnen Zapfen und Stäbchen. Daran angrenzend befindet sich die äußere plexiforme Schicht, welche durch die Vernetzung der Photorezeptorenfortsätze mit den Horizontal-

und Bipolarzellen (2. Neuron der Retina) entsteht. Die darauffolgende innere nukleäre Schicht besteht aus amakrinen Zellen, welche in ihrer Funktion durch laterale und vertikale Verschaltung zur Modulation der Signalstärke beitragen, und Perikarien der Müllerzellen. Weiter Richtung Glaskörper befindet sich als Nächstes die innere plexiforme Schicht, wo die amakrinen Zellen und die Bipolarzellen mit den Ganglienzellen (3. Neuron der Retina) verschaltet werden. Die Axone der Ganglienzellen führen schließlich gebündelt als Nervus opticus über die Sehstrahlung hin zur Sehrinde.

Für die Lichtwahrnehmung innerhalb der Retina ist die Umwandlung eines Lichtreizes in ein elektrisches Signal essentiell, die sogenannte photoelektrische Transduktion. Dies verschafft uns auch die Möglichkeit, Aktivitäten anhand eines Elektroretinogramms (ERG) ableiten zu können. Die Scheibchenmembran im Bereich der Stäbchenaußensegmente enthält Rhodopsin. Ein Lichtreiz genügt um eine primäre photochemische Reaktion auszulösen, in Folge dessen Rhodopsin letztendlich zu Metarhodopsin umgewandelt wird, welches sich mit Transducin, ein Guanosin triphosphat (GTP) bindendes Protein, zu einem Komplex vereint. Hierbei wird Guanosindiphosphat (GDP) am inaktiven Transducin zu GTP ersetzt und Transducin spaltet sich in zwei Untereinheiten, wovon eine an eine inhibitorische Cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) - Phosphodiesterase bindet und letztendlich die cGMP-Konzentration im Zytoplasma senkt. Als Reaktion auf den Abfall von cGMP schließen sich Kationenkanäle und es kommt zur Hyperpolarisation. Um eine Depolarisation, einen sogenannten Ruhezustand der Zellen herzustellen, wird über eine intrinsische GTPase-Aktivität des Transducins GTP in GDP umgewandelt und führt zu einer Erhöhung des cGMP-Spiegels im Zytoplasma und somit zu einer Öffnung der Kationenkanäle. Dieser Vorgang ist an der Retina gegensätzlich zu anderen Nervenzellen am menschlichen Körper, welche als Folge eines Reizes eine Depolarisation zeigen und im Ruhezustand hyperpolarisiert sind (Silbernagl and Despopoulos 2007, S. 354-357).

1.4.2 Das ERG

Das ERG dient in der Diagnostik der Augenheilkunde zur Darstellung der Netzhautfunktion. Hierbei lässt sich durch spezifische Lichtimpulse sowohl die Funktion der Photorezeptoren (Zapfen und Stäbchen) als auch die der Bipolarzellen und weiteren Zellen der inneren Netzhautschichten darstellen. Dies geschieht, indem Lichtreize in elektrische Potentiale im Bereich der Netzhaut umgewandelt werden, welche dann mittels Elektrodenableitungen aufgezeichnet werden können. Es gibt skotopische (dunkeladaptierte) Bedingungen und photopische (helladaptierte) Bedingungen. Skotopisch werden vermehrt die Funktionen der Stäbchen überprüft, während unter photopischen Bedingungen die Zapfen dargestellt werden. Für die Durchführung eines ERGs muss der Patient zunächst in Mydriasis (erweiterte Pupillen zur Beleuchtung der gesamten Netzhaut) 30 Minuten dunkeladaptiert werden. Dann erfolgt die Ableitung mittels einer Ringelektrode in einer Kontaktlinse und einer indifferenten Elektrode auf der Haut. Man misst zunächst mit steigender Lichtintensität die Antwort der Stäbchen. Nach einer kürzeren Helladaption können auch die Antworten der Zapfen festgehalten werden. Zur Untersuchung schaut der Patient in eine Perimeterkugel, aus welcher die Lichtreize dargeboten werden (Grehn 2012, Kanski and Bowling 2012).

Historisch gesehen gibt es das ERG bereits seit über einem Jahrhundert. Bei verschiedenen Lebewesen ließen sich bereits a- und b-Wellen in den Ableitungen erkennen. Die drei Wellen-Ableitung mit der negativen a-Welle und den beiden positiven Ausschlägen b und c, ähnlich wie beim Menschen, (Abb. 6) wurde durch Einthoven bereits 1908 anhand von Froschaugen beschrieben (Einthoven and Jolly 1908, Perlman 1995). Das Grundverständnis des heutigen ERGs geht auf den Nobelpreisträger Ragnar Granit zurück. Er beobachtete bei einer narkotisierten Katze abhängig von der Tiefe der Narkose verschiedene Ableitungen, die er mit P-I bis P-III bezeichnete. P-II entspricht einem raschen positiven Ausschlag und anschließend langsamer Abflachung. P-I ist eine langsam ansteigende positive Welle, die dann ein Plateau erreicht, während P-III von Anfang an einen konstant negativen Ausschlag zeigt.

Hiernach entspricht die negative a-Welle P-III, während die b-Welle der Summation von P-II und P-III zuzurechnen ist. Die langsame c-Welle ist durch die Summation von P-I und P-III zu verstehen (Granit 1933).

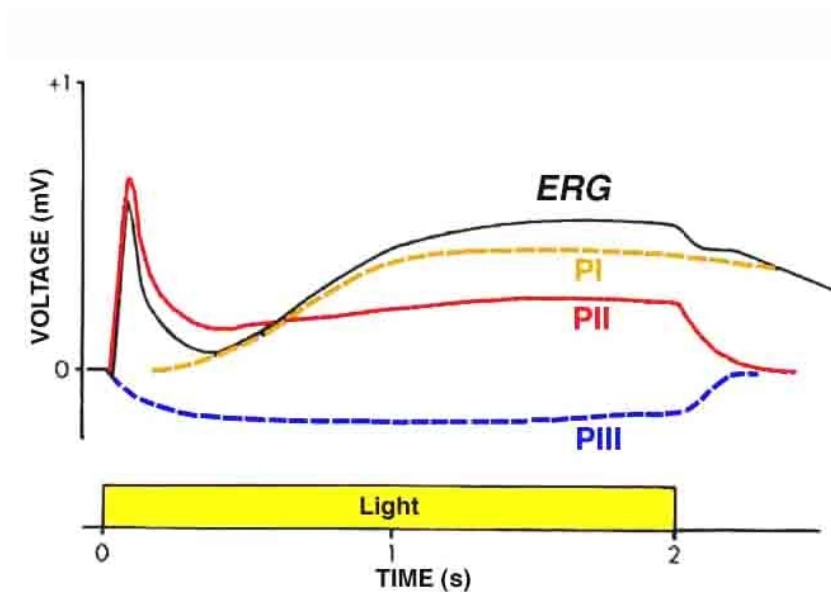


Abbildung 4: ERG Ableitungen einer narkotisierten Katze (Granit 1933)
Quelle: (Perlman 1995) Update 2007

Die a-Welle ließ sich anhand intraretinal eingesetzter Mikroelektroden den Photorezeptoren zuordnen. Hierbei wird durch Reduktion des Dunkelstroms eine Hyperpolarisation erzeugt (Penn and Hagins 1969). L-Glutamat ist der Neurotransmitter der Photorezeptoren. Durch Einsetzen eines Agonisten wie beispielsweise Aspartat lässt sich die a-Welle isoliert darstellen (Perlman 1995).

Die b-Welle ist Ursprung der Netzhautzellen, die den Photorezeptoren nachgeschaltet sind. Biochemisch kann man die b-Wellen Antwort beispielsweise durch Hinzugabe von Aspartat, Glutamat oder auch hohe Magnesiumkonzentrationen und niedrige Kalziumkonzentrationen reduzieren, indem so die Weiterleitung von den Photorezeptoren unterbunden wird.

Weiterhin hat sich gezeigt, dass die b-Wellen Amplituden korrelierend zu dem Ausschlag der Depolarisation an den Müller-Gliazellen stehen. Das lässt sich auf eine Membranpotenzialänderung der Müller-Gliazellen durch einen Einstrom von Kalium in der inneren und äußeren plexiformen Schicht erklären

(Perlman 1995). Die b-Welle ist somit das elektrophysiologische Korrelat für eine funktionierende intraretinale Transmission, entstanden durch Potentialänderungen der retinalen Gliazellen. Somit ist auch die Funktion der Photorezeptoren unabdingbar für die Entstehung einer b-Welle.

Die c-Welle entsteht durch eine Hyperpolarisation des Pigmentepithels, hervorgerufen durch einen Kaliumabfall an der Innenseite der Pigmentepithelzellen in Richtung der Photorezeptoren. Ausgelöst wird dies durch einen Lichtreiz, der über die Photorezeptoren das biochemische Signal weitervermittelt. Somit kann eine c-Welle nur bei Integrität der gesamten Netzhaut und des Pigmentepithels entstehen (Perlman 1995). In Abbildung 5 lässt sich zeigen, dass eine vom Pigmentepithel isolierte Netzhaut über keine c-Welle mehr verfügt.

Insgesamt lässt sich anhand des ERGs ein Rückschluss ziehen auf den Ort der Schädigung der Netzhaut.

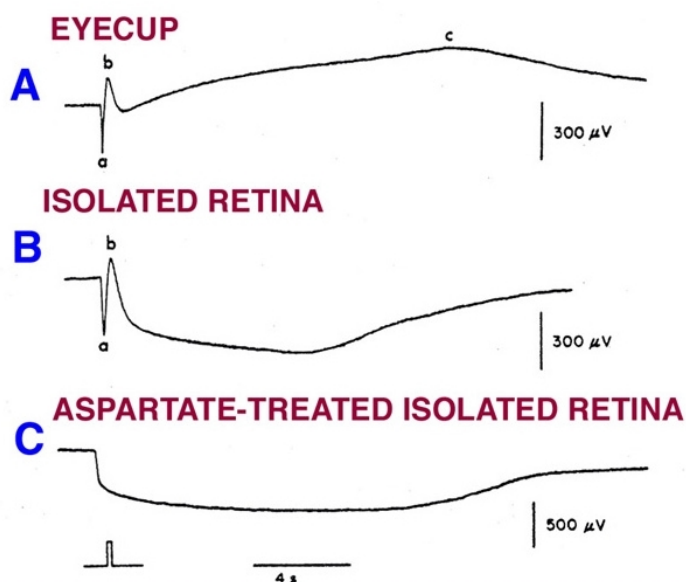


Abbildung 5: ERG eines Rochens (Pepperberg, Brown et al. 1978)
Quelle: (Perlman 1995) Update 2007

Im Klinikalltag kommt das ERG hauptsächlich zur Überprüfung der Netzhautfunktion bei erblich bedingten Netzhauterkrankungen, wie beispielsweise der Retinopathia pigmentosa zum Einsatz. Man möchte eine prognostische Aussage über die Funktion eines erkrankten Auges treffen, da sich bereits im ERG Funktionsverluste zeigen, bevor diese funduskopisch erkennbar sind. Auch bei toxischen Schäden durch langjährige Einnahme von Medikamenten, wie zum Beispiel Chloroquin kann sich eine Reduktion der Netzhautpotentiale im ERG zeigen. In der Praxis findet ein Ganzfeld-Elektroretinogramm Anwendung, welches die Funktion der gesamten Netzhaut widerspiegelt. Es wird ein Summenpotenzial gemessen, das durch die vorausgegangen beschriebenen Ionenverschiebungen nach Belichtung entsteht. Dieses Summenpotenzial umfasst die Potentiale der Photorezeptoren (a-Welle), der Bipolarzellen und Müller-Zellen (b-Welle) und des Pigmentepithels (c-Welle) der gesamten Netzhaut.

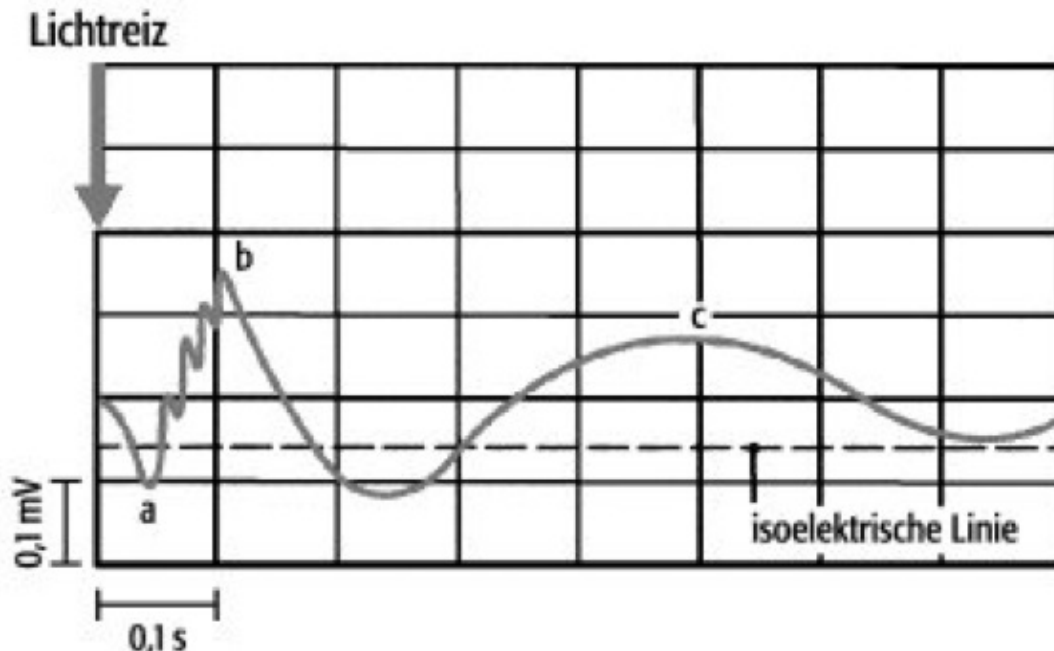


Abbildung 6 : ERG Ableitung beim Menschen (a- b- und c-Welle).

Quelle: entnommen und angepasst aus

<https://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/elektroretinogramm/3353>.

Zugegriffen am 10.02.2018

In der klinischen Routine hat sich ein Protokoll zur Durchführung eines Ganzfeld-ERGs nach Standardbedingungen der International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) etabliert. Es setzt sich aus folgenden sechs Aufzeichnungen zusammen, korrelierend dazu siehe Abbildung 7 (McCulloch, Marmor et al. 2015):

1. Ein dunkeladaptiertes $0,01 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ERG erzeugt alle 2 Sekunden anhand eines schwachen, weißen Lichtreizes Stäbchenantworten, welche sich in einer großen b-Welle und einer kleinen oder nicht aufzuzeichnenden a-Welle zeigen.
2. Ein dunkeladaptiertes $3,0 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ERG erzeugt alle 10 Sekunden mit einem sehr hellen, weißen Lichtreiz eine kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort, die sich als deutlich erkennbare a- und b-Welle ableiten lässt.
3. Ein dunkeladaptiertes $10,0 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ERG erzeugt im Vergleich zu $3,0 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ einen stärkeren, weißen Lichtreiz, der alle 20 Sekunden ausgelöst werden sollte. Hierbei lässt sich dann in der Ableitung eine kürzere Gipfelzeit der a-Welle erkennen, die sich auch größer darstellt. Diese Ableitung gibt oft besseren Aufschluss über eine Netzhauterkrankung im Bereich der Photorezeptoren. Auch ist sie gut geeignet bei Patienten mit dichten optischen Medien.
4. Dunkeladaptierte oszillatorische Potentiale werden mit einer Lichtintensität von ebenfalls $3,0 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ im Abstand von 10 Sekunden durchgeführt. Man kann diese daher auch direkt nach Schritt 2 durchführen. Ausgelöst werden die Potentiale von amakrinen Zellen der inneren Retina.
5. Nach mindestens zehnminütiger Helladaptation kann zur besseren Darstellung von Zapfenantworten ein helladaptiertes $3,0 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ERG mit Lichtstimulation im Abstand von 0,5 Sekunden durchgeführt werden. Man erkennt eine a-Welle und eine b-Welle mit kleinen Oszillationen.

6. Um eine isolierte Zapfenantwort zu erzeugen, wird ein helladaptiertes 30Hz Flicker ERG mit einem Flickerlichtstimulus der Intensität von 3,0 cd•s/m² und einer Frequenz zwischen 28-33 Hz durchgeführt. Auf diese Frequenz reagieren Stäbchen nicht, somit ist es möglich die Zapfenantwort zu isolieren.

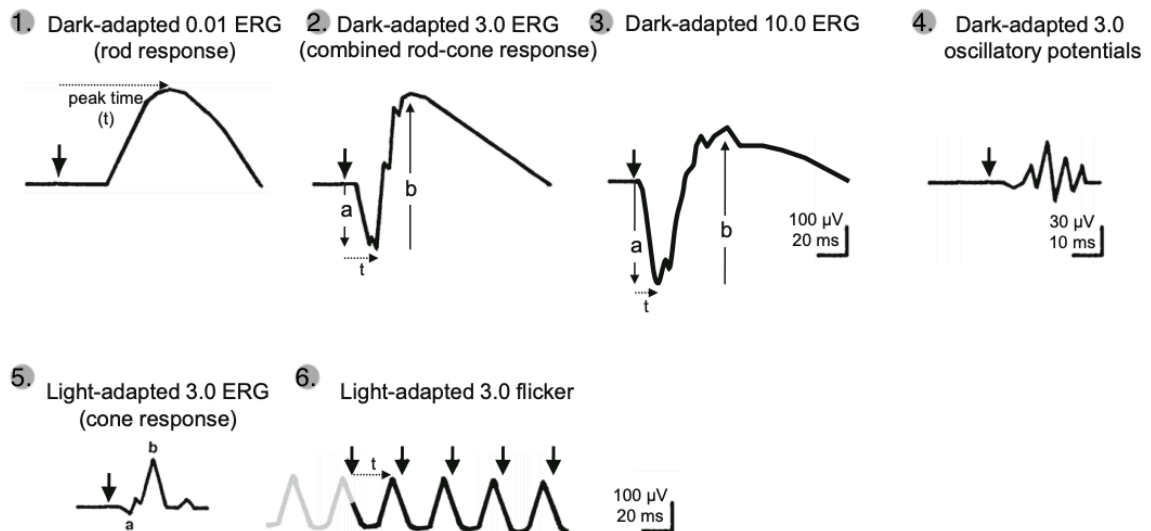


Abbildung 7: ISCEV Protokoll.

Quelle entnommen und angepasst aus (McCulloch, Marmor et al. 2015)

Da die Makula nur 5 % der gesamten Netzhautfläche abdeckt, lassen sich Erkrankungen der Makula im Ganzfeld-ERG nicht abgrenzen. Hierfür gibt es zur besseren Differenzierung geografischer Bereiche der Netzhaut ein multifokales ERG (mfERG), wo nur bestimmte Bereiche stimuliert werden.

Für die Darstellung der Ganglienzellen der Netzhaut findet sich im klinischen Alltag ein sogenanntes Muster-ERG. Hier werden abwechselnd schwarze und weiße Felder ähnlich eines Schachbrettmusters dargeboten (Grehn 2012).

1.4.3 Das ERG im Versuchsmodell

In Studien am Modell der isolierten Retina zeigte sich bereits eine Dauer von maximal 10 Stunden für die Ableitung einer stabilen b-Welle. Hierbei ergab sich eine leichte Reduktion der b-Welle mit durchschnittlich 1,2% pro Stunde (Luke, Weiergraber et al. 2005). Diese Etablierung des Versuchsaufbaus diente als Ausgangslage für die Versuche dieser Arbeit.

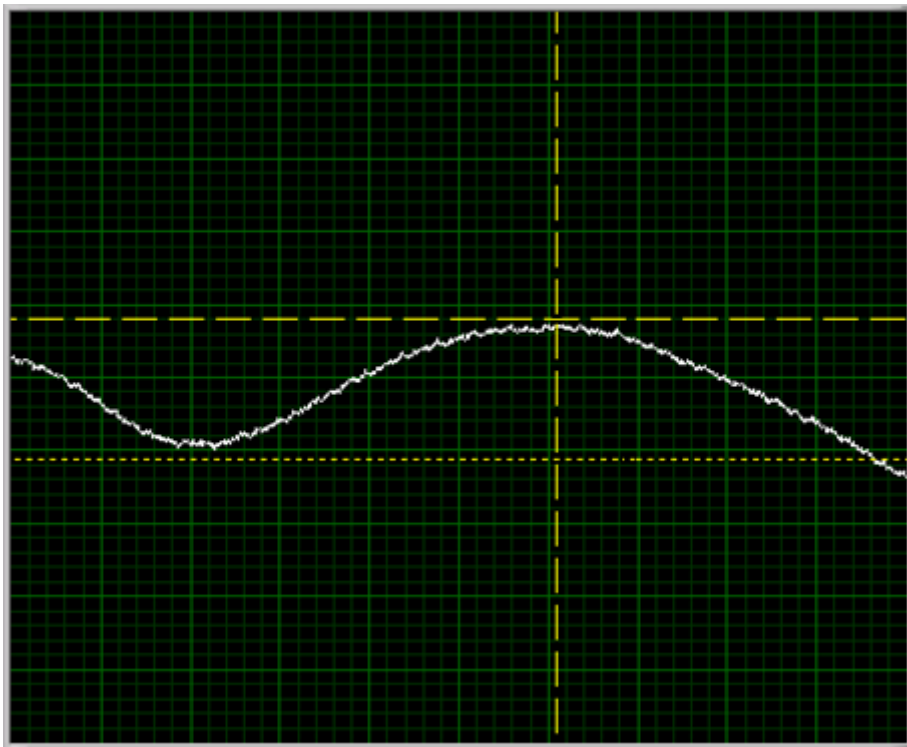


Abbildung 8: a-Welle und b-Welle in Labview®.
Quelle: eigene Aufnahme

2. Ziel der Arbeit

Oxidativer Stress ist Ursache vieler Erkrankungen der heutigen Bevölkerung und rückt zunehmend in den Fokus als Angriffspunkt für die Entwicklung zukünftiger Therapien.

Ziel dieser Dissertation war herauszufinden, ob Tempol als Antioxidans einen neuroprotektiven Effekt auf die Photorezeptoren und Bipolarzellen sowie Müllerzellen der Retina am Modell der isolierten und umströmten Vertebratennetzhaut aufweist. Weiterhin galt es festzustellen, in welchem Konzentrationsbereich ein optimaler Erhalt der Zellen gewährleistet und eine schädliche Grenzkonzentration überschritten ist, um eventuell eine sichere Ausgangskonzentration von Tempol für weitere Testungen an zukünftigen in-vitro und in-vivo Modellen zu finden.

Hierbei war es wichtig, eine Substanz zu erproben, welche zukünftig in einfacher Anwendung am Menschen appliziert werden kann und frühzeitig wirkt, bevor ein irreversibler Schaden auftreten kann.

Um Auswirkungen von Hypoxie auf die Retina hervorzuheben, wurden weitere Messungen durchgeführt. Dies sollte der Beginn einer Testphase zur Entwicklung eines standardisierten Stressmodells sein, anhand dessen weitere neuroprotektive Effekte getestet werden können. Die Vollendung dieser Versuchsreihe wurde von Januschowski und Kollegen in einer Folgearbeit durchgeführt (Januschowski, Müller et al. 2015).

3. Material und Methoden

Um die Wirkung von Tempol und auch seine schädlichen Grenzkonzentrationen auszutesten, greifen wir auf eine mehrfach validierte Methode zurück. Die Anwendung eines ERGs an der isolierten Rinderretina ist ein aussagekräftiger Nachweis für die Aktivität der Netzhautzellen und ist repräsentativ für das hoch ausgebildete neuronale Netzwerk beim Menschen (Luke, Weiergraber et al. 2005). Wichtig hierbei ist es, optimale Bedingungen zu schaffen, um ein möglichst stabiles und langanhaltendes ERG als Grundlage für pharmakologische Studien zu erreichen. Dazu gehört eine Flussgeschwindigkeit der Nährlösung von durchschnittlich 1ml/min mit einer Temperatur von 30°C und ständiger Sauerstoffuntermischung der Nährlösung. Es wurden bereits in vorausgehenden Versuchen eine Dauer von maximal zehn Stunden für ein stabiles ERG gemessen (Luke, Weiergraber et al. 2005). Die Versuche dieser Arbeit basieren auf der etablierten Methode von Sickel et al., die im vergangenen Jahrhundert an Froschnetzhäuten durchgeführt wurde (Sickel 1965, Sickel 1966).

Diese Methode gibt uns die präzise Möglichkeit die Aktivität der Photorezeptoren, die für die Entstehung der a- Wellen verantwortlich sind, als auch die Aktivität des höheren neuronalen Netzwerkes, das man anhand der b-Wellen erkennen kann, einzuschätzen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode gegenüber histologischen Gewebeuntersuchungen ist, dass man die hintereinandergeschalteten Zellen der Netzhaut gemeinsam in ihrer Funktion betrachten kann. Darüber hinaus ist ein Versuch an der isolierten Retina im Vergleich zu in-vivo Experimenten weniger durch äußere Faktoren zu beeinflussen, wie das beispielsweise bei narkotisierten Versuchstieren durch Auswirkung auf die Vitalparameter sein kann. Auch die elektrophysiologischen Antworten auf Lichtreize sind eindeutiger zu interpretieren als bei elektroenzephalographisch evozierten Potentialen (Sickel 1965, Luke, Weiergraber et al. 2005).

3.1 Gewinnung und Präparation der isolierten Retina

Die Rinderaugen wurden von einem lokalen Schlachthof bezogen. Um die Hypoxiezeit so gering wie möglich zu halten, wurden die Augen direkt nach der Entnahme im Schlachthof präpariert. Es kann jedoch von einer Perfusionsunterbrechung von etwa 15 Minuten zwischen Tötung des Rindes und Präparation der Augen ausgegangen werden. Für die Präparation der Augen wurde bei Rotlicht gearbeitet, da die Augen für das Auslösen von Lichtreizen bei ERG-Messungen dunkeladaptiert sein sollten. Hierzu eröffnete man den Augapfel mit einer Schere entlang der Ora serrata und entfernte die Linse samt vorderem Augenabschnitt. Dann löste man den Glaskörper durch Röhren mit einer Pinzette vorsichtig heraus und stanzt kleine Kreise (\varnothing ca. 7mm) aus, welche aus den Schichten Lederhaut (Sklera), Aderhaut (Choroidea), Pigmentepithel und Netzhaut (Retina) bestanden. Diese Stanzen wurden dann direkt für den Transport vom Schlachthof zum Labor in eine oxygenierte Nährlösung mit einem pH von 7,8 gegeben und bis zum Versuchseinsatz bei 4°C aufbewahrt. Der Transport dauerte maximal 30 Minuten. Die Retina löste sich in den meisten Fällen während des Transportes oder der Aufbewahrung atraumatisch von den unteren Schichten ab. In anderen Fällen konnte sie durch leichtes Schütteln und mithilfe einer Pinzette vom Pigmentepithel abgelöst werden. Die so gewonnene Retina wurde anschließend mittels eines Doppel-Ring-Systems auf einen Kunststoffträger gespannt und in eine luftleere und lichtgeschützte Kammer eingebaut (Abb. 9). Die isolierte Netzhaut zeigte eine natürliche Einrollung an den Rändern der Stanze in Richtung des Glaskörperraums. Somit konnten eine korrekte Lage und Identifizierung der Photorezeptoren immer gewährleistet werden.

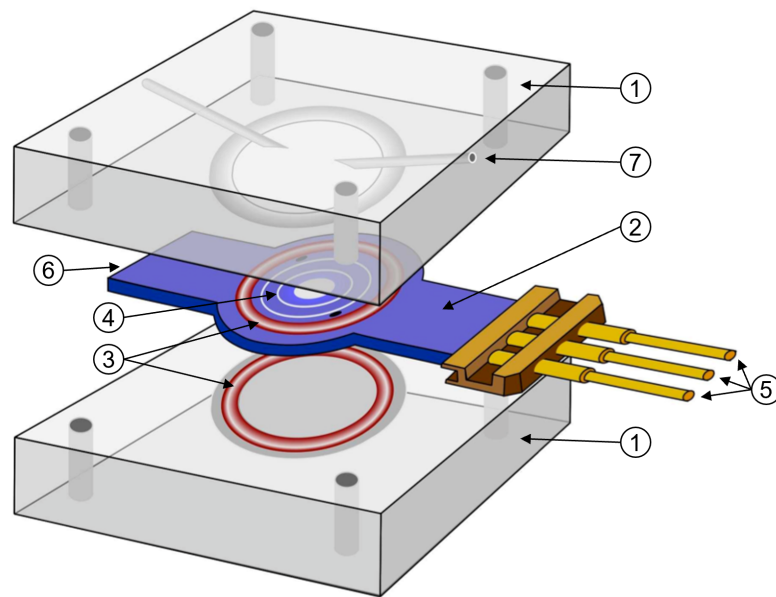


Abbildung 9: Trägermodell für die perfundierte Retina nach Januschowski und Lücke.
 1 Plexiglasscheiben, 2 Kunststoffträger, 3 Gummiringe, 4 Kunststoffnetz mit Fixationsringen, 5 Elektroden, 6 Zu- und Ablauf der Nährlösung, 7 Einbohrungen in Plexiglasscheibe Quelle: Autorin des Schemas: Regina Ebenhoch, Universitätsaugenklinik Tübingen (modifiziert).

3.2 Perfusionskammer

Die Perfusionskammer (Abb. 9) besteht aus zwei 1cm dicken Plexiglasscheiben, die mittels vier Schrauben miteinander verbunden wurden und in der Mitte einen Kunststoffträger einbetten. Der Kunststoffträger ist durch zwei Gummiringe wasser- und luftdicht verschlossen. Auf dem Träger befindet sich in der Mitte ein Kunststoffnetz, auf welchem die isolierte Retinastanze mithilfe eines kleinen Ringes fixiert wird. Für die kontinuierliche Zufuhr der Nährlösung verfügt der Träger an einer Seite über einen Zu- und Ablauf. Weiterhin sind an der gegenüberliegenden Seite Silberdrahtelektroden angebracht. So kann durch das Plexiglas auf die Netzhaut durch einen Lichtimpuls eine Reizantwort abgeleitet werden. Um zusätzlich zur Nährlösung Medikamente auf die Netzhaut direkt applizieren zu können oder auch störende Luft entweichen zu lassen, befinden sich an der oberen Plexiglasscheibe zwei Einbohrungen, die mit je einem Stopfen verschlossen sind (Januschowski 2010).

3.3 Perfusionslösung

Als Nährlösung wurde die von Sickel bereits im vergangenen Jahrhundert entwickelte Sickel-Lösung verwendet. Diese setzt sich wie folgt in mM zusammen: NaCl (120), KCl (2), CaCl₂ (0.15), MgCl₂ (0.1), NaH₂PO₄ (1.5), Na₂HPO₄ (13.5) und Glucose (5). Die Einzelkonzentrationen der Nährlösung wurden bereits in vorhergehenden Versuchen ausgetestet, um optimale Bedingungen für die Erzeugung von stabilen a- und b-Wellen zu schaffen (Luke, Weiergraber et al. 2005). Aufgrund eines hohen Stoffwechselumsatzes des retinalen Gewebes ist ein Phosphatpuffer notwendig, um einer Übersäuerung entgegen zu wirken. Da sich die Nährlösung in ständigem Fluss befindet, ist ein Abtransport der Metaboliten gewährleistet. Bei einem pH-Wert von 7,8 befindet sich die isolierte Retina in einem alkalischeren Bereich als in unserem Blut (pH 7,4), somit kann genügend CO₂ gelöst bleiben. Die Ca²⁺-Konzentration ist geringer als im Blut und verhindert eine Ausbildung von Kalziumphosphatpräzipitaten. Für die Versuche wurde die Sickel-Lösung aus der Universitäts-Apotheke in Tübingen bezogen. Dort wurde sie regelmäßig unter sterilen Bedingungen neu hergestellt. Die Nährlösung wurde für den Transport, während der Versuche und auch zur Lagerung der isolierten Netzhäute verwendet, um eine ständige Versorgung zu gewährleisten. Vorbereitend für den Transport und auch während den Versuchen wurde die Nährlösung über einen Aquariumstein mit 100% Sauerstoff begast. Es zeigte sich in vorhergehenden Versuchen, dass sich durch die Sauerstoffzufuhr b-Wellen über einen längeren Zeitraum ableiten lassen können (Januschowski 2010). Für die isolierte Darstellung der a-Wellen wurde der Nährlösung 1mM Aspartat hinzugefügt, was dazu führte, dass die Weiterleitung der elektrischen Signale in das höhere neuronale Netzwerk (Bipolarzellen und Horizontalzellen) unterbunden wurde und somit eine reine Photorezeptorenantwort abgelesen werden konnte (Hanawa and Tateishi 1970).

Chemikalien wie Aspartat und Glukose und auch die zu testende Substanz Tempol wurden von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

3.4 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau (Abb. 10) bestand aus einer lichtgeschützten Perfusionskammer mit oben aufgebrachter Lichtquelle. In der Kammer befand sich ein Kunststoffträger für die Retina mit Elektrodenanschluss. Durch eine Fließpumpe Peristaltic Pump P-1 von der Firma Pharmacia ® wurde die beständige Umströmung der Retina mit der Nährlösung gewährleistet, welche zusätzlich mit Sauerstoff durchmischt wurde. Eine kontinuierliche Flussrate von optimal 1ml/min wurde hierfür angestrebt (Luke, Weiergraber et al. 2005). Weiterhin gab es ein Wasserbad mit nachgeschaltetem Entlüfter, da die optimale Temperatur für die b-Wellen 30°C beträgt. Mit dem Entlüfter konnte man Luftblasen, die sich im Perfusionssystem gebildet hatten, entweichen lassen. Somit konnten hierdurch entstandene Störfaktoren bei der Ableitung des ERGs umgangen werden. Die Nährlösung durchströmte das Trägermodell der Retina von beiden Seiten, um anschließend in ein Auffanggefäß abzufließen.

Für die Stimulation der Retina wurde eine Xenonlampe (Xenon tube, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA) verwendet. Ein Timer (Photopic Stimulator PS33 Plus, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA) gewährleistete eine voreingestellte Dauer des Lichtreizes für 10 μ s. Die Lichtreizintensität wurde auf 6,3mlx begrenzt, indem ein Filter (Wratten Filter, Kodak, Stuttgart, Deutschland) vorweggeschaltet wurde.

Durch Anschließen an ein Oszilloskop ließ sich mit Hilfe eines Computerprogramms (Labview ®) eine Amplitude in Volt und eine Latenz in Sekunden messen. Vor Beginn der Messungen wurde nach Einbau einer Netzhaut die Amplitude mittels eines Verstärkers auf annähernd 10 μ V eingestellt und galt als stabil, sobald sie über 30 Minuten nicht mehr als $\pm 2\mu$ V geschwankt ist. Unter Zufluss der Nährlösung wurden für 25 Minuten sechs Lichtreize (50mV und 100ms) im Abstand von 5 Minuten mit der Xenon-Lichtquelle ausgelöst. Die darauf respondierenden Signale konnten durch zwei Silberdrahtelektroden am Kunststoffträger der Retina aufgenommen, durch den

Verstärker (RPS312RM, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA) weiterverarbeitet und anschließend mit einem Analog/Digital Wandler (PCI-MIO-16XE-50, National Instruments, Austin, USA) in digitale Form für die Erstellung des ERGs und für die Dokumentation der Amplitude und Latenz konvertiert zu werden.

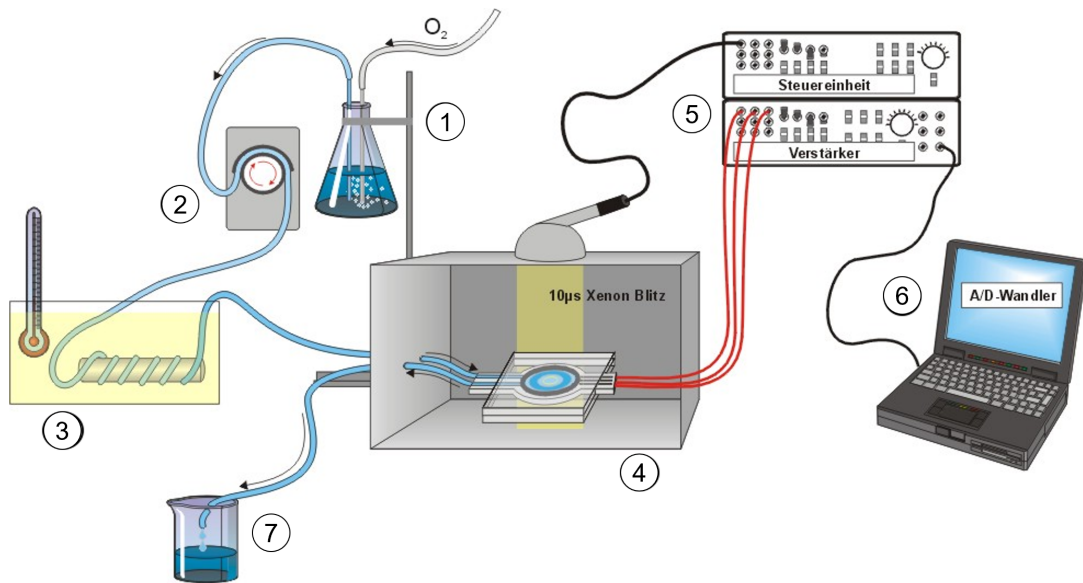


Abbildung 10: Aufbau des Modells der isolierten und perfundierten Retina.
 1 Zufluss der Nährlösung und der zu testenden Substanz mit O₂, 2 Rollerpumpe, 3 Entlüfter im Wasserbad, 4 Perfusionskammer, 5 Steuer-/Verstärkereinheit, 6 PC, 7 Abfluss der Lösung.
 Quelle: Autorin des Schemas: Regina Ebenhoch, Universitätsaugenklinik Tübingen (modifiziert).

3.5 Versuchsprotokoll

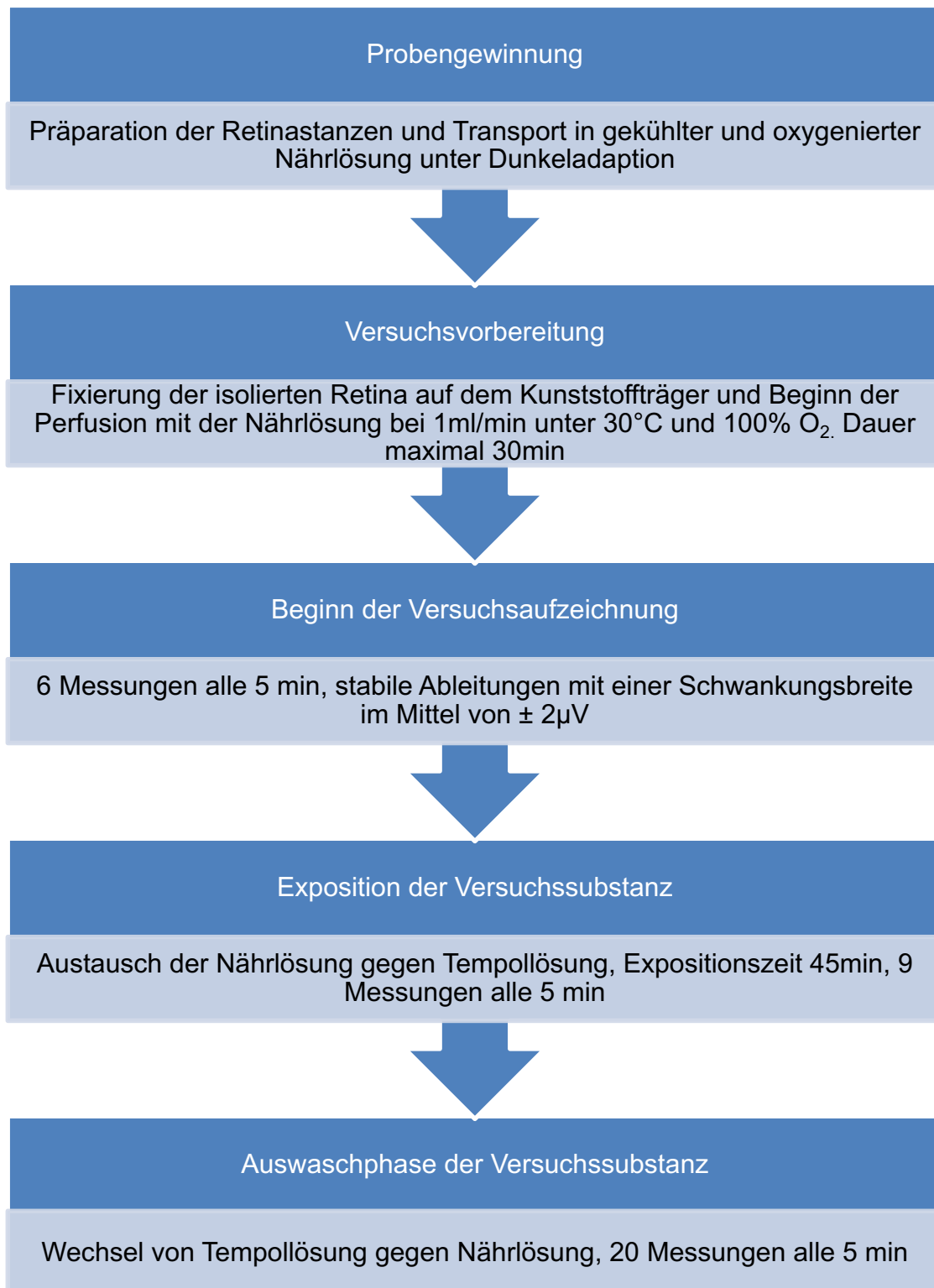


Abbildung 11: Protokoll eines Versuches der isolierten und perfundierten Retina.
Quelle: eigene Darstellung

Der Ablauf eines Versuchsprotokolls wird in Abbildung 11 vereinfacht dargestellt. Vor Beginn des Versuches wurde, nach Einspannen der Retina, für ca. 30 Minuten die Netzhaut mit der Nährlösung umspült bis sich eine stabile Baseline im ERG zeigte (Abweichung der Amplituden $\pm 2\mu\text{V}$). War dies der Fall konnte mit den Aufzeichnungen alle 5 Minuten für weitere 25 Minuten begonnen werden. Danach fand die Exposition mit dem eingesetzten Stoff statt und die Nährlösung wurde durch Tempol in Form einer Spüllösung ersetzt. Das in der Nährlösung gelöste Tempol befand sich in einem lichtgeschützten Behälter. Das Vorgehen wurde für weitere 45 Minuten mit neun Lichtreizen fortgeführt. Beim Austausch konnte ein kontinuierlicher Fluss der Lösung gewährleistet werden. Um Tempol auszuwaschen wurde erneut die reine Sicken-Nährlösung eingespült. Die Wash-Out Phase dauerte 100 Minuten mit weiteren 20 Messungen bei einem Abstand von 5 Minuten.

Es wurden folgende Konzentrationen in der Nährlösung für Tempol getestet: 0,5mM (nur a-Welle), 1mM, 2mM, 5mM (je a- und b-Welle) und 10mM (nur b-Welle). Die Konzentrationen wurden zuvor jeweils nach den Berechnungen in Tabelle 2 mit der Nährlösung angesetzt.

Die Versuche wurden mit einer Konzentration von 0,5 mM Tempol an b-Wellen begonnen, da bereits in Vorversuchen der Arbeitsgruppe 0,5 mM Tempol an a-Wellen getestet wurde und sich hier, nach Zugabe von 0,5 mM Tempol, keine signifikante Reduktion ($p > 0,05$) nach Auswaschen zeigte (Januschowski, Mueller et al. 2014). Dafür wurden die a-Wellen Versuche um die Konzentration 10 mM erweitert.

Für jede Konzentration wurden fünf Messreihen ($n = 5$) jeweils für die a- und b-Welle durchgeführt. Für die Aufzeichnungen der a-Welle wurden der Sickenlösung 1mM Aspartat hinzugefügt, um die Übermittlung an der ersten retinalen Synapse zu hemmen und somit die b-Welle zu unterdrücken (Hanawa and Tateishi 1970).

Für weitere sechs Versuche wurde eine Hypoxietestung durchgeführt. Bei dieser Versuchsreihe wurde wie bei den bereits vorbeschriebenen Versuchen

die Netzhaut von Rindern präpariert und mit der Standardlösung umspült. Jedoch wurde bei diesen Versuchen durch Weglassen der Sauerstoffzufuhr für den kompletten Zeitraum eine Hypoxie erzeugt. Nach Erhalt stabiler a-Wellen wurde für $n = 3$ für die Testphase von 45 Minuten reiner Stickstoff (N_2) hinzugefügt. Die anderen drei Versuche wurden ohne Stickstoff, nur durch Weglassen der Sauerstoffzufuhr, für den kompletten Versuchszeitraum durchgeführt. Hierdurch konnte jeweils Stress auf die Netzhaut ausgelöst werden.

Tabelle 2: Berechnungen der Ansätze für versch. Tempolkonzentrationen in der Sickerlösung.
Quelle: eigene Darstellung

$$A_0 = 0,5 \text{ mM}$$

$$0,5 \text{ mM} \times 172,24 \text{ g/mol} = 0,086 \text{ g/l} = 0,0086 \text{ g/ 100ml} = 0,017 \text{ g/ 200ml}$$

$$A_1 = 1 \text{ mM}$$

$$1 \text{ mM} \times 172,24 \text{ g/mol} = 0,17 \text{ g/l} = 0,017 \text{ g/ 100ml} = 0,034 \text{ g/ 200ml}$$

$$A_2 = 2 \text{ mM}$$

$$2 \text{ mM} \times 172,24 \text{ g/mol} = 0,34 \text{ g/l} = 0,034 \text{ g/ 100ml} = 0,068 \text{ g/ 200ml}$$

$$A_3 = 5 \text{ mM}$$

$$5 \text{ mM} \times 172,24 \text{ g/mol} = 0,86 \text{ g/l} = 0,086 \text{ g/ 100ml} = 0,172 \text{ g/ 200ml}$$

$$A_4 = 10 \text{ mM}$$

$$10 \text{ mM} \times 172,24 \text{ g/mol} = 1,7 \text{ g/l} = 0,17 \text{ g/ 100ml} = 0,34 \text{ g/ 200ml}$$

3.6 Ableitung und Interpretation des ERGs

Mithilfe der Labview ® Software wurde ein biphasisches ERG abgeleitet (Abb. 12, Abb. 13 und Kapitel 1.4.3). Einzelne Messungen wurden alle 5 Minuten manuell durchgeführt. Mittels eines Cursors wurde die Amplitude in μV und die Latenz in ms ermittelt. Hierbei ist die Amplitude der a-Welle von Beginn der Messung bis zum ersten lokalen Minimum definiert (Abb.12). Die b-Welle wird somit vom tiefsten Punkt (oft Gipfel der vorausgehenden a-Welle) bis zum darauffolgenden Maximum bestimmt (Abb.13).

Um eine stabile Ableitung zu erzielen, wurde die Qualität des ERGs durch eine Einlaufzeit von 30 Minuten überprüft. In dieser Zeit wurde darauf geachtet, dass die Abweichungen der Amplitude vorwiegend im Bereich von $\pm 2\mu\text{V}$ auftreten. Tatsächlich liegt der Mittelwert der maximalen Abweichungen von allen Messungen bei $0.85 \pm 0.08 \mu\text{V}$. Somit ist es auch möglich, in der späteren Auswertung die Durchschnittswerte aus den fünf Messreihen ($n = 5$) für die jeweilige Konzentration zu Beginn der Versuche mit den gemittelten Werten während und nach der Exposition zu vergleichen.

Weiterhin ist durch Aufrechterhaltung einer konstanten Umgebungsbedingung des Versuchsaufbaus mit Sauerstoffpartialdruck, Temperatur der Nährlösung und konstant osmotischem Druck für eine Stabilität der Ableitungen über den Versuchszeitraum gesorgt worden. Vorausgehende Untersuchungen zeigten unter denselben Bedingungen eine Stabilität bis zu zehn Stunden (Luke, Weiergraber et al. 2005).

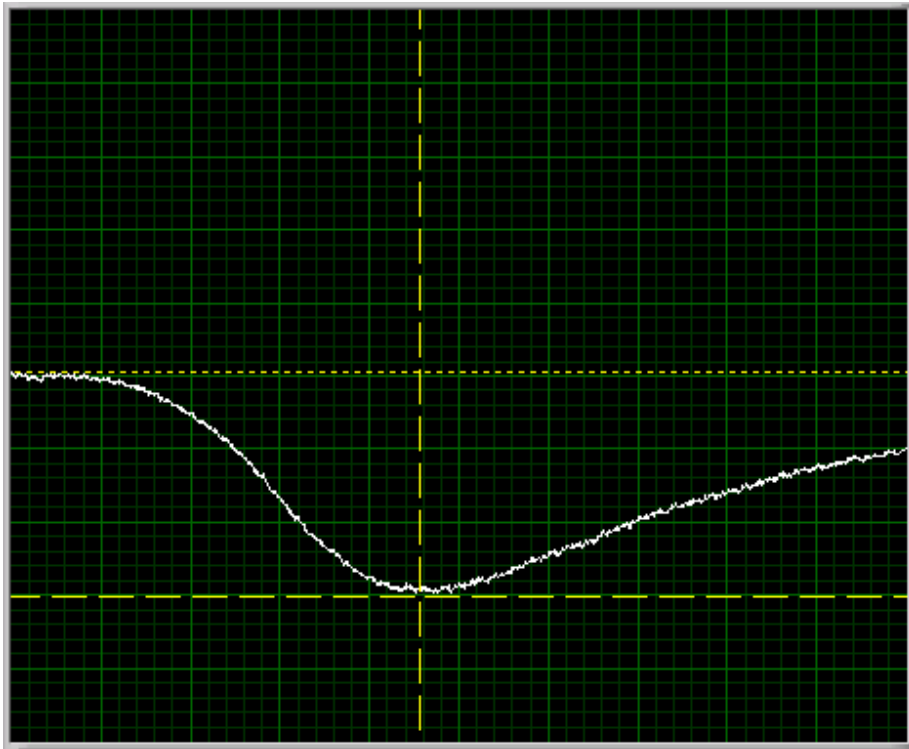


Abbildung 12: a-Welle in Labview ®.
Quelle: eigene Aufnahme

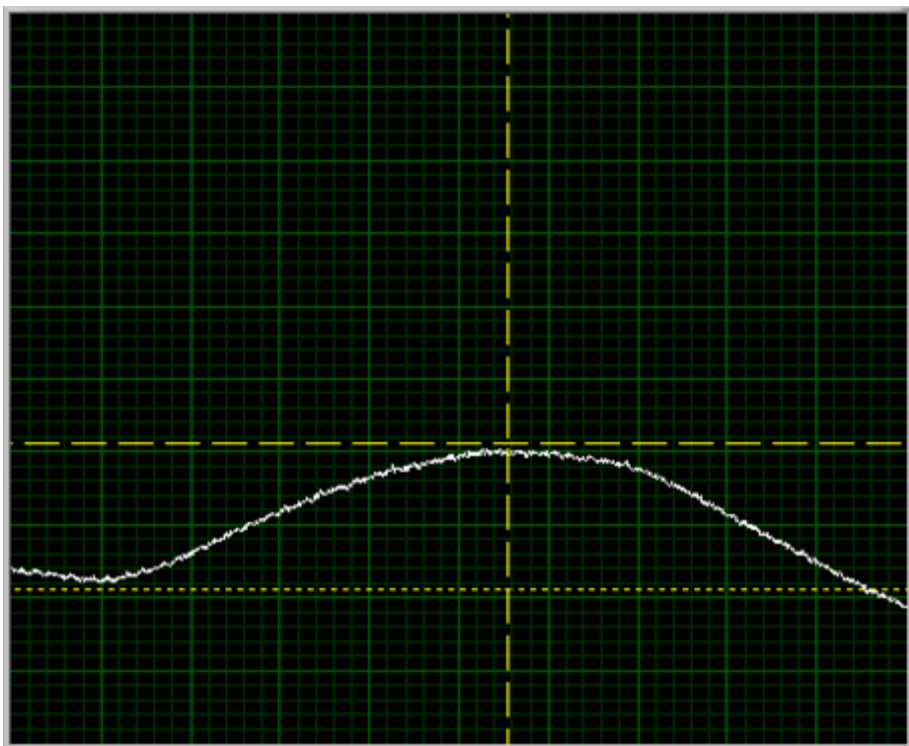


Abbildung 13: b-Welle in Labview ®.
Quelle: eigene Aufnahme

3.7 Ergebnisverarbeitung

Der Ausgangswert einer jeden Messung wurde zu Beginn manuell am Verstärker eingestellt. Da die Messungen zu den ersten sechs Zeitpunkten einer Messreihe identische Ausgangsbedingungen hatten, wurden diese Werte des Verstärkers a_i je nach Welle auf ± 10 geeicht. Dazu wurde die Differenz zwischen dem Mittelwert aus diesen sechs Werten ($\sum_{t=1}^6 a_t / 6$) und dem Eichwert e (-10 für a-Welle, +10 für b-Welle) allen Messwerten a_i hinzugefügt:

$$A_i = e + \left(a_i - \frac{1}{6} \sum_{t=1}^6 a_t \right)$$

Der Mittelwert \bar{A} und die Standardabweichung des Mittelwertes σ zu jedem Zeitpunkt einer Messreihe wurde wie folgt berechnet:

$$\bar{A} = \sum_{i=1}^5 A_i$$
$$\sigma = \frac{1}{\sqrt{5 * 4}} \sqrt{\sum_{i=1}^5 (A_i - \bar{A})^2}$$

Um ein stationäres Gleichgewicht nach Zugabe von Tempol (70. Minute) und nach Ende der Auswaschphase (170. Minute) mit dem Ausgangszustand (25. Minute) zu vergleichen, wurde der relative Wert und der p-Wert aus dem zweiseitigen t-Test (zwei Stichproben, ungleiche Varianz) ermittelt. Werte galten als statistisch signifikant, wenn der p-Wert $< 0,05$ betrug.

Genaue Auflistung der Ergebnisse sind in Kapitel 4.8 dargestellt. Die Datenauswertung und -darstellung erfolgte mit Microsoft Office Excel Version 16.16.9 (190412).

4. Ergebnisse

4.1 Konzentration von 0,5 mM Tempol in Kombination mit O₂

Wie bereits in Kapitel 3.5 erwähnt, wurden die Versuche mit 0,5 mM Tempol an den b-Wellen in dieser Arbeit begonnen, da diese Konzentration bereits in Vorversuchen an a-Wellen getestet wurde. Hierfür wurde die Retina unter kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr der Substanz Tempol für 45 Minuten ausgesetzt.

4.1.1 Auswirkung auf die b-Welle

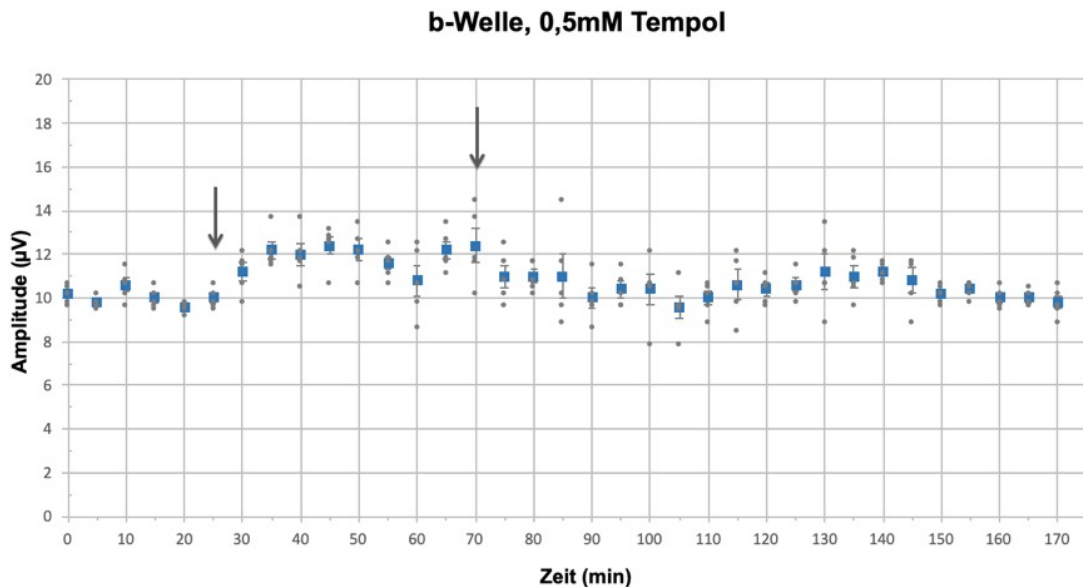


Abbildung 14: b-Wellen bei Exposition von 0,5mM Tempol. Pfeile markieren den Expositionszeitpunkt. Quelle: eigene Darstellung

Bei Konzentrationen von 0,5mM Tempol konnte nach 70 Minuten (2. Pfeil in Abb.14) ein signifikanter Anstieg der Amplitude um 24% ($p = 0,03$) gegenüber dem Zeitpunkt vor Tempolexposition in der 25. Minute verzeichnet werden. Am Ende der Auswaschphase war jedoch nur noch ein Anstieg von 2% ($p = 0,61$) im Vergleich zum Ausgangswert (1. Pfeil in Abb.14) erkennbar.

4.2 Konzentration von 1mM Tempol in Kombination mit O₂

Bei der Konzentration von 1mM Tempol zeigte sich keine signifikante Veränderung der a-Welle, während die b-Welle einen statistisch nicht signifikanten Rückgang zeigte.

4.2.1 Auswirkung auf die a-Welle

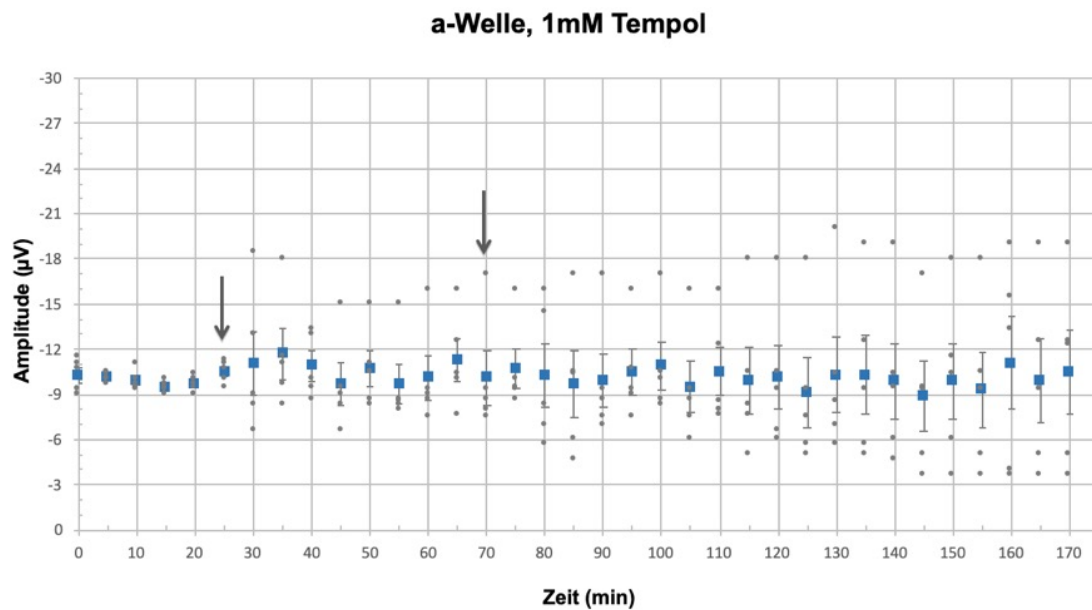


Abbildung 15: a-Wellen bei Exposition von 1mM Tempol. Pfeile markieren den Expositionszeitpunkt. Quelle: eigene Darstellung

Während die a-Welle einzelner Messreihen unter der Exposition von 1mM Tempol unterschiedlich verlaufen (-63% Reduktion bis 90% Zunahme bei 170. Minute gegenüber Zeitpunkt vor Exposition, 1. Pfeil in Abb. 15), zeigte sich über den kompletten Verlauf des Versuches keine wesentliche Veränderung der gemittelten Amplitude (0%, $p = 1$). Die stärkste Zunahme der Amplitude zeigte sich in der 35. Minute mit einem insignifikanten Anstieg von 11% ($p = 0,52$). Am Ende der Exposition von Tempol (2. Pfeil in Abb. 15) ergab sich eine unwesentliche Reduktion von 4% ($p = 0,83$) im Vergleich zum Ausgangspunkt (1. Pfeil in Abb. 15).

4.2.2 Auswirkung auf die b-Welle

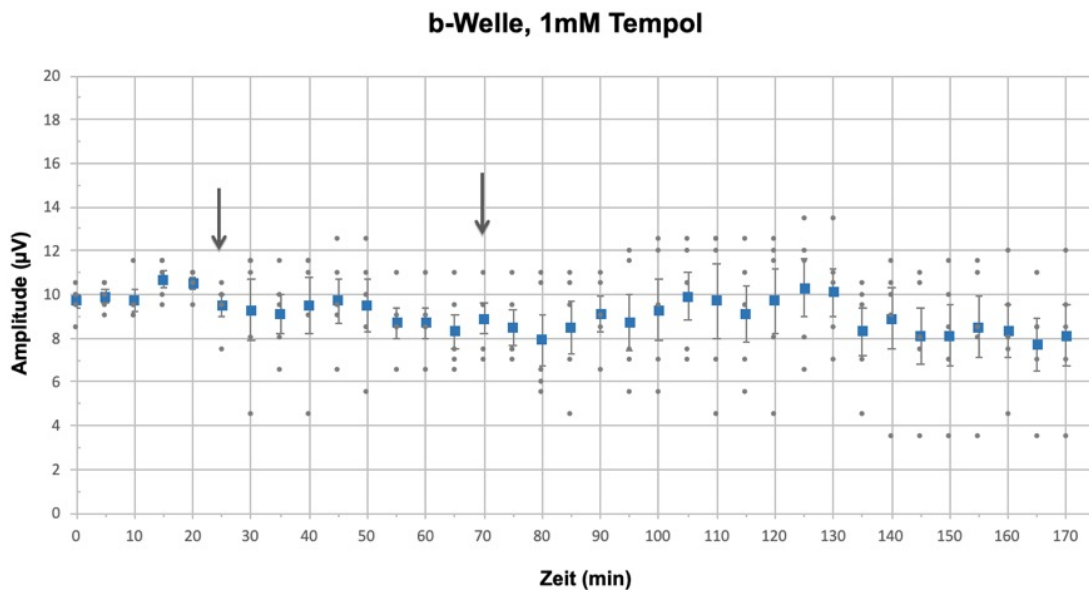


Abbildung 16: b-Wellen bei Exposition von 1mM Tempol. Pfeile markieren den Expositionszeitpunkt. Quelle: eigene Darstellung

Auch bei einer Konzentration von 1mM Tempol konnte mit -23% kein statistisch signifikanter Rückgang ($p = 0,39$) der b-Welle nach Beendigung der Versuche notiert werden. Jedoch zeigte sich im Vergleich zum Ende der Expositionszeit mit einem nicht signifikanten Rückgang von -6% ($p = 0,53$, 2. Pfeil in Abb. 16) nach Auswaschphase ein weiterer Abfall.

4.3 Konzentration von 2mM Tempol in Kombination mit O₂

Bei der Testung von 2mM Tempol zeigte sich ein relevanter Rückgang der Amplitude der b-Wellen und ein statistisch nicht signifikanter Rückgang der a-Wellen.

4.3.1 Auswirkung auf die a-Welle

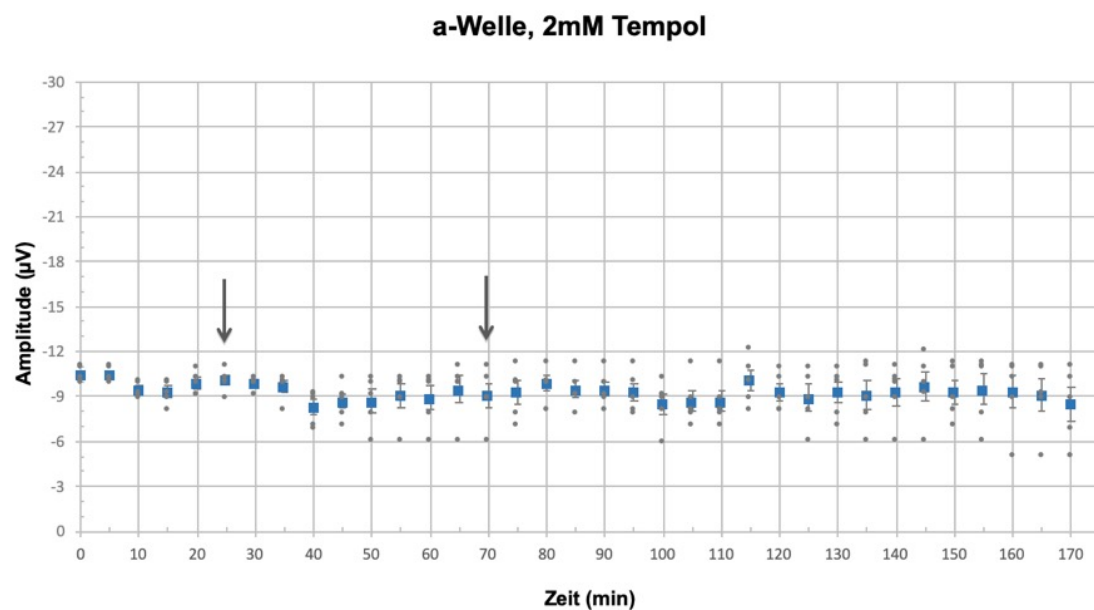


Abbildung 17: a-Wellen bei Exposition von 2mM Tempol. Pfeile markieren den Expositionszeitpunkt. Quelle: eigene Darstellung

Unter der Exposition von 2mM Tempol entwickelte sich die a-Welle nur mäßig rückläufig. Die zweitniedrigste Reduktion zeigte sich am Ende der Auswaschphase mit -14% ($p = 0,23$), während am Ende der Expositionszeit (2. Pfeil in Abb. 17) nur -1% ($p = 0,32$) zu verzeichnen war.

4.3.2 Auswirkung auf die b-Welle

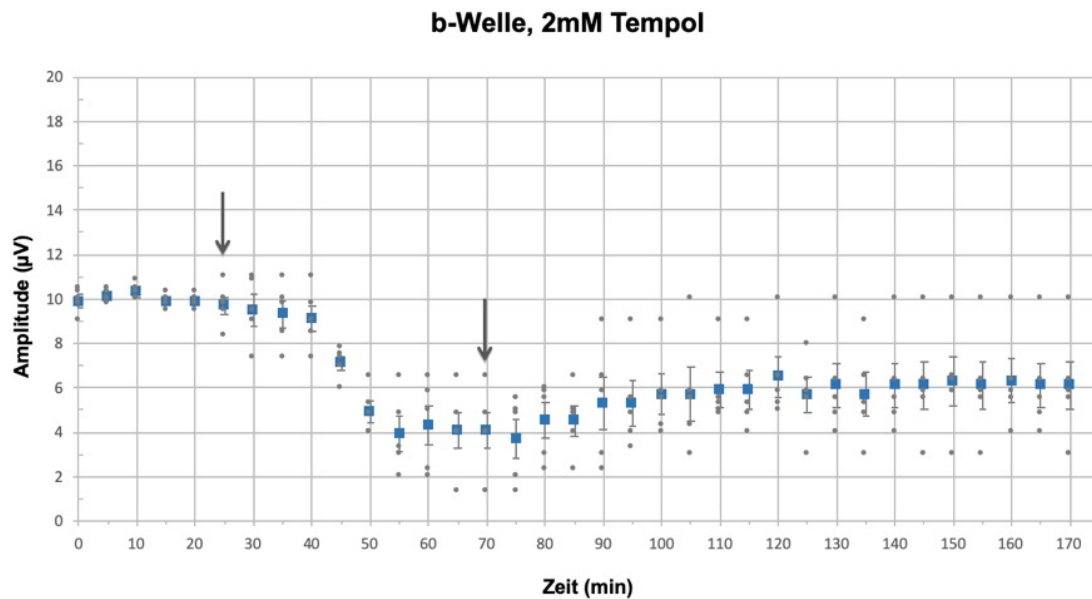


Abbildung 18: b-Wellen bei Exposition von 2mM Tempol. Pfeile markieren den Expositionszeitpunkt. Quelle: eigene Darstellung

Bei einer Konzentration von 2mM Tempol zeigte sich ein signifikanter Einsturz der b-Welle von -38% ($p = 0,03$) am Ende des Versuches. Der größte Abfall der Amplitude lag jedoch nach Beendigung der Expositionszeit in der 75. Minute mit -62% ($p = 0,001$) und erholte sich dann gegen Ende der Auswaschphase wieder (-14%, $p = 0,23$).

4.4 Konzentration von 5mM Tempol in Kombination mit O₂

Bei der Exposition von 5mM Tempol zeigte sich ein statistisch signifikanter Rückgang nach Exposition bei den b-Wellen und eine nicht signifikante Erhöhung der a-Wellen Amplitude.

4.4.1 Auswirkung auf die a-Welle

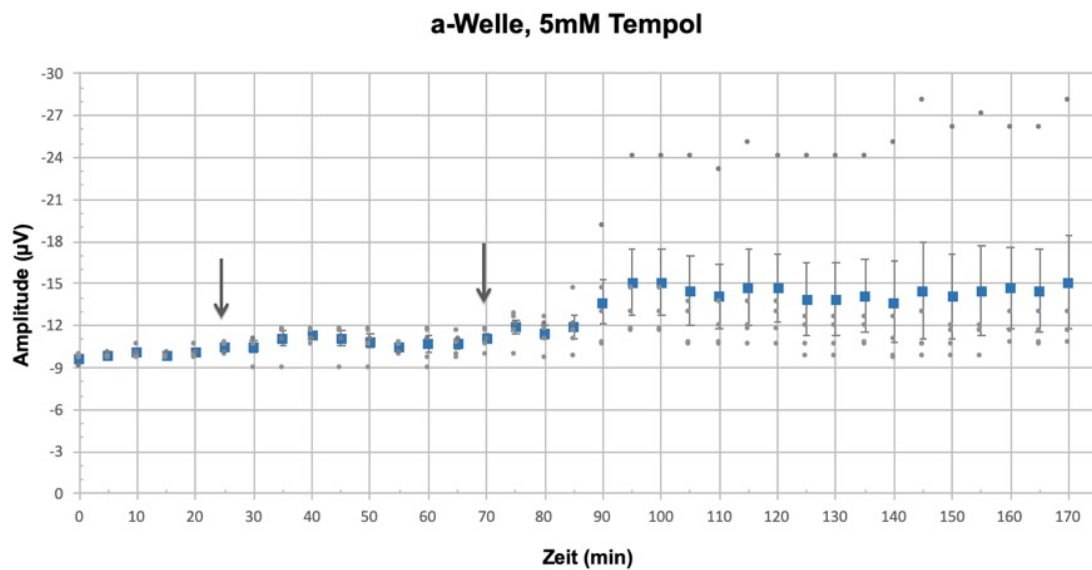


Abbildung 19: a-Wellen bei Exposition von 5mM Tempol. Pfeile markieren den Expositionszeitpunkt. Quelle: eigene Darstellung

Nach Ende der Expositionszeit von 5mM Tempol ist die durchschnittliche Amplitude um 6% ($p = 0,16$) angestiegen. Im Verlauf der Auswaschphase kam es zu einem weiteren Anstieg, sodass am Ende des Versuches eine Zunahme von 50% ($p = 0,24$) mit der im Mittel höchsten Amplitude zu verzeichnen war.

4.4.2 Auswirkung auf die b-Welle

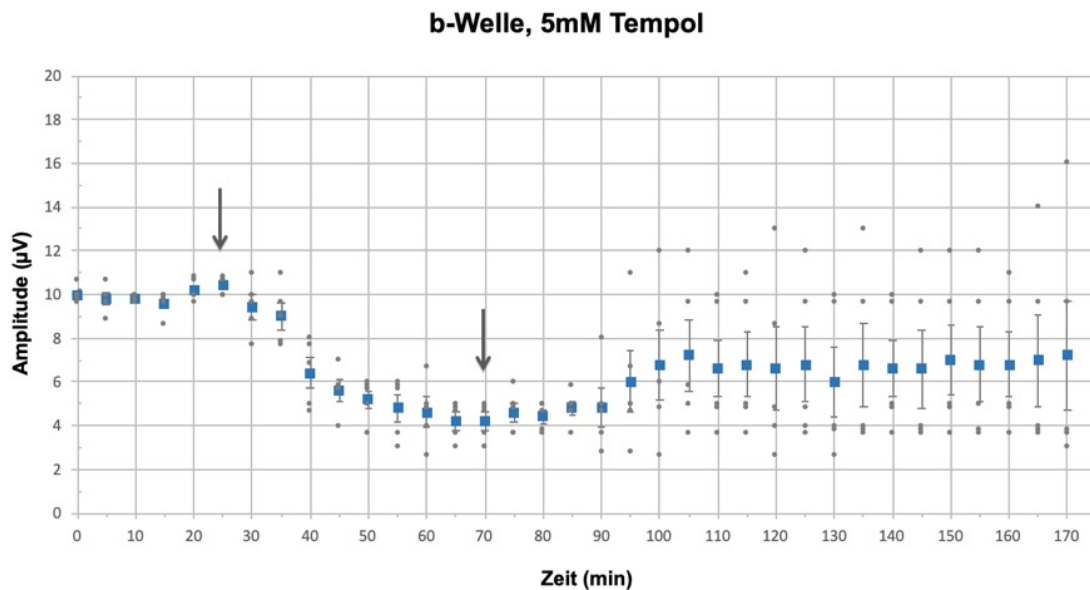


Abbildung 20: b-Wellen bei Exposition von 5mM Tempol.
Pfeile markieren den Expositionszeitpunkt. Quelle: eigene Darstellung

Nach der Einwirkungszeit von Tempol 5mM zeigte sich ein initialer Abfall der durchschnittlichen Amplitude in der 70. Minute (2. Pfeil in Abb. 20) von -60% ($p = 10^{-5}$). Im Mittel blieb die Amplitude am Ende der Auswaschphase bei einem Abfall von -29% ($p = 0,27$), was sich nicht mehr als statistisch signifikant zeigte. Wie bereits bei der b-Welle mit 2mM Tempol zeigte sich auch hier nach der Tempolexposition (70. min) eine Zunahme der Streuung der Messdaten.

4.5 Konzentration von 10mM Tempol in Kombination mit O₂

Nach 45minütiger Exposition mit 10mM Tempol nach Protokollvorgabe und anschließender Auswaschphase zeigte sich ein signifikanter Anstieg der a-Wellen.

4.5.1 Auswirkung auf die a-Welle

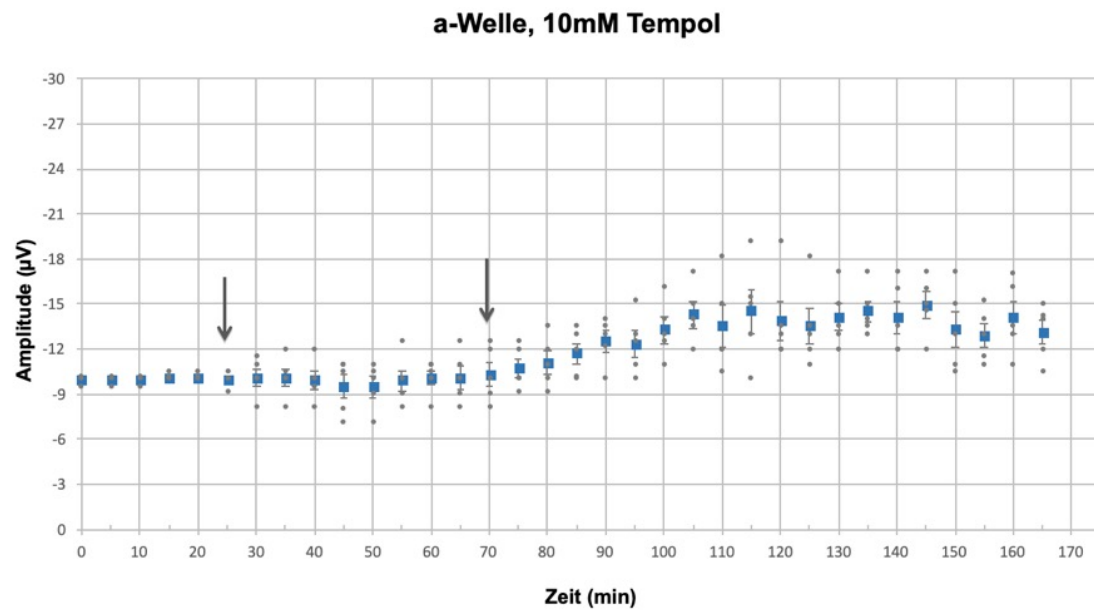


Abbildung 21: a-Wellen bei Exposition von 10mM Tempol. Pfeile markieren den Expositionszeitpunkt. Quelle: eigene Darstellung

Am Ende der Expositionszeit lag die Zunahme bei unwesentlichen 4% ($p = 0,67$), während nach Ende der Auswaschphase ein signifikanter Anstieg von 32% ($p = 0,001$) zu erkennen war.

4.6 Hypoxietestung (ohne Tempol, N₂ oder O₂)

Hier wurde über die komplette Versuchsdauer die Sauerstoffzufuhr unterbunden und außer der Sickellösung mit 1mM Aspartat keinerlei weitere Substanzen hinzugefügt. Auch während der üblichen Auswaschphase nach der 70. Minute wurde bis zum Ende keine weitere Substanz oder Sauerstoff hinzugegeben.

4.6.1 Auswirkung auf die a-Welle

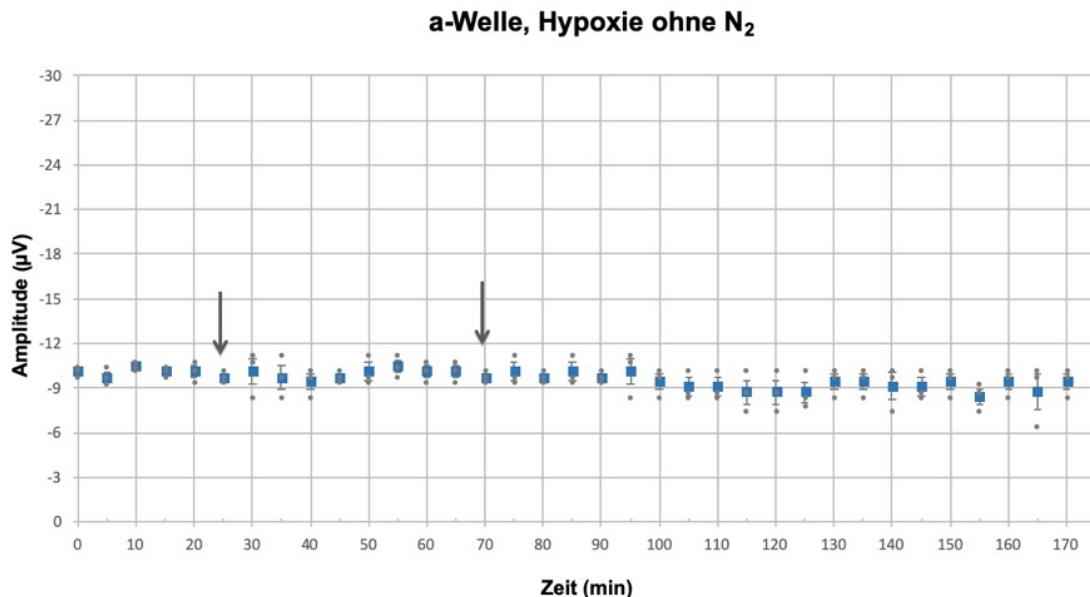


Abbildung 22: a-Wellen mit Hypoxie, ohne Exposition von Tempol. Pfeile markieren die üblichen Zeitpunkte, in denen in den vorbeschriebenen Versuchen die Tempolexposition stattgefunden hat (25.min und 70.min). Quelle: eigene Darstellung

Es zeigte sich im Versuch ohne Sauerstoff und ohne Exposition von Tempol keine wesentliche Veränderung (0%, $p = 1$) im Mittel nach 70 Minuten (2. Pfeil in Abb. 22). Im Verlauf zeigte sich nach leichter Varianz am Ende eine nicht signifikante Abnahme von -6,9% ($p = 0,62$).

4.7 Hypoxietestung in Kombination mit N₂ (ohne Tempol und O₂)

Bei dieser Form der Hypoxietestung wurde reiner Stickstoff (N₂) anstelle von Tempol während der 45minütigen Testphase zugeführt. Zuvor und während der gesamten Testphase wurde der Sikkellösung mit 1mM Aspartat kein Sauerstoff hinzugegeben.

4.7.1 Auswirkung auf die a-Welle

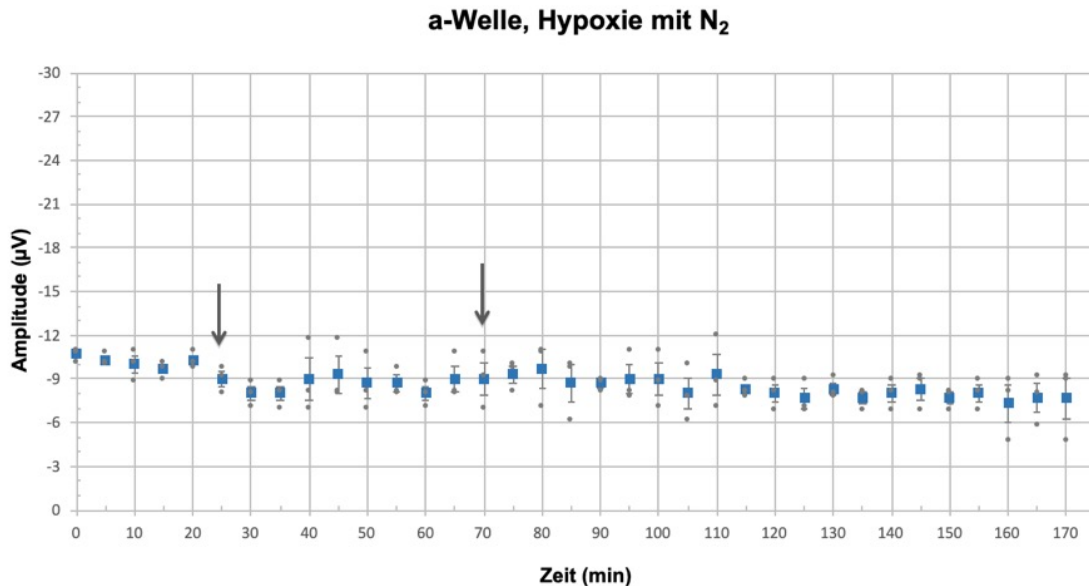


Abbildung 23: a-Wellen mit Hypoxie, ohne Exposition von Tempol. Pfeile markieren Stickstoffexposition. Quelle: eigene Darstellung

Es zeigte sich direkt nach Beginn der N₂ Zufuhr (30. Minute) ein Abfall der Amplitude um -11% ($p = 0.24$). Nach Beendigung der N₂ Zufuhr (2. Pfeil in Abb. 23) war jedoch keine wesentliche Veränderung (0%, $p = 1$) zum Ausgangswert (1. Pfeil in Abb. 23) zu erkennen. Am Ende der Versuchsreihe zeigte sich bei den gemittelten Werten eine Reduktion der Amplitude um -25% ($p = 0.45$).

4.8 Ergebnisauswertung

Für fünf verschiedene Konzentrationen (0,5mM, 1mM, 2mM, 5mM, 10mM) wurden jeweils fünf Versuche für a- und b-Wellen unternommen. Ausgenommen war die Konzentration 0,5mM, für die nur b-Wellen durchgeführt wurden, da bereits aus Vorversuche Ergebnisse von a-Wellen für diese Konzentration vorlagen. Auch die Konzentration 10mM wurde nur mit a-Wellen durchgeführt, da sich bereits bei 2mM und 5mM signifikante Effekte auf die b-Wellen zeigten und keine anderen Tendenzen zu erwarten waren.

4.8.1 Auswirkung der Konzentrationen von Tempol auf die b-Welle

Tatsächlich konnte sich bei den b-Wellen bereits bei einer Konzentration von 1mM ein leichter Abfall der Amplitude von -23% ($p = 0,39$) erkennen lassen (Abb. 24). Hingegen zeigte sich bei 0,5mM ein deutlicher Anstieg nach Tempolgabe von 24% ($p = 0,03$) und ein noch leicht vorhandener Anstieg der Amplitude auf 2% ($p = 0,61$) am Ende des Versuches. Insgesamt war der maximale Rückgang der b-Wellen bei 2mM Tempol mit statistisch signifikanten -38% am Ende am stärksten. Sowohl 2mM und 5mM zeigten eine ähnliche Reduktion der Amplitude direkt nach Beendigung der Testsubstanz (2mM = -58%; 5mM = -60%). Bei den b-Wellen zeigte sich bei 0,5mM ($p = 0,03$), 2mM ($p = 0,001$) und 5mM ($p = 10^{-5}$) eine statistisch signifikante Veränderung nach Beendigung der Testphase, die jedoch nur bei 2mM ($p = 0,03$) am Ende des Versuches weiterhin als statistisch signifikant bestehen blieb. Die Konzentration von 1mM ergab an den zwei Vergleichspunkten in der 70. ($p = 0,52$) und 170. Minute ($p = 0,39$) keine statistische Signifikanz (Tab. 3). Abbildung 24 zeigt deutlich den Abfall der Amplituden bei den beiden höheren Konzentrationen von Tempol. Interessant war, dass 5mM im Mittel einen geringeren Abfall als 2mM zeigte und nach Auswaschen auch reversibler erschien. Tempol in Konzentrationen geringer als 0,5mM scheint einen vitalisierenden Effekt auf die b-Wellen auszuüben. Während der Exposition mit 0,5mM und auch nach Auswaschen war ein leichter Zugewinn erkennbar. Auffällig war, dass sich bei 1mM nach Beendigung der Testphase noch kein wesentlicher Einbruch der Amplituden zeigte, während bei 2mM bereits eine deutliche Reduktion

vorhanden war. Es ist anzunehmen, dass zwischen diesen beiden Konzentrationen (1mM und 2mM) ein wesentlicher Unterschied in der Wirkung von Tempol stattgefunden hat. Eine detailliertere Darstellung in Abbildung 25 gibt hierüber Aufschluss. Allerdings zeigte sich bereits bei 1mM eine irreversible Reduktion der Amplituden am Ende der Auswaschphase, weshalb hier bereits von einer scheinbar anhaltenden Schädigung auszugehen ist.

Tabelle 3: Prozentuale Veränderung der gemittelten Amplituden und p-Werte der b-Welle bei den Endpunkten vor dem Auswaschen (70. min) und am Ende des Auswaschens (170. min) gegenüber dem Ausgangswert (25. min).
Quelle: eigene Darstellung

		0,5 mM	1 mM	2 mM	5 mM
70. min		24%	-6%	-58%	-60%
	p =	0,03	0,52	0,001	10 ⁻⁵
170. min		2%	-23%	-38%	-29%
	p =	0,61	0,39	0,03	0,27

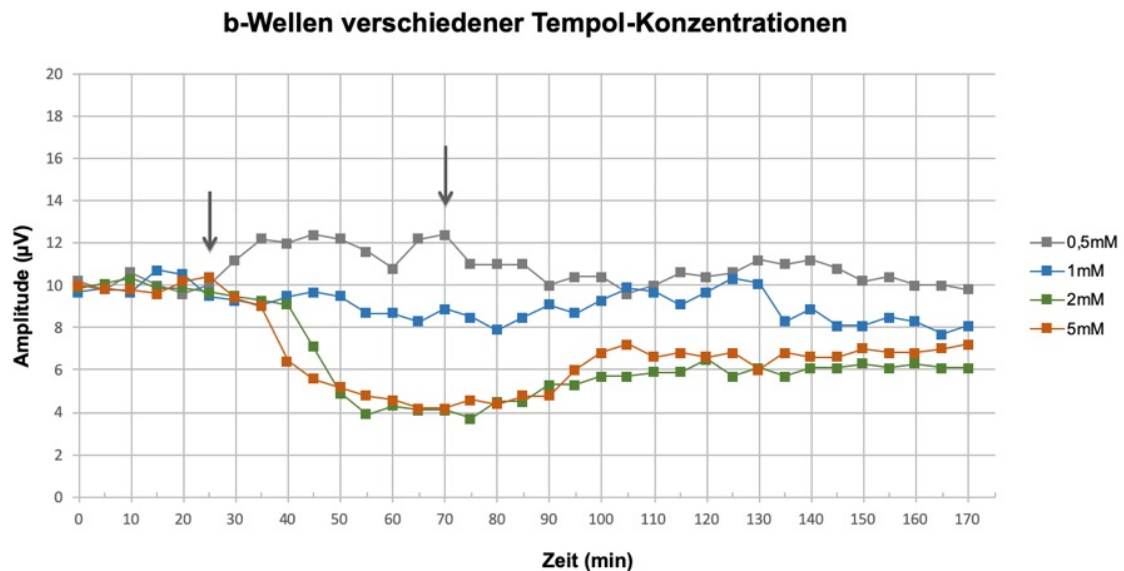


Abbildung 24 : b-Wellen verschiedener Tempol Konzentrationen.
Quelle: eigene Darstellung

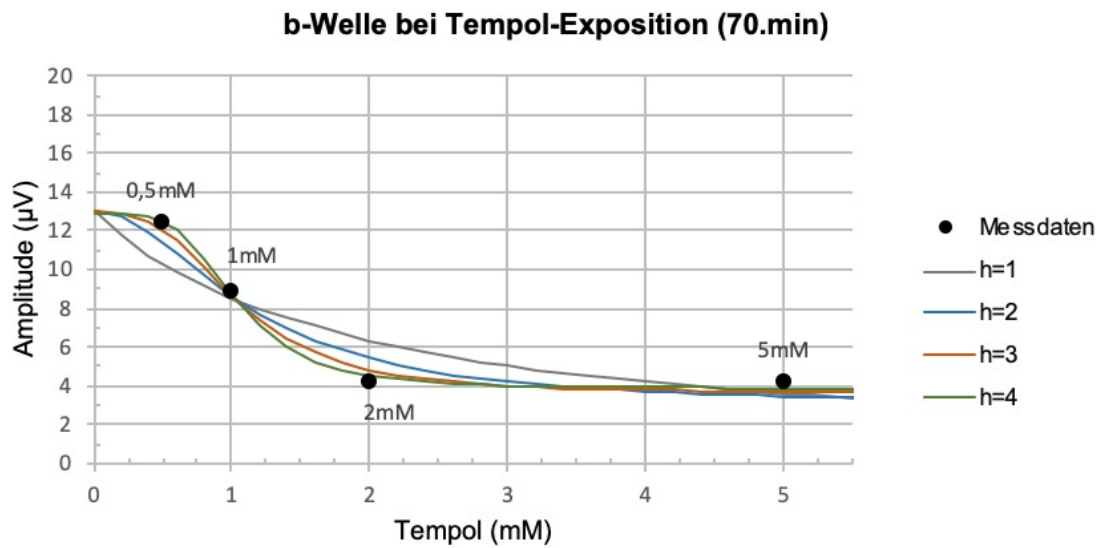
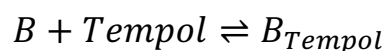


Abbildung 25: Messpunkte zeigen die Amplitude der b-Welle bei verschiedenen Konzentrationen zum Zeitpunkt 70.min.
Quelle: eigene Darstellung

Die Messdaten der b-Wellen bei verschiedenen Tempolkonzentrationen in der 70. Minute zeigten einen signifikanten Abfall, der sich in einer Sigmoidfunktion darstellen ließ (Abb. 25). Um diesen Abfall beschreiben zu können, wurde ein Bindungsmodell von Tempol zu den Bipolarzellen, die hier stellvertretend für die b-Welle angenommen werden, angewandt (Alberts 2014). Die Amplitude der b-Welle hing von den ungebundenen Bipolarzellen ab und Tempol minderte durch Bindung an freie Bipolarzellen diese Antwort. Daher war die Amplitude proportional zum Quotienten der ungebundenen Bipolarzellen ($[B]$) zu den gesamten Bipolarzellen zu sehen:

$$A([Tempol]) \propto \frac{[B]}{[B_{Total}]} = \frac{[B]}{[B] + [B_{Tempol}]} \quad (1)$$

Die Bindung von Tempol an Bipolarzellen wurde durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben:



Mit der dazugehörigen Dissoziationskonstante $k = [B][Tempol]/[B_{Tempol}]$ ergab sich folgendes Modell mit dem Anfangswert A_0 und Grenzwert A_∞ :

$$A([Tempol]) = \frac{A_0 - A_\infty}{1 + [Tempol]/k} + A_\infty$$

Da unklar war wie die molekulare Bindung zwischen Bipolarzellen und Tempol aussieht, wurde die Hill-Konstante h als ein Maß für die Anzahl der Bindungsstellen hinzugefügt (Alberts 2014):

$$A([Tempol]) = \frac{A_0 - A_\infty}{1 + ([Tempol]/k)^h} + A_\infty$$

Als visuellen Vergleich für die Datenbeschreibung wurden vier Modelle ($h = 1,2,3,4$) verwendet. Hierbei war zu erkennen, dass eine höhere Hill-Konstante ($h > 2$) sich an die erhobenen Messdaten besser annähert. Somit war von einer höheren Zahl an Bindungsstellen auszugehen. Es ergab sich für die Dissoziationskonstante ein Wert von 1,05mM für $h = 3$ und 1,05mM für $h = 4$. Um Werte wie Dissoziationskonstante und Hill-Konstante statistisch genauer zu beschreiben, sind folglich weitere Daten im Bindungsbereich um 0,5mM und 2mM notwendig.

Exkurs zur Herleitung des Bindungsmodells:

Mit der Dissoziationskonstante folgt aus Formel (1):

$$\begin{aligned} A([Tempol]) &\propto \frac{[B]}{[B] + [B_{Tempol}]} = \frac{[B]}{[B] + \frac{[B][Tempol]}{k}} \\ &= \frac{1}{1 + [Tempol]/k} \end{aligned}$$

Aus der Proportionalität folgt die Geradengleichung mit der Steigung m und der Konstante c :

$$\Rightarrow A([Tempol]) = \frac{m}{1 + [Tempol]/k} + c$$

Mit den Randbedingungen $A([Tempol] = 0) = A_0 = m + c$ und $A([Tempol] \rightarrow \infty) = A_\infty = c$ lässt es sich weiterführen zu:

$$A([Tempol]) = \frac{A_0 - A_\infty}{1 + [Tempol]/k} + A_\infty$$

Tabelle 4: Mittelwert (mean) und Standardabweichung (SD) der ERG b-Welle Amplitude.
 Quelle: eigene Darstellung

Time min	0,5 mM tempol		1 mM tempol		2 mM tempol		5 mM tempol	
	mean, μV	SD, μV	mean, μV	SD, μV	mean, μV	SD, μV	mean, μV	SD, μV
0	10,2	0,2	9,7	0,3	9,9	0,3	10,0	0,2
5	9,8	0,1	9,9	0,3	10,1	0,1	9,8	0,3
10	10,6	0,3	9,7	0,5	10,3	0,2	9,8	0,1
15	10,0	0,2	10,7	0,4	9,9	0,1	9,6	0,2
20	9,6	0,1	10,5	0,3	9,9	0,1	10,2	0,2
25	10,0	0,2	9,5	0,5	9,7	0,4	10,4	0,2
30	11,2	0,4	9,3	1,4	9,5	0,7	9,4	0,6
35	12,2	0,4	9,1	0,9	9,3	0,6	9,0	0,6
40	12,0	0,5	9,5	1,3	9,1	0,6	6,4	0,7
45	12,4	0,4	9,7	1,0	7,1	0,3	5,6	0,5
50	12,2	0,5	9,5	1,2	4,9	0,5	5,2	0,4
55	11,6	0,3	8,7	0,7	3,9	0,8	4,8	0,6
60	10,8	0,7	8,7	0,7	4,3	0,9	4,6	0,7
65	12,2	0,4	8,3	0,8	4,1	0,8	4,2	0,4
70	12,4	0,8	8,9	0,7	4,1	0,8	4,2	0,4
75	11,0	0,5	8,5	0,8	3,7	0,9	4,6	0,4
80	11,0	0,3	7,9	1,2	4,5	0,8	4,4	0,3
85	11,0	1,0	8,5	1,2	4,5	0,7	4,8	0,3
90	10,0	0,5	9,1	0,8	5,3	1,2	4,8	0,9
95	10,4	0,4	8,7	1,3	5,3	1,0	6,0	1,4
100	10,4	0,7	9,3	1,4	5,7	0,9	6,8	1,6
105	9,6	0,5	9,9	1,1	5,7	1,2	7,2	1,6
110	10,0	0,3	9,7	1,7	5,9	0,8	6,6	1,3
115	10,6	0,7	9,1	1,3	5,9	0,9	6,8	1,5
120	10,4	0,3	9,7	1,5	6,5	0,9	6,6	1,9
125	10,6	0,3	10,3	1,3	5,7	0,8	6,8	1,7
130	11,2	0,8	10,1	1,1	6,1	1,0	6,0	1,6
135	11,0	0,5	8,3	1,1	5,7	1,0	6,8	1,9
140	11,2	0,2	8,9	1,4	6,1	1,0	6,6	1,3
145	10,8	0,6	8,1	1,3	6,1	1,1	6,6	1,8
150	10,2	0,2	8,1	1,4	6,3	1,1	7,0	1,6
155	10,4	0,2	8,5	1,4	6,1	1,1	6,8	1,7
160	10,0	0,2	8,3	1,2	6,3	1,0	6,8	1,5
165	10,0	0,2	7,7	1,2	6,1	1,0	7,0	2,1
170	9,8	0,3	8,1	1,4	6,1	1,1	7,2	2,5

4.8.2 Auswirkung der Konzentrationen von Tempol auf die a-Welle

Die Amplituden der a-Wellen zeigten jedoch bei Zunahme der Konzentration von Tempol auch eine Zunahme mit einem Zugewinn von 50% ($p = 0,24$) bei 5mM und 32% ($p = 0,001$) bei 10mM. Bei niedrigeren Konzentrationen konnte kein Anstieg der Amplituden erkannt werden (Abb. 26). Auch kein wesentlicher schädlicher Effekt von 1mM Tempol mit 0% ($p = 1$) am Ende des Versuches konnte erkannt werden und nur eine geringfügige, nicht signifikante Abnahme um -4% ($p = 0,83$) nach direkter Gabe der Substanz. Die Konzentration 2mM fällt mit einer leichten Reduktion von -14% aus der Reihe der restlichen Konzentrationskurven. Diese Veränderung ist jedoch statistisch als nicht signifikant zu werten ($p = 0,23$). Wenn man die beiden Vergleichspunkte nach Beendigung der Testsubstanz in der 70. Minute und das Ende des Versuches in der 170. Minute genauer anschaut, ergibt sich bei den Konzentrationen der a-Welle lediglich bei 10mM eine statistisch signifikante Zunahme ($p = 0,001$). 1mM ($p = 1$), 2mM ($p = 0,23$) und 5mM ($p = 0,24$) zeigten aufgrund einer größeren Streubreite der Ergebnisse nach dem Auswaschen keine statistisch signifikanten Veränderungen am Ende des Versuches.

Tabelle 5: Prozentuale Veränderung der gemittelten Amplituden und p-Werte der a-Welle bei den Endpunkten vor dem Auswaschen (70. min) und am Ende des Auswaschens (170. min) gegenüber dem Ausgangswert (25. min).
Quelle: eigene Darstellung

		1 mM	2 mM	5 mM	10 mM
70. min		-4%	-1%	6%	4%
	p =	0,83	0,32	0,16	0,67
170. min		0%	-14%	50%	32%
	p =	1	0,23	0,24	0,001

a-Wellen verschiedener Tempol-Konzentrationen

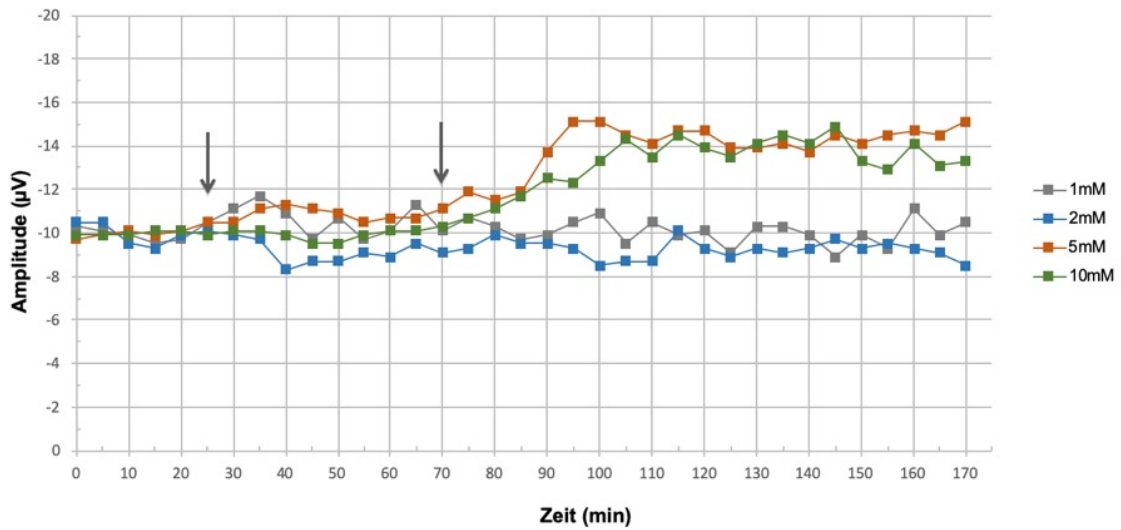


Abbildung 26 : a-Wellen verschiedener Tempol Konzentrationen.
Quelle: eigene Darstellung

a-Welle bei Tempol-Exposition (70.min)

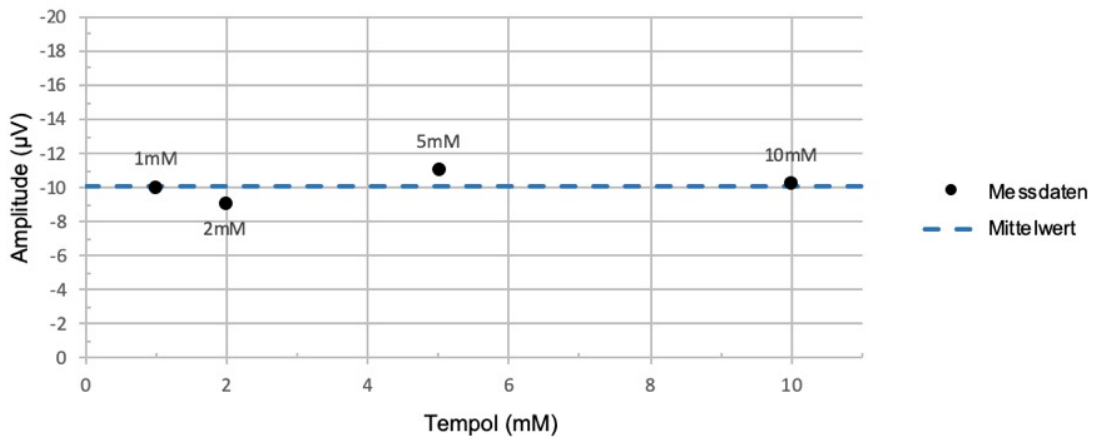


Abbildung 27: Messpunkte zeigen die Amplitude der a-Welle bei verschiedenen Konzentrationen zum Zeitpunkt 70. min.
Quelle: eigene Darstellung

Abbildung 27 lässt erkennen, dass sich die Amplitude der a-Welle unmittelbar nach Tempolexposition unabhängig von der Konzentration auf einem ähnlichen

Niveau lag. Hier ließ sich nicht wie bei der b-Welle eine Tempol-abhängige Funktion graphisch darstellen.

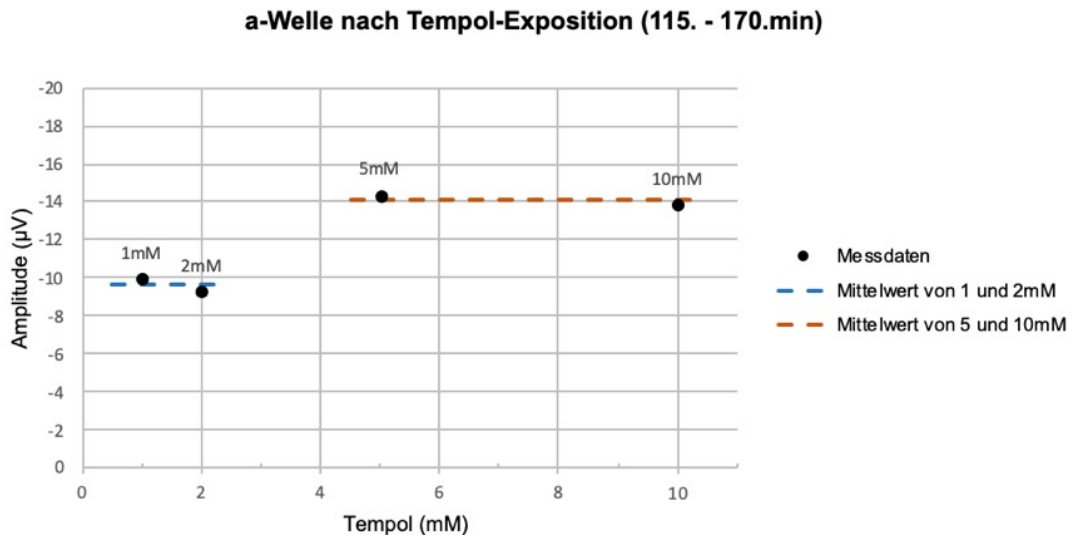


Abbildung 28: Messpunkte zeigen die gemittelte Amplitude der a-Welle bei verschiedenen Konzentrationen im Zeitfenster der 115.-170.min.
Quelle: eigene Darstellung

Auffällig war jedoch bereits in Abbildung 26 zu erkennen, dass sich die beiden höheren Konzentrationen in der Auswaschzeit nach Tempolexposition von den beiden niedrigeren Konzentrationen klar trennten. Während 1mM und 2mM nahezu auf einem ähnlichen Niveau wie bereits während der Tempolexposition bestehen blieben, zeigte sich ein deutlicher Anstieg bei 5mM und 10mM. Die Darstellung in Abbildung 28 verdeutlicht dies. Hier zeigt sich eine gemittelte Amplitude ab der 115. Minute. Ein deutlicher Sprung der Amplitude im Bereich zwischen 2mM und 5mM lässt sich erahnen (47%). Es lässt sich hierdurch ein verzögerter Effekt von Tempol vermuten. Um den Sprung zwischen 2mM und 5mM ausfüllen zu können, wären weitere Messwerte in diesem Konzentrationsbereich notwendig.

Tabelle 6: Mittelwert (mean) und Standardabweichung (SD) der ERG a-Welle Amplitude.

Quelle: eigene Darstellung

Time min	1 mM tempol		2 mM tempol		5 mM tempol		10 mM tempol	
	mean, µV	SD, µV	mean, µV	SD, µV	mean, µV	SD, µV	mean, µV	SD, µV
0	-10,3	0,5	-10,5	0,2	-9,7	0,1	-9,9	0,1
5	-10,1	0,1	-10,5	0,2	-9,9	0,1	-9,9	0,1
10	-9,9	0,3	-9,5	0,2	-10,1	0,2	-9,9	0,1
15	-9,5	0,2	-9,3	0,4	-9,9	0,1	-10,1	0,1
20	-9,7	0,2	-9,9	0,4	-10,1	0,2	-10,1	0,1
25	-10,5	0,3	-10,1	0,3	-10,5	0,2	-9,9	0,2
30	-11,1	2,1	-9,9	0,2	-10,5	0,4	-10,1	0,6
35	-11,7	1,7	-9,7	0,4	-11,1	0,5	-10,1	0,6
40	-10,9	1,0	-8,3	0,5	-11,3	0,2	-9,9	0,6
45	-9,7	1,4	-8,7	0,5	-11,1	0,5	-9,5	0,8
50	-10,7	1,2	-8,7	0,8	-10,9	0,5	-9,5	0,7
55	-9,7	1,3	-9,1	0,8	-10,5	0,2	-9,9	0,7
60	-10,1	1,5	-8,9	0,8	-10,7	0,6	-10,1	0,5
65	-11,3	1,4	-9,5	0,9	-10,7	0,4	-10,1	0,8
70	-10,1	1,8	-9,1	0,8	-11,1	0,3	-10,3	0,8
75	-10,7	1,3	-9,3	0,8	-11,9	0,5	-10,7	0,6
80	-10,3	2,1	-9,9	0,5	-11,5	0,5	-11,1	0,8
85	-9,7	2,2	-9,5	0,6	-11,9	0,8	-11,7	0,7
90	-9,9	1,8	-9,5	0,5	-13,7	1,6	-12,5	0,7
95	-10,5	1,5	-9,3	0,6	-15,1	2,3	-12,3	0,9
100	-10,9	1,6	-8,5	0,7	-15,1	2,3	-13,3	0,9
105	-9,5	1,7	-8,7	0,7	-14,5	2,5	-14,3	0,9
110	-10,5	1,6	-8,7	0,7	-14,1	2,3	-13,5	1,4
115	-9,9	2,2	-10,1	0,7	-14,7	2,7	-14,5	1,5
120	-10,1	2,1	-9,3	0,6	-14,7	2,4	-13,9	1,3
125	-9,1	2,3	-8,9	0,9	-13,9	2,6	-13,5	1,2
130	-10,3	2,5	-9,3	0,7	-13,9	2,6	-14,1	0,9
135	-10,3	2,6	-9,1	1,0	-14,1	2,6	-14,5	0,7
140	-9,9	2,5	-9,3	0,9	-13,7	2,9	-14,1	1,1
145	-8,9	2,3	-9,7	1,0	-14,5	3,5	-14,9	0,9
150	-9,9	2,5	-9,3	0,8	-14,1	3,0	-13,3	1,2
155	-9,3	2,5	-9,5	1,0	-14,5	3,2	-12,9	0,8
160	-11,1	3,1	-9,3	1,1	-14,7	2,9	-14,1	1,1
165	-9,9	2,8	-9,1	1,1	-14,5	3,0	-13,1	0,8
170	-10,5	2,8	-8,5	1,1	-15,1	3,3	-13,3	0,5

4.8.3 Auswirkung der Hypoxietestung auf die a-Welle

Im Anschluss an die Versuchsreihen mit Tempol wurde eine Hypoxietestreihe gestartet mit dem Ziel, ein standardisiertes Stressmodell für zukünftige neuroprotektive Therapietestungen zu etablieren. Hierfür wurden zwei verschiedene Varianten der Hypoxietestung untersucht. Die erste Variante sah eine reine Hypoxie durch Unterbinden der Sauerstoffzufuhr für den kompletten Zeitraum des Versuches vor. Die zweite Variante bestand zusätzlich zur Hypoxie durch Sauerstoffabstinenz aus einer Zugabe von purem Stickstoff für den bisher üblichen Testzeitraum von 45 Minuten.

Bei den a-Wellen Versuchen mit Hypoxie ohne Stickstoff konnte über den Lauf der Zeit keine wesentliche Veränderung erkannt werden. Es wurde zur besseren Vergleichbarkeit in Tab. 7 der Zeitpunkt in der 70. Minute und in der 170. Minute dargestellt. Im Mittel zeigte sich nur eine geringfügige Abnahme der Amplituden (-6,9%, $p = 0,62$).

Bei der Hypoxietestung mit Zugabe von reinem Stickstoff zeigte sich kurz nach Testphasenbeginn in der 30. Minute ein Abfall der Amplitude um -11% ($p = 0,24$), der dann im Verlauf noch leicht anstieg. Am Ende des Versuches zeigte sich dann eine Reduktion der Amplituden um -25%. Dieses Ergebnis war mit $p = 0,45$ nicht statistisch signifikant. Insgesamt ließ sich aber eine Reduktion nach 45minütiger Stickstoffhinzugabe erkennen, die sich ohne Sauerstoff nicht mehr komplett erholte. Während unter reiner Abwesenheit von Sauerstoff nur eine nicht beachtenswerte Reduktion stattfand über die Zeit von 170 Minuten.

In Januschowski et al. wurde mit 36,5% nach 130 Minuten eine deutlichere Reduktion der a-Welle durch Stickstoff festgestellt. Bereits nach Beendigung der Stickstoffzuführung sank die mittlere Amplitude um 87% (Januschowski, Müller et al. 2015). Allerdings ist hier ein anderes Versuchsprotokoll durchgeführt worden. Die Versuchsdauer betrug nur 130 Minuten und bis unmittelbar vor der Stickstoffzugabe wurde die Sacklösung mit Sauerstoff versorgt.

Tabelle 7: Prozentuale Veränderung der gemittelten Amplituden und p-Werte der a-Welle bei den Endpunkten vor dem Auswaschen (70. min) und am Ende des Auswaschens (170. min) gegenüber dem Ausgangswert (25. min).

Quelle: eigene Darstellung

		Mit N ₂	Ohne N ₂
70. min		0%	0%
	p =	1	1
170. min		-25%	-6.9%
	p =	0,45	0,62

Tabelle 8: Mittelwert (mean) und Standardabweichung (SD) der ERG a-Welle Amplitude.
 Quelle: eigene Darstellung

Time min	Mit N ₂		Ohne N ₂	
	mean, μV	SD, μV	mean, μV	SD, μV
0	-10,7	0,3	-10,1	0,2
5	-10,3	0,3	-9,7	0,3
10	-10,0	0,6	-10,4	0,1
15	-9,7	0,3	-10,1	0,2
20	-10,3	0,3	-10,1	0,4
25	-9,0	0,5	-9,7	0,2
30	-8,0	0,5	-10,1	0,9
35	-8,0	0,5	-9,7	0,8
40	-9,0	1,5	-9,4	0,5
45	-9,3	1,3	-9,7	0,2
50	-8,7	1,1	-10,1	0,6
55	-8,7	0,6	-10,4	0,4
60	-8,0	0,5	-10,1	0,4
65	-9,0	0,9	-10,1	0,4
70	-9,0	1,1	-9,7	0,2
75	-9,3	0,6	-10,1	0,6
80	-9,7	1,3	-9,7	0,2
85	-8,7	1,3	-10,1	0,6
90	-8,7	0,3	-9,7	0,2
95	-9,0	1,0	-10,1	0,9
100	-9,0	1,1	-9,4	0,5
105	-8,0	1,1	-9,1	0,6
110	-9,3	1,4	-9,1	0,6
115	-8,3	0,3	-8,7	0,8
120	-8,0	0,6	-8,7	0,8
125	-7,7	0,7	-8,7	0,7
130	-8,3	0,4	-9,4	0,5
135	-7,7	0,4	-9,4	0,5
140	-8,0	0,6	-9,1	0,9
145	-8,3	0,8	-9,1	0,6
150	-7,7	0,4	-9,4	0,5
155	-8,0	0,6	-8,4	0,5
160	-7,3	1,3	-9,4	0,5
165	-7,7	1,0	-8,7	1,2
170	-7,7	1,4	-9,4	0,5

5. Diskussion

5.1 Tempol als neuroprotektive Substanz

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen einen neuroprotektiven Effekt von Tempol bei niedrigen Konzentrationen mit unterschiedlicher Ausprägung auf die verschiedenen Strukturen der Retina. Es war nun möglich, eine funktionelle Darstellung der Wirkung von Tempol auf Photorezeptoren und die nachgeschalteten Bipolar-/Müllerzellen in einem in-vitro Modell abzuleiten. Während b-Wellen bereits ab 1mM einen leichten Rückgang zeigen, bleiben a-Wellen noch bei höheren Konzentrationen von Tempol stabil. Auch frühere Studien an der isolierten und umströmten Vertebratenretina unterstützen diese Beobachtung, dass b-Wellen deutlich sensitiver auf äußere Reize und Exposition von Medikamenten reagieren als die reine Photorezeptorenantwort (Luke, Henry et al. 2005, Luke, Weiergraber et al. 2005, Januschowski, Zhou et al. 2012). Erstaunlich ist jedoch die Tatsache, dass Photorezeptoren nach Exposition von Konzentrationen ab 5mM mit einem dauerhaften Anstieg der Amplitude reagieren. Eine Hypothese wäre eine unterschiedliche Bindungsaffinität von Tempol an verschiedenen Strukturen in der Retina, die in zukünftigen Studien verfolgt werden kann.

Andere in-vivo Studien zeigten in verschiedenen Modellen mit neuronaler Schädigung einen protektiven Effekt von Tempol durch eine intravenöse oder intraperitoneale Anwendung (Beit-Yannai, Zhang et al. 1996, Rak, Chao et al. 2000, Tanito, Li et al. 2007, Deng-Bryant, Singh et al. 2008). Bisherige Untersuchungen im Bereich der Ophthalmologie mit Tempol konzentrierten sich mehr auf den Effekt bei Ganglienzellen, welcher nach Exposition in histologischen Untersuchungen am besten festgestellt werden konnte. So konnte in der Gruppe um Thaler et al. auch hier bei einer Dosis von 5mg/kg KG ein neuroprotektiver Effekt von Tempol bei in-vivo Modellen an Ratten mit zuvor erzeugter Optikusschädigung erkannt werden (Thaler, Fiedorowicz et al. 2010, Thaler, Fiedorowicz et al. 2011).

Tempol zeigte neuroprotektive Effekte bei durch Indocyaningrün (ICG) verursachter Toxizität an der Netzhaut im in-vivo Modell bei Ratten (Thaler, Voykov et al. 2012). ICG wurde zeitweise in der Makulachirurgie verwendet. Auch konnte ein protektiver Effekt von Tempol bei Albinoratten erkannt werden, bei welchen ein durch Licht erzeugter Schaden an den Photorezeptoren festgestellt wurde (Wang, Lam et al. 1995). Diese Form der retinalen Schädigung konnte auch bei intraoperativ verwendeten Lichtquellen festgestellt werden (van den Biesen, Berenschot et al. 2000). Oben genannte Punkte bestärken somit den Einsatz von Tempol für den täglichen Gebrauch in Form einer niedrig dosierten, protektiven Spüllösung.

Wesentliche systemische Nebenwirkungen bei intravenöser Gabe an Schweinen wie Blutdruckabfall begleitet von einer Reflertachykardie und ansteigender Hauttemperatur konnten bei Dosen von 25mg/kg KG Tempol festgestellt werden (Hahn, Sullivan et al. 1999). Hierbei zeigte sich ein vasodilatierender Effekt von Tempol, der in späteren klinischen Studien bei kardiovaskulären Erkrankungen zum Einsatz kam (The Effect of Local Antioxidant Therapy on Racial Differences in Vasoconstriction, <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03680404>; The Effect of Antioxidants on Skin Blood Flow During Local Heating, <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03680638>).

Weitere klinische Studien von Tempol außerhalb der Ophthalmologie fanden bisher bei diversen Folgen einer Strahlentherapie, wie beispielsweise Alopezie oder Dermatitis, statt (siehe auch Kap. 1.3 (Metz, Smith et al. 2004)).

Im Gegensatz zu den klinischen Studien wurde in den Versuchen dieser Arbeit das Medikament nur über einen begrenzten Zeitraum angewendet, weshalb die Auskunft über eine Wirkung von Tempol über einen längeren Zeitraum nur beschränkt möglich ist. Eine Akkumulation der Substanz wird nicht getestet. Die Anwendung in unserem Versuch entspricht am ehesten der klinischen Anwendung in Form einer intraoperativ angewendeten Spüllösung, bei der zuvor durch eine ppV der Glaskörper entfernt wurde und die Substanz am Ende der OP wieder herausgespült wurde. Auch die Expositionszeit von 45 Minuten

kann mit dem Einsatz während einer Operation verglichen werden. Tempol wurde hierfür in der Sickellösung zur besseren Anwendung als Trägersubstanz aufgelöst. Eine Wechselwirkung mit den Substanzen in der Lösung und dem Medikament ist nicht auszuschließen. Da die Sickellösung eine ähnliche Zusammensetzung wie die herkömmlich in Operationen verwendete BSS Plus®¹ Lösung hat, entspricht die Testung realitätsgetreuen Umständen. Bei einer intravitrealen Injektion bei Menschen mit noch vorhandenem Glaskörper ist davon auszugehen, dass die Wirkung durch die Interaktion mit dem Glaskörper verzögert eintritt und gegebenenfalls auch reduziert ist. Somit kann man auch von einer geringeren Schädlichkeit als in unserem Modell ausgehen. Bei einer mehrfachen Injektion kann eventuell, durch das Vorhandensein des Glaskörpers, auch eine Depotwirkung entstehen. Die tatsächliche Wirkdauer lässt sich bei dieser Form der Anwendung also sehr schwer bestimmen. Daher wäre es für zukünftige Versuche interessant herauszufinden, über welchen Zeitraum Tempol wiederholt angewendet werden kann, ohne einen bleibenden, schädlichen Effekt zu zeigen. Eine histologische Untersuchung am Ende eines Versuches, um festzustellen wieviel Tempol sich noch an den Zellen der Retina befindet, ist hierbei sicherlich hilfreich. Bei dieser Arbeit wurden nur Ringeraugen ohne ersichtliche Augenerkrankung verwendet, die nach einer Einlaufzeit stabile Ableitungen zeigten. Durch die E nukleation und Präparation ist jedoch von einem gewissen mechanischen Schaden an den neuronalen Zellen auszugehen. Zukünftige Testungen von Tempol sollten jedoch auch an erkrankten Augen erfolgen, um einen protektiven Effekt auch in fortgeschrittenen Stadien einer Pathologie sicher festhalten zu können (Abb.1).

Noch ist unklar, in welcher Form Tempol eines Tages im klinischen Alltag zum Einsatz kommen wird. Diese Entscheidung hängt sicherlich vom Krankheitsbild ab, bei welchem Tempol letztendlich Gebrauch findet. Eine offene Frage bleibt

¹ BSS Plus®: NaCl 7,14mg, KCl 0,38mg, CaCl₂•2H₂O 0,154mg, MgCl₂•6H₂O 0,2mg, Na₂HPO₄ 0,42mg, NaHCO₃ 2,1mg, Dextrose 0,92mg, Glutathion-Disulfid 0,184mg in 1ml mit pH 7,4

Quelle: <https://www.myalcon.com/professional/cataract-surgery/cataract-disposables/bss-plus-irrigating-solution/label-information>, "BSS Plus® Irrigation Solution Product Information 500mL" Alcon Laboratories Inc. - Zugegriffen am 05.07.2019

zunächst auch, wie lange die Halbwertszeit ist und ob durch Ablagerung der Substanz an der Retina nach intravitrealer Anwendung oder bei systemischer Gabe eine Akkumulation der Dosis entstehen kann. Auch wäre interessant zu wissen, ob nach intravitrealer Injektion eine inhomogene Verteilung von Tempol im Glaskörperraum vorhanden ist und hierdurch eine örtliche Differenz der Wirkung an der Retina entstehen kann. Ein weiterer Punkt ist, dass man nicht sicher sagen kann, welchen Effekt der Lichtreiz, welcher in dieser Methode bei jeder Messung ausgelöst wird, auf die Testsubstanz hat oder ob sogar eine gewisse Absorption des Lichts durch die Substanz stattfindet. Diese Effekte würden dann auch die Ergebnisauswertungen bei diesem Versuch beeinflussen.

5.2 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Wirkung von Tempol auf das ERG

Die b-Welle ist ein wesentlich sensiblerer Parameter bei der Testung von schädlichen Grenzkonzentrationen, da sie die Integrität der Retina widerspiegelt und sich nur ableiten lässt, wenn die Weiterschaltung der Photorezeptoren über die Bipolarzellen und Müllerzellen funktioniert. Die Kommunikation zwischen den Zellen scheint bei einer Reduktion der b-Welle somit gestört. Die a-Welle wiederum ist wesentlich unempfindlicher gegenüber Stressfaktoren und spiegelt die Funktion der Photorezeptoren wieder (Luke, Weiergraber et al. 2005). Ähnliche Reaktionen der b- und a-Wellen auf verschiedene Substanzen konnten in vorausgehenden Studien mit derselben Methode gezeigt werden (Luke, Henry et al. 2005, Januschowski, Zhou et al. 2012).

Während bei dieser Arbeit die b-Welle bereits bei Tempolkonzentrationen von $>1\text{mM}$ einen deutlichen Rückgang zeigte, bleibt die a-Welle größtenteils stabil. Die b-Wellen zeigten bei einer Konzentration von $0,5\text{mM}$ Tempol einen Zugewinn der Amplitude und lassen in dieser Konzentration einen neuroprotektiven Effekt von Tempol annehmen. Es ist von einer irreversiblen Schädigung auf die b-Wellen bei Konzentrationen $>0,5\text{-}1\text{mM}$ auszugehen. Ein

klarer Wirkunterschied wurde zwischen den Konzentrationen von 1mM und 2mM erkannt, wobei bereits bei 1mM am Ende ein irreversibler Rückgang der b-Welle erkennbar war. a-Wellen zeigten jedoch nach Tempolexposition von höheren Konzentrationen ab 5mM in der Auswaschphase einen deutlichen Anstieg der Amplituden. Somit kann man bei den a-Wellen ab einer Konzentration von >5mM auf einen sichtbaren neuroprotektiven Effekt auf die Photorezeptoren spekulieren. Da der Unterschied der Wirkung zwischen 2mM und 5mM liegt, ist davon auszugehen, dass eine protektive Wirkung bereits in einem Konzentrationsbereich dazwischen entsteht. Interessant ist, dass der Amplitudenanstieg erst verzögert nach der Tempolexposition in der Auswaschphase festgehalten wurde. Jedoch sollte die Integrität der verschiedenen Netzhautzellen beachtet werden und daher eine Konzentration höher als 1mM kritisch betrachtet werden. In klinischen Studien kann man sich gegebenenfalls langsam an eine höhere Konzentration annähern, da die tatsächlich wirkende Menge von Tempol in-vivo durch einige Faktoren beeinflusst wird. Es ist somit von einer etwas höheren Grenzkonzentration für eine Schädigung beim Menschen auszugehen.

5.3 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Hypoxietestung auf das ERG

Die Hypoxieversuche wurden begonnen, um zukünftig neuroprotektive Substanzen auf ihre Wirkung an ‚erkrankten‘ Augen zu testen. Es wurde hierfür der bereits vorhandene Versuchsaufbau verwendet. In einer Versuchsreihe mit $n = 3$ wurde von der Entnahme der Rinderaugen beim Schlachthof an auf die Sauerstoffhinzugabe, die sonst bereits in der Sickerlösung bis zum Ende der Versuche vorhanden war, verzichtet. In einer weiteren Versuchsreihe ($n = 3$) wurde zusätzlich zur Hypoxie (Abwesenheit von Sauerstoff) für 45 Minuten Stickstoff in die Nährlösung zugegeben.

Während sich in der Versuchsreihe - unter Abwesenheit von Sauerstoff – am Ende nur eine geringfügige Reduktion der Amplitude im ERG, ohne wesentliche Veränderungen über den zeitlichen Verlauf, erkennen ließ, konnte bei

Hinzugabe von Stickstoff eine besser erkennbare Reduktion festgehalten werden.

Diese Versuchsreihen konnten allerdings keinen signifikanten Einbruch der Funktionalität der Retina erkennen lassen und dienten somit nicht als Hypoxie-Modell für weitere Testungen.

Weiterführende Untersuchungen mit optimierter Ausarbeitung auf Grundlage der oben beschriebenen Versuche wurden in der Arbeit von Januschowski et al. (Januschowski, Müller et al. 2015) veröffentlicht. Hier wurde vor und nach der Hypoxie mit Stickstoff wieder Sauerstoff hinzugegeben. Dies spiegelt durch ein Ischämie-/Reperfusionsmodell die tatsächlichen Abläufe einer Erkrankung am Auge mit temporärer Ischämie wider.

Interessant wäre in dieser Versuchsreihe auch herauszufinden, welche morphologische Veränderungen an der Retina entstehen. Hierfür wären zusätzliche histologische Untersuchungen nach Hypoxie und am Ende der Versuchsreihe sinnvoll, um eine potentielle Regression der Schädigung erkennen zu können. Ischämie-/Reperfusionsversuche an Ratten zeigten bereits, dass die innere Netzhaut deutlich sensibler auf Ischämie reagiert als die äußeren Netzhautschichten (Schmid, Renner et al. 2014).

5.4 Vor- und Nachteile eines in-vitro Modells anhand der isolierten und perfundierten Vertebratenretina

Ein klarer Vorteil der Versuchsmethode ergibt sich durch die Einsparung eines Tiermodells. Bei unseren Versuchen wurde nur die Retina von Tieren, die beim lokalen Schlachter bereits getötet wurden, verwendet. Hierdurch entstand kein zusätzlicher Schaden an weiteren Tieren. Hinzu kommt, dass bei einem in-vivo Modell Störfaktoren entstehen können, die beispielsweise durch eine Narkose, falsche Lage der ableitenden Elektroden oder durch die Pharmakokinetik des zu testenden Medikamentes verursacht werden können. Weiterhin ist das Auge in einem in-vivo Modell durch die Blut-Retina-Schranke vom Kreislauf der anderen Organe isoliert, was eine unzureichende Wirkung bei Anwendung von intravenösen oder auch oralen Medikamenten bedeuten könnte.

Aber gerade diese Vorteile an einem standardisierten Modell kann man auch kritisch sehen, denn in der späteren realen Anwendung werden unvermeidbare Faktoren von außen einwirken (Richter, Garner et al. 2009). Da es in diesen Versuchen jedoch um die toxische Wirkung der Testsubstanz an der Retina ging, ist dieser Aufbau sehr gut geeignet. Vorteilhaft gegenüber einem in-vivo Modell ist, dass man die Möglichkeit hat, einzelne Bedingungen wie Temperatur oder Fließgeschwindigkeit kontrollieren zu können. Auch ist der direkte Kontakt zwischen Substanz und Retina gewährleistet. Es gibt uns die Option mehrere Messungen über einen bestimmten Zeitrahmen hintereinander zu testen, die Reaktion auf die Testsubstanz in Echtzeit festzuhalten und nach Auswaschen eine Reversibilität oder Irreversibilität anhand der Funktionalität ablesen zu können. All diese Varianten bietet ein in-vivo Modell nicht oder nur unter erschwerten Bedingungen, indem man Tiere in Narkose legen muss. Das Modell der isolierten und perfundierten Netzhaut hat sich somit als geeignetes Werkzeug für Medikamentenprüfungen mit Wirkort direkt an der Retina ergeben (Luke, Weiergraber et al. 2005). Ein Vorteil dieser Methode gegenüber histologischen Gewebeuntersuchungen besteht in der Darstellung der funktionellen Integrität des Gewebes. Anhand der Ableitungen der verschiedenen Wellen lässt sich eine Aussage über den Ort der Wirkung des Medikamentes und den Funktionsverlust treffen. Leider ist es anhand des ERGs nicht möglich, den Effekt auf die retinalen Ganglienzellen zu untersuchen, welcher bei vielen histologischen Untersuchungen mit Tempol oft beschrieben wurde (Thaler, Fiedorowicz et al. 2010, Thaler, Fiedorowicz et al. 2011).

Dieses Modell ist grundsätzlich auch gut für die Anwendung an menschlichen Netzhäuten geeignet, die im Rahmen einer medizinisch indizierten Enukleation entnommen wurden. Da in der Klinik nur selten eine Enukleation erfolgt und das Auge meist nicht für wissenschaftliche Zwecke freigegeben wird, beschränkt sich diese Arbeit auf das Tiermodell.

Ein Nachteil der Versuchsdurchführung ist die Hypoxie, die durch die Zeit für den Transport der Netzhäute in das Labor entsteht. In Studien wurde für

Rindernetzhäute nach Entnahme anhand der ERG Messungen eine maximale Vitalität für zehn Stunden festgehalten (Luke, Weiergraber et al. 2005). Allerdings ist nicht bekannt wie vergleichbar diese Daten in Bezug auf menschliche Netzhäute wären. Aufgrund der Annahme, dass die ERG Messungen über einen Zeitraum von mindestens zehn Stunden stabile Ableitungen liefern würden, war es uns möglich, den Zeitpunkt vor der Substanzexposition mit Tempol (25. Minute) mit dem Zeitpunkt nach der Exposition (70. Minute) zu vergleichen. Auch war es möglich, den Versuch nach 170 Minuten zu beenden und diesen Zeitpunkt für die Vergleiche im Mittel zu verwenden, da hier von einer Eliminierung der Substanz an der Retina auszugehen war. Ein Vorteil in der Anwendung von Tempol als Teil der Spüllösung in diesem Aufbau ist, dass für die Applikation der Durchfluss und die Sauerstoffzufuhr nicht unterbrochen werden musste, wie das bei anderen Stoffen, die direkt auf die Netzhaut mittels Spritze appliziert werden mussten, der Fall war (Mueller 2014). Somit kann die Wirkung auf die Retina auf die Konzentration von Tempol zurückgeführt werden.

Ein weiterer Nachteil ist, dass durch Bezug der Rinderaugen von einem lokalen Schlachthof Faktoren wie das Alter oder die Vitalität des Gewebes nicht beeinflusst werden konnten. Auch konnten Versuche mit Netzhautstanzen eines Auges nur in einem Zeitraum von 48 Stunden nach Entnahme durchgeführt werden, da die Netzhäute außerhalb des Blutkreislaufes bei > 48 Stunden und nach zehn Stunden im Versuchsaufbau keine Ableitungen mehr zeigten (Luke, Weiergraber et al. 2005). Somit konnten keine wiederholten Messungen an derselben Retinastanze erfolgen und die für die Versuche verwendeten Netzhäute befanden sich unterschiedlich lange außerhalb des Blutkreislaufes, bis sie zum Einsatz im Modell kamen. Dies ist ein Faktor, der sich nicht anders optimieren ließ. Daher wurde zu Beginn jedes Versuchsaufbaus überprüft, ob die Netzhaut eine stabile Ableitung erbrachte und für einen Versuch geeignet war.

Ein großer Vorteil besteht in der Ähnlichkeit zwischen der Netzhaut des Rindes und der Netzhaut des Menschen gegenüber Versuchen mit Nagetieren. Es

konnte in vergangenen Versuchen eine gute Korrelation der Effekte auf das ERG an der isolierten Retina zwischen Rind und Mensch gezeigt werden (Januschowski, Maddani et al. 2012, Januschowski, Mueller et al. 2012). Der Aufbau des Glaskörpers und des vorderen Augenabschnittes mit der Linse sowie vaskuläre Strukturen sind beim Rind dem Menschen sehr ähnlich (Perlman 2009). Auch konnte in der Rindernetzhaut wie beim Menschen das Rhodopsin erkannt werden, welches für den Prozess des Sehens initial wichtig ist (Nathans and Hogness 1984). Palczewski et al. konnten weiterhin erkennen, dass sich bei Vertebraten im Bereich der Außensegmente der Photorezeptoren G-Protein gekoppelte Rezeptoren finden ließen (Palczewski 2006, Hofmann and Palczewski 2015). Zudem finden sich dieselben Gene, die in mutierter Form für das Auftreten eines Offenwinkelglaukoms verantwortlich gemacht werden, wie zum Beispiel das MYOC Gen, im Trabekelmaschenwerk und sowohl in der Netzhaut des Rindes als auch des Menschen (Mukhopadhyay, Gupta et al. 2002). Jedoch sind strukturelle Unterschiede, die Effekte auf die Wirkung einer Substanz haben können, nicht ausgeschlossen.

Insgesamt kann gesagt werden, dass dieses in-vitro Modell der isolierten und perfundierten Retina eine in-vivo Testung nicht ersetzt, aber der Grundstein für eine weitere Testung liefert und ein gut etabliertes Modell zur Testung von kurzzeitig angewandten Substanzen darstellt. Es können Experimente durchgeführt werden, welche unter kontrollierten Bedingungen ablaufen, leicht wiederholt werden können und ethisch unbedenklich sind. Ein standardisierter Einsatz dieses Modells könnte zukünftig in der Medikamententestung zu einer besseren Vergleichbarkeit und zu einem einfacheren Einsatz für die spätere klinische Testung führen.

5.5 Weitere bovine Versuchsmodelle in der Ophthalmologie

Die Wissenschaft versucht seit einigen Jahrzehnten immer mehr in-vivo Testungen an Tieren durch den Einsatz von ex-vivo Modellen einzusparen. Ein Überblick der bisher etablierten Methoden bietet die Arbeit von Wilson et al. (Wilson, Ahearne et al. 2015).

Eine in-vitro Methode mit Rinderhornhäuten, die beim Schlachthof bezogen werden können, ist der ‚Bovine corneal opacity and permeability test‘ (BCOP) (Gautheron, Dukic et al. 1992), der auf Arbeiten von Muir et al. zurückgeht (Muir 1984, Muir 1985, Muir 1987). Hierbei ist die Hornhaut eines Rindes in einer lichtdurchlässigen Kammer befestigt, sodass von endothelial und epithelial Zugang zur Hornhaut besteht. Dieser Test wird im Allgemeinen von der Organisation for Economic Co-operation and Development (OCED) für die Erfassung von Reizeigenschaften verschiedener Chemikalien benutzt und findet Einsatz in der Kosmetikindustrie. Überarbeitet wird der Test mittlerweile als Alternative für den weltweit bevorzugten Draize-Test am in-vivo Modell des Hasen verwendet (Verstraelen, Jacobs et al. 2013). Zu erkennen ist jedoch, dass in den jeweiligen ex-vivo Modellen immer nur ein gewisser Abschnitt des Auges getestet werden kann und nicht das Auge als Ganzes mit Darstellung des vorderen und hinteren Augenabschnittes.

Ein weiteres in-vitro Modell stellen toxikologische Versuche an in Kultur genommenen Linsen von Rindern dar (Ho, Di Carlo et al. 2008). Viele Toxizitätsversuche sehen nach wie vor eine Inkulturnahme und histologische Untersuchung der zu testenden Gewebe vor (Wilson, Ahearne et al. 2015).

Das Modell in dieser Arbeit ist daher durch Überwachung der Funktionalität des Gewebes außerhalb eines bestehenden Organismus eine Besonderheit.

5.6 Tempol in der klinischen Anwendung – ein Ausblick

Bei Operationen mit ppV, wie dies beispielsweise bei einer proliferativen diabetischen Retinopathie mit Traktionsablatio oder persistierender Glaskörperblutung der Fall sein kann, kann Tempol als neuroprotektive Spüllösung eingesetzt werden. Eine andere Form der möglichen Anwendung von Tempol wäre die intravitreale Injektion bei Gefäßverschlüssen. Hier ist durch die Ischämie ein sekundärer Zelluntergang in der Retina zu erwarten, den es zu vermeiden gilt. Auch könnte Tempol zukünftig als intravitreale Therapieform durch Injektion bei einer trockenen AMD zum Einsatz kommen und somit eine weitere Progression möglicherweise aufhalten. Da bisher keine

Therapie für die trockene Form der AMD zur Verfügung steht, ist dies ein wichtiger Angriffspunkt für zukünftige Testungen der Substanz Tempol. Eine systemische Anwendung ist prinzipiell auch denkbar, jedoch vermutlich mit einem höheren Nebenwirkungsprofil verbunden. Tempol ist durch seine antioxidative Wirkung ein gut geeignetes Medikament, welches beispielsweise beim Glaukom zum Einsatz kommen könnte. Aufgrund der guten Membranpermeabilität kann es auch in Form von Augentropfen zukünftig angewendet werden.

6. Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen des ZNS und Erkrankungen der Netzhaut haben vieles gemeinsam. So zeigt sich beim Glaukom ein ähnlicher pathophysiologischer Mechanismus wie bei einem Apoplex. Ursächlich für solche Erkrankungen ist ein sekundärer Verlust von Nervenfasergewebe durch Apoptose. Hierbei spielt oxidativer Stress, der zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen und Nitroxiden führt, eine wichtige Rolle.

Als Radikalfänger reaktiver Sauerstoffmoleküle dient Tempol, welches ein Mimetikum für eine Superoxid-Dismutase darstellt. Tempol ist leicht gewebebegängig und somit vielversprechend für den Einsatz als neuroprotektive Substanz. Die Testung von Tempol an in-vivo und in-vitro Modellen des Nagetieres zeigte in bisherigen Versuchen vielversprechende Ergebnisse. Kürzliche Untersuchungen weisen auf eine bessere Vergleichbarkeit der bovinen und humanen Retina hin. Daher sah diese Arbeit den Einsatz von Rindernetzhäuten vor.

Ziel der Arbeit war, durch elektrophysiologische Darstellung eine Konzentration von Tempol zu bestimmen, welche nicht schädlich auf die Netzhaut wirkt, so dass sich eine entsprechende Anwendung in der Klinik findet. Auch wurden Versuche für ein zukünftiges Hypoxiemodell als Vergleichsbasis begonnen. Das Modell der isolierten und perfundierten Retina ist in der Testung verschiedener Substanzen bereits etabliert. In diesem Rahmen wurde ein dunkeladaptiertes ERG vor und nach einer 45minütigen Exposition verschiedener Tempol-Konzentrationen (0,5mM; 1mM; 2mM; 5mM; 10mM) abgeleitet. Hierbei ließ sich ein schädlicher Effekt ab 1mM auf die Retina durch Amplitudeneinbruch der b-Wellen feststellen. An den a-Wellen war in allen Konzentrationen keine bleibende Schädigung durch Tempol zu erkennen. Höhere Konzentrationen ab 5mM ließen sogar einen neuroprotektiven Effekt auf die Photorezeptoren möglich erscheinen. Zusammenfassend ist von einer Unbedenklichkeit bis zu einer Konzentration von 0,5mM auszugehen. Es konnte gezeigt werden, dass

eine Anwendung von Tempol von potentiellern Nutzen ist für weitere klinische Versuche, um einem irreversiblen sekundären Nervenfaserverlust bei ischämischen Erkrankungen der Netzhaut zeitnah vorzubeugen bis herkömmliche Therapien greifen.

7. Literaturverzeichnis

- (2001). "A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8." Arch Ophthalmol **119**(10): 1417-1436.
- Agarwal, A., R. Afridi, M. Hassan, M. A. Sadiq, Y. J. Sepah, D. V. Do and Q. D. Nguyen (2015). "Novel Therapies in Development for Diabetic Macular Edema." Curr Diab Rep **15**(10): 75.
- Alberts, B. a. J., A. and Lewis, J. and Morgan, D. and Raff, M. and Roberts, K. and Walter, P. (2014). Molecular Biology of the Cell, Norton & Company.
- Ambati, J., K. V. Chalam, D. K. Chawla, C. T. D'Angio, E. G. Guillet, S. J. Rose, R. E. Vanderlinde and B. K. Ambati (1997). "Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy." Arch Ophthalmol **115**(9): 1161-1166.
- Anderson, D. R. (1989). "Glaucoma: the damage caused by pressure. XLVI Edward Jackson memorial lecture." Am J Ophthalmol **108**(5): 485-495.
- Becatti, M., R. Marcucci, A. M. Gori, L. Mannini, E. Grifoni, A. Alessandrello Liotta, A. Sodi, R. Tartaro, N. Taddei, S. Rizzo, D. Prisco, R. Abbate and C. Fiorillo (2016). "Erythrocyte oxidative stress is associated with cell deformability in patients with retinal vein occlusion." J Thromb Haemost **14**(11): 2287-2297.
- Beit-Yannai, E., R. Zhang, V. Trembovler, A. Samuni and E. Shohami (1996). "Cerebroprotective effect of stable nitroxide radicals in closed head injury in the rat." Brain Res **717**(1-2): 22-28.
- Bertram, K. M., D. V. Bula, J. S. Pulido, S. A. Shippy, S. Gautam, M. J. Lu, R. M. Hatfield, J. H. Kim, M. T. Quirk and J. G. Arroyo (2008). "Amino-acid levels in subretinal and vitreous fluid of patients with retinal detachment." Eye (Lond) **22**(4): 582-589.
- Bhutto, I. and G. Luty (2012). "Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex." Mol Aspects Med **33**(4): 295-317.
- Campochiaro, P. A. (2015). "Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases." Prog Retin Eye Res **49**: 67-81.
- Casson, R. J., G. Chidlow, J. P. Wood, J. G. Crowston and I. Goldberg (2012). "Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts." Clin Experiment Ophthalmol **40**(4): 341-349.

- Chandra, A., D. Mitry, A. Wright, H. Campbell and D. G. Charteris (2014). "Genome-wide association studies: applications and insights gained in Ophthalmology." Eye (Lond) **28**(9): 1066-1079.
- Cui, Y., X. Xu, H. Bi, Q. Zhu, J. Wu, X. Xia, R. Qiushi and P. C. Ho (2006). "Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy." Exp Eye Res **83**(4): 807-816.
- Datta, S., M. Cano, K. Ebrahimi, L. Wang and J. T. Handa (2017). "The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD." Prog Retin Eye Res **60**: 201-218.
- Davalos, A., J. Castillo, J. Marrugat, J. M. Fernandez-Real, A. Armengou, P. Cacabelos and R. Rama (2000). "Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction." Neurology **54**(8): 1568-1574.
- van den Biesen, P. R., T. Berenschot, R. M. Verdaasdonk, H. van Weelden and D. van Norren (2000). "Endoillumination during vitrectomy and phototoxicity thresholds." Br J Ophthalmol **84**(12): 1372-1375.
- Deng-Bryant, Y., I. N. Singh, K. M. Carrico and E. D. Hall (2008). "Neuroprotective effects of tempol, a catalytic scavenger of peroxynitrite-derived free radicals, in a mouse traumatic brain injury model." J Cereb Blood Flow Metab **28**(6): 1114-1126.
- Diederer, R. M., E. C. La Heij, N. E. Deutz, A. Kijlstra, A. G. Kessels, H. M. van Eijk, A. T. Liem, S. Dieudonne and F. Hendrikse (2006). "Increased glutamate levels in the vitreous of patients with retinal detachment." Exp Eye Res **83**(1): 45-50.
- Dreyer, E. B., D. Zurakowski, R. A. Schumer, S. M. Podos and S. A. Lipton (1996). "Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma." Arch Ophthalmol **114**(3): 299-305.
- Einthoven, W. and W. A. Jolly (1908). "THE FORM AND MAGNITUDE OF THE ELECTRICAL RESPONSE OF THE EYE TO STIMULATION BY LIGHT AT VARIOUS INTENSITIES." Quarterly Journal of Experimental Physiology **1**(4): 373-416.
- Evans, J. L., I. D. Goldfine, B. A. Maddux and G. M. Grodsky (2002). "Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes." Endocr Rev **23**(5): 599-622.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-247.
- Flaxman, S. R., R. R. A. Bourne, S. Resnikoff, P. Ackland, T. Braithwaite, M. V. Cicinelli, A. Das, J. B. Jonas, J. Keeffe, J. H. Kempen, J. Leasher, H.

- Limburg, K. Naidoo, K. Pesudovs, A. Silvester, G. A. Stevens, N. Tahhan, T. Y. Wong and H. R. Taylor (2017). "Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis." Lancet Glob Health **5**(12): e1221-e1234.
- Fraser, S. G. and W. Adams (2009). "Interventions for acute non-arteritic central retinal artery occlusion." Cochrane Database Syst Rev(1): Cd001989.
- Gautheron, P., M. Dukic, D. Alix and J. F. Sina (1992). "Bovine corneal opacity and permeability test: an in vitro assay of ocular irritancy." Fundam Appl Toxicol **18**(3): 442-449.
- Golden, T. R., D. A. Hinerfeld and S. Melov (2002). "Oxidative stress and aging: beyond correlation." Aging Cell **1**(2): 117-123.
- Granit, R. (1933). "The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve." J Physiol **77**(3): 207-239.
- Grassi, M. A., A. Tikhomirov, S. Ramalingam, K. E. Lee, S. M. Hosseini, B. E. Klein, R. Klein, Y. A. Lussier, N. J. Cox and D. L. Nicolae (2012). "Replication analysis for severe diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(4): 2377-2381.
- Grehn, F. (2012). Augenheilkunde, Springer.
- Hahn, S. M., F. J. Sullivan, A. M. DeLuca, J. D. Bacher, J. Liebmann, M. C. Krishna, D. Coffin and J. B. Mitchell (1999). "Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics." Free Radic Biol Med **27**(5-6): 529-535.
- Hanawa, I. and T. Tateishi (1970). "The effect of aspartate on the electroretinogram of the vertebrate retina." Experientia **26**(12): 1311-1312.
- Hayreh, S. S., M. B. Zimmerman, A. Kimura and A. Sanon (2004). "Central retinal artery occlusion. Retinal survival time." Exp Eye Res **78**(3): 723-736.
- He, S., D. L. Stankowska, D. Z. Ellis, R. R. Krishnamoorthy and T. Yorio (2018). "Targets of Neuroprotection in Glaucoma." J Ocul Pharmacol Ther **34**(1-2): 85-106.
- Hekimi, S., J. Lapointe and Y. Wen (2011). "Taking a "good" look at free radicals in the aging process." Trends Cell Biol **21**(10): 569-576.
- Ho, L., S. Di Carlo, K. L. Moran, V. Bantsev and J. G. Sivak (2008). "Effect of age on ocular irritancy as measured with in vitro bovine lenses." Toxicol In Vitro **22**(2): 450-456.

- Hofmann, L. and K. Palczewski (2015). "The G protein-coupled receptor rhodopsin: a historical perspective." Methods Mol Biol **1271**: 3-18.
<http://www.nei.nih.gov/eyedata>. Zugegriffen am 06.10.2019
- Hughes, W. F. (1991). "Quantitation of ischemic damage in the rat retina." Exp Eye Res **53**(5): 573-582.
- Ientile, R., V. Macaione, M. Teletta, S. Pedale, V. Torre and S. Macaione (2001). "Apoptosis and necrosis occurring in excitotoxic cell death in isolated chick embryo retina." J Neurochem **79**(1): 71-78.
- Izzotti, A., A. Bagnis and S. C. Sacca (2006). "The role of oxidative stress in glaucoma." Mutat Res **612**(2): 105-114.
- Jager, R. D., W. F. Mieler and J. W. Miller (2008). "Age-related macular degeneration." N Engl J Med **358**(24): 2606-2617.
- Januschowski, K. (2010). Elektrophysiologische Toxizitätsuntersuchungen intravitrealer Pharmaka am Modell der isolierten und umströmten Vertebratennetzhaut, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Januschowski, K., C. Irigoyen, J. C. Pastor, G. K. Srivastava, M. R. Romano, H. Heimann, P. Stalmans, K. Van Keer, K. Boden, P. Szurman and M. S. Spitzer (2018). "Retinal Toxicity of Medical Devices Used during Vitreoretinal Surgery: A Critical Overview." Ophthalmologica **240**(4): 236-243.
- Januschowski, K., R. Maddani, S. Mueller, M. Lueke, M. S. Spitzer, M. Schultheiss, K. U. Bartz-Schmidt and P. Szurman (2012). "Comparing the effects of two different irrigation solutions on an isolated perfused vertebrate retina." Ophthalmic Res **48**(2): 59-66.
- Januschowski, K., S. Mueller, R. Dollinger, S. Schnichels, J. Hofmann, M. S. Spitzer, K. U. Bartz-Schmidt, P. Szurman and S. Thaler (2014). "Investigating retinal toxicity of tempol in a model of isolated and perfused bovine retina." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **252**(6): 935-941.
- Januschowski, K., S. Mueller, M. S. Spitzer, C. Schramm, D. Doycheva, K. U. Bartz-Schmidt and P. Szurman (2012). "Evaluating retinal toxicity of a new heavy intraocular dye, using a model of perfused and isolated retinal cultures of bovine and human origin." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **250**(7): 1013-1022.
- Januschowski, K., S. Müller, C. Krupp, M. S. Spitzer, J. Hurst, M. Schultheiss, K. U. Bartz-Schmidt, P. Szurman and S. Schnichels (2015). "Glutamate and hypoxia as a stress model for the isolated perfused vertebrate retina." J Vis Exp(97).

- Januschowski, K., A. Zhour, A. Lee, R. Maddani, S. Mueller, M. S. Spitzer, S. Schnichels, M. Schultheiss, D. Doycheva, K. U. Bartz-Schmidt and P. Szurman (2012). "Testing the biocompatibility of a glutathione-containing intra-ocular irrigation solution by using an isolated perfused bovine retina organ culture model - an alternative to animal testing." Altern Lab Anim **40**(1): 23-32.
- Jutley, G., S. M. Luk, M. H. Dehabadi and M. F. Cordeiro (2017). "Management of glaucoma as a neurodegenerative disease." Neurodegener Dis Manag **7**(2): 157-172.
- Kanski, J. and B. Bowling (2012). Klinische Ophthalmologie.
- Ke, Y. and Z. Ming Qian (2003). "Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders." Lancet Neurol **2**(4): 246-253.
- Klaunig, J. E. and L. M. Kamendulis (2004). "The role of oxidative stress in carcinogenesis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 239-267.
- Kwon, Y. H., J. H. Fingert, M. H. Kuehn and W. L. Alward (2009). "Primary open-angle glaucoma." N Engl J Med **360**(11): 1113-1124.
- Liang, F. Q. and B. F. Godley (2003). "Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration." Exp Eye Res **76**(4): 397-403.
- Lipman, T., R. Tabakman and P. Lazarovici (2006). "Neuroprotective effects of the stable nitroxide compound Tempol on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in the Nerve Growth Factor-differentiated model of pheochromocytoma PC12 cells." Eur J Pharmacol **549**(1-3): 50-57.
- Luke, M., M. Henry, T. Lingohr, M. Maghsoodan, J. Hescheler, M. Weiergraber, W. Sickel and T. Schneider (2005). "A Ni(2+)-sensitive component of the ERG b-wave from the isolated bovine retina is related to E-type voltage-gated Ca(2+) channels." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **243**(9): 933-941.
- Luke, M., M. Weiergraber, C. Brand, S. A. Siapich, M. Banat, J. Hescheler, C. Luke and T. Schneider (2005). "The isolated perfused bovine retina--a sensitive tool for pharmacological research on retinal function." Brain Res Brain Res Protoc **16**(1-3): 27-36.
- Mali, R. S., M. Cheng and S. K. Chintala (2005). "Plasminogen activators promote excitotoxicity-induced retinal damage." Faseb j **19**(10): 1280-1289.

- Masuda, T., M. Shimazawa and H. Hara (2017). "Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress and the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone)." Oxid Med Cell Longev **2017**: 9208489.
- McCulloch, D. L., M. F. Marmor, M. G. Brigell, R. Hamilton, G. E. Holder, R. Tzekov and M. Bach (2015). "ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update)." Doc Ophthalmol **130**(1): 1-12.
- Mehta, S. H., R. C. Webb, A. Ergul, A. Tawfik and A. M. Dorrance (2004). "Neuroprotection by tempol in a model of iron-induced oxidative stress in acute ischemic stroke." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(2): R283-288.
- Metz, J. M., D. Smith, R. Mick, R. Lustig, J. Mitchell, M. Cherakuri, E. Glatstein and S. M. Hahn (2004). "A phase I study of topical Tempol for the prevention of alopecia induced by whole brain radiotherapy." Clin Cancer Res **10**(19): 6411-6417.
- Millan, M., T. Sobrino, M. Castellanos, F. Nombela, J. F. Arenillas, E. Riva, I. Cristobo, M. M. Garcia, J. Vivancos, J. Serena, M. A. Moro, J. Castillo and A. Davalos (2007). "Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke." Stroke **38**(1): 90-95.
- Mitchell, J. B., A. Samuni, M. C. Krishna, W. G. DeGraff, M. S. Ahn, U. Samuni and A. Russo (1990). "Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics." Biochemistry **29**(11): 2802-2807.
- Mueller, S. (2014). Elektrophysiologische Toxizitätsuntersuchungen von schweren Farbstoffen für die vitreoretinale Chirurgie am Modell der isolierten und umströmten Vertebratennetzhaut.
- Muir, C. K. (1984). "A simple method to assess surfactant-induced bovine corneal opacity in vitro: Preliminary findings." Toxicology Letters **22**(2): 199 - 203.
- Muir, C. K. (1985). "Opacity of bovine cornea in vitro induced by surfactants and industrial chemicals compared with ocular irritancy in vivo." Toxicology Letters **24**(2): 157 - 162.
- Muir, C. K. (1987). "Surfactant-induced opacity of bovine isolated cornea: An epithelial phenomenon?" Toxicology Letters **38**(1): 51 - 54.
- Mukhopadhyay, A., A. Gupta, S. Mukherjee, K. Chaudhuri and K. Ray (2002). "Did myocilin evolve from two different primordial proteins?" Mol Vis **8**: 271-279.
- Mullarkey, C. J., D. Edelstein and M. Brownlee (1990). "Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes." Biochem Biophys Res Commun **173**(3): 932-939.

- Nathans, J. and D. S. Hogness (1984). "Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(15): 4851-4855.
- Nizari, S., L. Guo, B. M. Davis, E. M. Normando, J. Galvao, L. A. Turner, M. Bizrah, M. Dehabadi, K. Tian and M. F. Cordeiro (2016). "Non-amyloidogenic effects of alpha2 adrenergic agonists: implications for brimonidine-mediated neuroprotection." Cell Death Dis **7**(12): e2514.
- Ohrloff, C., O. Hockwin, R. Olson and S. Dickman (1984). "Glutathione peroxidase, glutathione reductase and superoxide dismutase in the aging lens." Curr Eye Res **3**(1): 109-115.
- Palczewski, K. (2006). "G protein-coupled receptor rhodopsin." Annu Rev Biochem **75**: 743-767.
- Pardue, M. T. and R. S. Allen (2018). "Neuroprotective strategies for retinal disease." Prog Retin Eye Res **65**: 50-76.
- Penn, R. D. and W. A. Hagins (1969). "Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave." Nature **223**(5202): 201-204.
- Pepperberg, D. R., P. K. Brown, M. Lurie and J. E. Dowling (1978). "Visual pigment and photoreceptor sensitivity in the isolated skate retina." J Gen Physiol **71**(4): 369-396.
- Perlman, I. (1995). The Electroretinogram: ERG. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. H. Kolb, E. Fernandez and R. Nelson. Salt Lake City (UT).
- Perlman, I. (2009). "Testing retinal toxicity of drugs in animal models using electrophysiological and morphological techniques." Doc Ophthalmol **118**(1): 3-28.
- Peters, O., T. Back, U. Lindauer, C. Busch, D. Megow, J. Dreier and U. Dirnagl (1998). "Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat." J Cereb Blood Flow Metab **18**(2): 196-205.
- Rahman, I. and W. MacNee (1996). "Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases." Free Radic Biol Med **21**(5): 669-681.
- Rak, R., D. L. Chao, R. M. Pluta, J. B. Mitchell, E. H. Oldfield and J. C. Watson (2000). "Neuroprotection by the stable nitroxide Tempol during reperfusion in a rat model of transient focal ischemia." J Neurosurg **92**(4): 646-651.

- Reddan, J. R., F. J. Giblin, R. Kadry, V. R. Leverenz, J. T. Pena and D. C. Dziedzic (1999). "Protection from oxidative insult in glutathione depleted lens epithelial cells." Exp Eye Res **68**(1): 117-127.
- Reddan, J. R., M. D. Sevilla, F. J. Giblin, V. Padgaonkar, D. C. Dziedzic, V. Leverenz, I. C. Misra and J. L. Peters (1993). "The superoxide dismutase mimic TEMPOL protects cultured rabbit lens epithelial cells from hydrogen peroxide insult." Exp Eye Res **56**(5): 543-554.
- Resch, M., I. Suveges and J. Nemeth (2013). "[Hypertension-related eye disorders]." Orv Hetil **154**(45): 1773-1780.
- Richter, S. H., J. P. Garner and H. Wurbel (2009). "Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments?" Nat Methods **6**(4): 257-261.
- Riederer, P., E. Sofic, W. D. Rausch, B. Schmidt, G. P. Reynolds, K. Jellinger and M. B. Youdim (1989). "Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains." J Neurochem **52**(2): 515-520.
- Saint-Geniez, M., T. Kurihara, E. Sekiyama, A. E. Maldonado and P. A. D'Amore (2009). "An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(44): 18751-18756.
- Sasaki, H., L. R. Lin, T. Yokoyama, M. D. Sevilla, V. N. Reddy and F. J. Giblin (1998). "TEMPOL protects against lens DNA strand breaks and cataract in the x-rayed rabbit." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**(3): 544-552.
- Schmid, H., M. Renner, H. B. Dick and S. C. Joachim (2014). "Loss of inner retinal neurons after retinal ischemia in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(4): 2777-2787.
- Schultheiss, M., K. Januschowski, H. Ruschenburg, C. Schramm, S. Schnichels, P. Szurman, K. U. Bartz-Schmidt and M. S. Spitzer (2013). "Dulbecco's Modified Eagle Medium is neuroprotective when compared to standard vitrectomy irrigation solution." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **251**(6): 1613-1619.
- Sedelnikova, O. A., C. E. Redon, J. S. Dickey, A. J. Nakamura, A. G. Georgakilas and W. M. Bonner (2010). "Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis." Mutat Res **704**(1-3): 152-159.
- Sickel, W. (1965). "RESPIRATORY AND ELECTRICAL RESPONSES TO LIGHT SIMULATION IN THE RETINA OF THE FROG." Science **148**(3670): 648-651.
- Sickel, W. (1966). The isolated retina maintained in a circulating medium. Combined optical and electrical investigation of metabolic aspects of the generation of the electroretinogram. Clinical Electroretinography:

Proceedings of the Third International Symposium. Oxford, UK, Pergamon Press: 115-124.

- Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." Exp Physiol **82**(2): 291-295.
- Silbernagl, S. and A. Despopoulos (2007). Taschenatlas Physiologie. Stuttgart, Thieme.
- Simoncini, S., C. Sapet, L. Camoin-Jau, N. Bardin, J. R. Harle, J. Sampol, F. Dignat-George and F. Anfosso (2005). "Role of reactive oxygen species and p38 MAPK in the induction of the pro-adhesive endothelial state mediated by IgG from patients with anti-phospholipid syndrome." Int Immunol **17**(4): 489-500.
- Singh, I. N., P. G. Sullivan and E. D. Hall (2007). "Peroxynitrite-mediated oxidative damage to brain mitochondria: Protective effects of peroxynitrite scavengers." J Neurosci Res **85**(10): 2216-2223.
- Smith, C. J. and C. Hansch (2000). "The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate." Food Chem Toxicol **38**(7): 637-646.
- Smith, W., J. Assink, R. Klein, P. Mitchell, C. C. Klaver, B. E. Klein, A. Hofman, S. Jensen, J. J. Wang and P. T. de Jong (2001). "Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents." Ophthalmology **108**(4): 697-704.
- Sparrow, J. R. and M. Boulton (2005). "RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology." Exp Eye Res **80**(5): 595-606.
- Stadtman, E. R. (2006). "Protein oxidation and aging." Free Radic Res **40**(12): 1250-1258.
- Tang, J. and T. S. Kern (2011). "Inflammation in diabetic retinopathy." Prog Retin Eye Res **30**(5): 343-358.
- Tanito, M., F. Li, M. H. Elliott, M. Dittmar and R. E. Anderson (2007). "Protective effect of TEMPOL derivatives against light-induced retinal damage in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(4): 1900-1905.
- Tempol, P. "Merck Millipore Tempol Produktinformation." Zugegriffen am 30.12.2018 http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/TEMPOL-CAS-2226-96-2Calbiochem,EMD_BIO-581500.
- Tezel, G. and X. Yang (2004). "Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(11): 4049-4059.

- Thaler, S., M. Fiedorowicz, P. Grieb, Z. Wypych, N. Knap, T. Borowik, K. Zawada, J. Kaminski, M. Wozniak, R. Rejdak, E. Zrenner and F. Schuettauf (2011). "Neuroprotective effects of tempol acyl esters against retinal ganglion cell death in a rat partial optic nerve crush model." Acta Ophthalmol **89**(7): e555-560.
- Thaler, S., M. Fiedorowicz, R. Rejdak, T. J. Choragiewicz, D. Sulejczak, P. Stopa, T. Zarnowski, E. Zrenner, P. Grieb and F. Schuettauf (2010). "Neuroprotective effects of tempol on retinal ganglion cells in a partial optic nerve crush rat model with and without iron load." Exp Eye Res **90**(2): 254-260.
- Thaler, S., B. Voykov, G. Willmann, M. Fiedorowicz, R. Rejdak, F. Gekeler, C. A. May, A. Schatz and F. Schuettauf (2012). "Tempol protects against intravitreal indocyanine green-induced retinal damage in rats." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **250**(11): 1597-1606.
- Tobalem, S., J. S. Schutz and A. Chronopoulos (2018). "Central retinal artery occlusion - rethinking retinal survival time." BMC Ophthalmol **18**(1): 101.
- Ung, L., U. Pattamatta, N. Carnt, J. L. Wilkinson-Berka, G. Liew and A. J. R. White (2017). "Oxidative stress and reactive oxygen species: a review of their role in ocular disease." Clin Sci (Lond) **131**(24): 2865-2883.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Varma, D. D., S. Cugati, A. W. Lee and C. S. Chen (2013). "A review of central retinal artery occlusion: clinical presentation and management." Eye (Lond) **27**(6): 688-697.
- Verstraelen, S., A. Jacobs, B. De Wever and P. Vanparys (2013). "Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test." Toxicol In Vitro **27**(4): 1298-1311.
- Vorwerk, C. K., R. Naskar, F. Schuettauf, K. Quinto, D. Zurakowski, G. Gochenauer, M. B. Robinson, S. A. Mackler and E. B. Dreyer (2000). "Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(11): 3615-3621.
- Wang, M., T. T. Lam, J. Fu and M. O. Tso (1995). "TEMPOL, a superoxide dismutase mimic, ameliorates light-induced retinal degeneration." Res Commun Mol Pathol Pharmacol **89**(3): 291-305.
- Weinreb, R. N. and P. T. Khaw (2004). "Primary open-angle glaucoma." Lancet **363**(9422): 1711-1720.

- Wilson, S. L., M. Ahearne and A. Hopkinson (2015). "An overview of current techniques for ocular toxicity testing." Toxicology **327**: 32-46.
- Winkler, B. S., M. E. Boulton, J. D. Gottsch and P. Sternberg (1999). "Oxidative damage and age-related macular degeneration." Mol Vis **5**: 32.
- Wong, R. W., D. C. Richa, P. Hahn, W. R. Green and J. L. Dunaief (2007). "Iron toxicity as a potential factor in AMD." Retina **27**(8): 997-1003.
- Yau, J. W., S. L. Rogers, R. Kawasaki, E. L. Lamoureux, J. W. Kowalski, T. Bek, S. J. Chen, J. M. Dekker, A. Fletcher, J. Grauslund, S. Haffner, R. F. Hamman, M. K. Ikram, T. Kayama, B. E. Klein, R. Klein, S. Krishnaiah, K. Mayurasakorn, J. P. O'Hare, T. J. Orchard, M. Porta, M. Rema, M. S. Roy, T. Sharma, J. Shaw, H. Taylor, J. M. Tielsch, R. Varma, J. J. Wang, N. Wang, S. West, L. Xu, M. Yasuda, X. Zhang, P. Mitchell and T. Y. Wong (2012). "Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy." Diabetes Care **35**(3): 556-564.
- Yoles, E. and M. Schwartz (1998). "Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: implications for optic nerve neuropathies." Exp Neurol **153**(1): 1-7.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in dem Forschungsinstitut für Augenheilkunde der Universitätsaugenklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Kai Januschowski durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren, als die von mir angegebenen, Quellen verwendet zu haben.

Die Abbildungen 9 (Trägermodell für die perfundierte Retina nach Januschowski und Lüke) und 10 (Aufbau des Modells der isolierten und perfundierten Retina) wurden von Frau Regina Ebenhoch, Universitätsaugenklinik Tübingen, entworfen.

Tübingen, den 17.12.2019

9. Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Januschowski K, Mueller S, Dollinger R, Schnichels S, Hofmann J, Spitzer MS, Bartz-Schmidt KU, Szurman P, Thaler S (2014): "Investigating retinal toxicity of tempol in a model of isolated and perfused bovine retina." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **252**: 935-41

10. Danksagung

Ich danke meinen Eltern für ihre allumfassende Unterstützung und dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben. Im Besonderen danke ich meinem Vater, Dr. Dipl.-Ing. Helmut Dollinger für die Weitergabe wissenschaftlichen Interesses und meiner Mutter, Karin Dollinger für ihr liebevolles Verständnis.

Ich danke meinem Bruder Dr. jur. Boris Dollinger mit Familie, der für mich auf jede Frage eine Antwort wusste.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Dr. rer. nat. Simon Dollinger für die endlose Unterstützung und die positive Kraft dieses Werk letztendlich fertig zu stellen.

Herrn Prof. Dr. med. Karl Ulrich Bartz-Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas, die stete Unterstützung und die willkommene Aufnahme an der Klinik.

Besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Kai Januschowski für die Betreuung, Inspiration und Motivation bei der Durchführung dieser Arbeit.

Auch bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Thaler für die Möglichkeit mit der Substanz Tempol zu arbeiten und der Unterstützung in klinischen Fragen.

Dem Forschungsteam aus dem Breuningerbau danke ich für ihre Unterstützung, eine hilfreiche Zusammenarbeit und eine arbeitsfreundliche Atmosphäre.

Der Feinmechanischen Werkstatt für ihre Mühe und ihren schnellen Einsatz.

Der Veterinärmedizinerin Frau Dr. med. vet. Natalia Quindt ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.