

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
Direktor: Univ.-Prof. Dr.H.Busse  
Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie  
-Leiter:Univ.- Prof. Dr. Dr. S. Thanos-

**Vergleichende Studie zur lokalen und systemischen Applikation  
von Aurintricarboxylsäure nach einer Durchtrennung des  
Sehnervs im Tiermodell**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Limberg, Martin

aus Lüdinghausen

2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: PD. Dr. P. Heiduschka

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. S.Thanos

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
Direktor: Univ.-Prof. Dr.H.Busse  
Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie  
-Leiter:Univ.- Prof. Dr. Dr. S. Thanos-  
Referent: PD. Dr. P. Heiduschka  
Koreferent: Prof. Dr. Dr. S.Thanos

## ZUSAMMENFASSUNG

Vergleichende Studie zur lokalen und systemischen Applikation von  
Aurintricarboxylsäure nach einer Durchtrennung des Sehnervs im Tiermodell

Martin Limberg

Nach der Durchtrennung des Sehnervs bei der adulten Ratte unterliegen die axotomierten retinalen Ganglienzellen (RGZ) einer progressiven Degeneration. Eines der wesentlichen Ziele der Regenerationsforschung ist es, das Fortschreiten dieses Zelltods aufzuhalten und die intrinsischen Funktionen der RGZ für den Beginn der Regeneration zu konservieren. Eine erfolgreiche Methode zur Neuroprotektion ist die intravitreale Injektion von Aurintricarboxylsäure (ATA), bei welcher bis zu 53% der ansonsten innerhalb von 14 Tagen degenerierenden RGZ überleben. Diese Methode ist jedoch mit gewissen Risiken verbunden, und es werden Darreichungsformen gesucht, die mit weniger Beeinträchtigungen für das Tier und somit einer höheren Akzeptanz verbunden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die anti-apoptotisch wirkende Substanz ATA auch bei systemischer Applikation neuroprotektiv auf die axotomierten RGZ wirkt. Dazu wurde Tieren, deren Sehnerv intraorbital durchtrennt wurde, Lösungen von ATA intraperitoneal (i.p.) und intravenös (i.v.) injiziert. Zwei Wochen später wurde die Wirkung dieser Injektionen anhand der Anzahl der überlebenden RGZ untersucht. Es zeigte sich in den Versuchsreihen mit i.p. Injektion eine Steigerung der Überlebensrate der RGZ bis zu +9% zur Kontrollgruppe. Die anderen Ergebnisse lagen mit +3% bis +7% lediglich in den Bereichen, die durch die Injektion der Vehikellösung (+7%) bereits erzielt wurden. Bei der Versuchsreihe mit i.v. Injektionen konnte in zwei Gruppen eine Steigerung der Überlebensrate der RGZ um +1% zur Kontrollgruppe erzielt werden. In den anderen Gruppen lagen die Ergebnisse im Bereich der Kontrollgruppe und zeigten keine signifikante Änderung zu dieser.

Trotz des höheren Anteils überlebender RGZ in einigen Versuchsgruppen wurden im Verhältnis zu den Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede erzielt. Die festgestellten Unterschiede lagen lediglich in den Bereichen, die ohne pharmakologische Interventionen oder durch reine Vehikel-Lösung erzielt werden konnten.

Somit kann gesagt werden, daß nach dem derzeitigen Kenntnisstand für eine neuroprotektive Behandlung im Auge eine lokale Applikation eines Pharmakons als die effektivste Methode zu bewerten ist. Bei systemischer Applikation eines Pharmakons scheinen zu viele Komponenten die Effektivität der applizierten Substanz zu beeinflussen und letztlich zu verhindern.

Alle Versuche sind mit Zulassung des Regierungspräsidiums (Aktenzeichen 50.0835.1.0, G23/2001) durchgeführt worden; über die Operationen wurde gemäß §9a (1) des Tierschutzgesetzes Protokoll geführt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05. 2006

Diese Dissertation ist meiner Familie gewidmet,  
der ich mehr verdanke  
als ich jemals in Worte fassen könnte.

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Vorwort.....  | 1         |
| 1.2. Arten und Folgen einer Sehnervenschädigung.....                             | 2         |
| 1.2.1. Arten einer Sehnervenschädigung.....                                      | 2         |
| 1.2.1. Folgen einer Sehnervenschädigung.....                                     | 3         |
| 1.3. Ablauf des retrograden Zelltodes bei retinalen Ganglienzellen.....          | 5         |
| 1.4. Ansätze der Neuroprotektion bei der Apoptose von RGZ.....                   | 9         |
| 1.5. Ziel der Arbeit.....  | 13        |
| <br>   |           |
| <b>2. Material und Methoden .....</b>  | <b>15</b> |
| 2.1. Operationstechnik.....  | 15        |
| 2.1.1. Versuchstiere, Instrumente und Material.....                              | 15        |
| 2.1.2. Operationen.....  | 15        |
| 2.1.3. Applikation von ATA in den verschiedenen Versuchsreihen.....              | 18        |
| 2.2. Auswertung der Versuche.....  | 19        |
| 2.2.1. Fluoreszenzmikroskopische Verfahren.....                                  | 19        |
| <br>   |           |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1. Aurintricarboxylsäure.....  | 22        |
| 3.2. Eigene Arbeiten mit Aurintricarboxylsäure.....                              | 24        |
| 3.2.1. Effekte der intraperitonealen Injektion von ATA.....                      | 27        |
| 2.1.4. 3.2.2. Effekte der intravenösen Injektion von ATA.....                    | 30        |
| <br>   |           |
| <b>4. Diskussion.....</b>  | <b>33</b> |
| 4.1. Allgemeine Pharmakokinetik bei systemischer Applikation von Substanzen..... | 33        |
| 4.1.1. Resorption.....   | 35        |
| 4.1.2. First-pass-Effekt.....  | 38        |
| 4.1.3. Verteilung.....   | 38        |
| 4.1.4. Dosis-Wirkungs-Beziehung.....   | 43        |
| 4.2. Farbstoff.....  | 45        |
| 4.3. Vehikel-Lösung.....   | 45        |
| 4.4. Vergleich zwischen systemischer und lokaler Applikation von ATA.....        | 46        |

**Literaturverzeichnis..... i**

Lebenslauf

Danksagung

## Abkürzungsverzeichnis

|               |  |
|---------------|--|
| ATA           | Aurintricarboxylsäure                                  |
| ATP           | Adenosintriphosphat                                    |
| Bcl-2         | B-Cell-Leukemia  |
| bFGF          | basic fibroblast growth factor                         |
| DNA           | Desoxyribonukleinsäure                                 |
| i.a.          | intraarteriell   |
| i.p.          | intraperitoneal  |
| i.v.          | intravenös   |
| IGF-I         | insulin-like growth factor-I                           |
| MG            | Mikroglia-Zellen                                       |
| MIF           | microglia inhibiting factor                            |
| mRNA          | Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)    |
| NGF           | nerve growth factor                                    |
| NMDA          | <i>N</i> -Methyl-D-Aspartat                            |
| PBS           | Phosphatpuffersaline                                   |
| PFA           | Paraformaldehyd  |
| PI3-K         | Phosphatidylinositol-3-Kinase                          |
| PKB           | Proteinkinase B  |
| RGZ           | retinale Ganglienzellen                                |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor (tumour necrosis factor- $\alpha$ ) |
| ZNS           | Zentrales Nervensystem                                 |



## **1. Einleitung**

### **1.1. Vorwort**

Der biologische Bestand eines Organismus ist durch einen kontinuierlichen Verschleiß von Zellen und deren Ersatz in Form und Funktion charakterisiert. Dieser natürliche Regenerationsprozess stellt eine lebensnotwendige Reaktion auf eine permanente Anpassung an krankhafte Prozesse, Verletzungen und Umweltveränderungen dar. Das Zentrale Nervensystem (ZNS) der Vögel und Säugetiere stellt, im Hinblick auf diese Erneuerungseigenschaft, eine Ausnahme dar. Denn nach seiner Ausreifung geht die Teilungsfähigkeit der Neurone verloren, und einmal durchtrennte Axone können nicht mehr nachwachsen.

Schädigungen größerer Teile zentraler Nervenbahnen wie sie im Rückenmark aber auch im Sehnerv verlaufen, können irreparable Schäden mit zum Teil tragischen klinischen Konsequenzen nach sich ziehen, wie beispielsweise eine Querschnittslähmung oder eine Erblindung. Derartige, meist aus Unfällen resultierende Behinderungen sind mit enormen physischen und psychischen Leid der Betroffenen und deren Angehörigen verbunden. Auch unter sozioökonomischen Gesichtspunkten sind solche Verletzungen problematisch, da die lebenslangen Rehabilitations- und Pflegekosten der oft jungen Opfer beträchtliche Ausmaße annehmen.

Dieser Erkenntnis der Nichtregenerierbarkeit des ZNS steht das biologische Faktum gegenüber, dass periphere Nervenbahnen, d.h. Axone außerhalb des Gehirns, des Rückenmarkkanals und des Sehnervs, durchaus zum Nachwachsen befähigt sind. So können vergleichbare Verletzungen, wie z.B. die Durchtrennung kranialer oder peripherer Nerven an den Extremitäten, von einer erfolgreichen Regeneration gefolgt sein, die zur funktionellen Restaurierung führt.

In vielen Forschungsansätzen wird versucht, Antworten zum Problem der fehlenden Regenerationsfähigkeit im ZNS zu finden und zugleich Wege zu entdecken, zentrale Axone zur Regeneration zu befähigen. Wenngleich in den letzten Jahrzehnten große Anstrengungen zur Beantwortung jener Fragen unternommen und sogar zahlreiche Lösungsstrategien entwickelt wurden, war bislang noch keine von ihnen so erfolgversprechend, dass sie klinische Relevanz erlangt hätte.

## 1.2. Arten und Folgen einer Sehnervenschädigung

### 1.2.1. Arten einer Sehnervenschädigung

Der Sehnerv wird umhüllt von einer derben Durascheide, die sich kontinuierlich in die *Sclera bulbi* fortsetzt. Ebenso sind eine *Arachnoidea* und *Pia mater* vorhanden.

Ein Subarachnoidalraum ist angedeutet, dieser kommuniziert jedoch nicht mit dem Subarachnoidalraum des Gehirns. Der Sehnerv ist nicht wie ein peripherer Nerv aufgebaut, sondern wie ein dem ZNS zugehöriger Abschnitt. Dieses macht den Sehnerv sehr empfindlich gegenüber schädlichen Noxen verschiedenster Art.

Die Lage des Sehnervs innerhalb des Viszerokranium, der Orbita, und sein weiterer Verlauf entlang von Knochenstrukturen bis zum Eintritt in die mittlere Schädelgrube durch den *Canalis opticus*, bewirkt eine gehäufte Beteiligung des Sehnervs bei **traumatischen Läsionen des Mittelgesichts**. Im Falle lateraler, zentraler oder zentrolateraler Mittelgesichtsfrakturen ist aufgrund der anatomischen Gegebenheiten mit einer hohen Fraktur-beteiligung der Orbita zu rechnen, wobei in diesen Fällen, bei vorliegender Orbitafraktur, als Begleitverletzung eine Beschädigung oder eine völlige Durchtrennung des Sehnervs durch direkte traumatische Einwirkung auftreten kann. Klinisch zeigt sich ein sofortiger Funktionsverlust mit der Erblindung des betroffenen Auges und einer amaurotischen Pupillenstarre. Nach vier bis sechs Wochen wird die Papille blaß und atrophisch, was auf die Degeneration der von den retinalen Ganglienzellen (RGZ) ausgehenden Axone hinweist. Die Zeitspanne zwischen dem Zeitpunkt der Läsion und dem Absterben der RGZ hängt stark von der Lokalisation der Läsion innerhalb des Sehnervs ab. Liegt die Läsion z.B. im retrobulbären Raum, so sterben die RGZ verhältnismäßig schnell ab, wohingegen bei einer weiter distal gelegenen Läsion, z.B. im optischen Trakt, das Absterben der RGZ stark verzögert abläuft (Zeng *et al.*, 1995).

Eine andere Art der Sehnervschädigung liegt beim **Glaukom** („Grüner Star“) oder bei einem **wachsenden Tumor** vor (für eine Übersicht zum Absterben von RGZ beim Glaukom siehe Quigley, 1998).

In diesen Fällen kommt es zu einer Sehnervschädigung durch eine chronische Kompression. Diese wirkt beim Glaukom auf die Axone am Sehnervenkopf vor allem im Gebiet der *Lamina cribrosa*, sowie auf die RGZ selbst. Das Sehvermögen schwindet allmählich und zeigt sich klinisch durch immer größere Ausfälle im Gesichtsfeld.

## 1. Einleitung

Ebenso werden Sehnervschäden durch toxische Noxen ausgelöst, oder sie entstehen durch infektiöse Prozesse.

Im Falle der **toxischen Noxen** sind Methanol und Rauch von schlecht fermentierten Tabaken geringer Qualität zu nennen. Methanol kommt in minderwertigen Branntweinen vor und schädigt den Sehnerv bereits in geringen Konzentrationen (Baumbach *et al.*, 1977; Sekkat *et al.*, 1982; Naeser, 1988; Mc Kellar *et al.*, 1997).

Der Rauch von schlecht fermentierten Tabaken geringer Qualität enthält einen erhöhten Anteil an Cyanid, wodurch es zu chronischen Vergiftungen kommt. In deren Folge entsteht eine Kaskade, die mit enteralen Resorptionsstörungen beginnt. Ein Mangel an Thiamin und Vitamin B12 entsteht und dieser Mangel wirkt toxisch auf den Sehnerv. Eine Übersicht über die durch den Tabakgenuß verursachten Schädigungen des Auges wird von Solberg *et al.* (1998) gegeben.

**Infektiöse Sehnervschädigungen** treten im Falle von z.B. Rückenmarksschwindsucht als Folge einer Syphilis oder einer Borreliose auf, bei denen es zu chronischen Infektionen kommt, die zu einer Atrophie des Sehnervs führen.

Außerdem können **genetisch determinierte Atrophien** vorliegen. Diese beginnen mit Gesichtsfeldausfällen, wobei im Verlauf der Krankheit die Sehschärfe dramatisch abnimmt und es bis zur Erblindung kommen kann. Es wird hier unterschieden zwischen der vorrangig in jungen Jahren auftretenden Optikusatrophie nach Leber (Berninger *et al.*, 1989; Howell, 1998) und der dominant erblichen Optikusatrophie, die erst in späteren Jahren auftritt.

### 1.2.1. Folgen einer Sehnervschädigung

Der Sehnerv ist, wie oben im Text beschrieben wurde, nicht wie ein peripherer Nerv aufgebaut, sondern wie ein zum ZNS gehöriger Abschnitt. Dieses macht den Sehnerv sehr empfindlich gegenüber schädlichen Noxen verschiedenster Art. Kommt es zu einer Beschädigung oder Durchtrennung von Axonen der RGZ, kann dieses fatale Folgen für die betroffene Zelle haben.

Nach einer Schädigung des Sehnerv können zwischen 50% und über 90% der RGZ-Population durch eine Degeneration verloren gehen, in deren Verlauf die absterbenden RGZ durch die in der Retina befindlichen Mikroglia-Zellen (MG) phagozytiert werden.

Mikroglia-Zellen sind die einzigen mesodermalen Zellen des Hirnparenchyms und besitzen wesentliche Eigenschaften von immunkompetenten Zellen. Sie sind in der Lage sterbende

## 1. Einleitung

Zellen als solche zu erkennen und selektiv aus dem Gewebeverband zu eliminieren, ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen. Sichtbar wird der Verlust an RGZ mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes, wenn sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Vier bis fünf Tage nach der Axotomie setzt die Abnahme der Ganglienzell-Population ein, was sich durch Auszählen der fluoreszierenden RGZ quantifizieren läßt. Da die phagozytierenden Mikrogliazellen den Farbstoff aufnehmen, läßt sich auch ihre Anzahl bestimmen. Das Absterben der RGZ ist sieben Tage nach der Schädigung des Sehnervs in vollem Gange, und vierzehn Tage nach einer intraorbitalen Axotomie sind nur noch ca. 15% der Ausgangspopulation der RGZ vorhanden ( Villegas-Perez *et al.*,1993; Berkelaar *et al.*,1994; Peinado-Ramon *et al.*, 1996, Isenmann & Bähr, 1997; Heiduschka & Thanos, 2000a).

Eine unbehandelte Axotomie führt unweigerlich zum Absterben des überwiegenden Teils der RGZ. Dieses Absterben wird durch Vorgänge eingeleitet, die sich schon kurz nach der Schädigung des Sehnervs abspielen. Dabei ist noch wenig über die Natur der retrograden Signale bekannt, die im Soma der RGZ das Absterben einleiten.

Als Folge einer Axotomie kommt es vorübergehend zu plötzlichen Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentration. Außerdem sinkt das vorhandene Membranpotential ab (Berdan *et al.*, 1993). Der Tubulin-Haushalt ist ebenfalls Änderungen unterworfen (Skene & Willard, 1981; Mc Kerracher *et al.*,1990). Der axonale Stofftransport der Zelle, insbesondere der retrograde Stofftransport von potentiellen Wachstumsfaktoren vom zentralen Zielgebiet der Axone in den Zellkörper bricht zusammen (Purves & Nja, 1976; Varon & Adler, 1981). Ebenso wird der Kontakt zwischen Zellkörper und Synapse abgebrochen, wodurch der Informationsfluss über den regulären Kontakt zum Zielgebiet ausbleibt.

Der Verlust des Kontaktes zwischen dem axotomierten Neuron und seinem Zielgebiet und die damit verbundene Unterbrechung der kommunikativen Interaktion durch neurotrophe Faktoren sind, nach der Meinung verschiedener Forscher, eine wesentliche Ursache des retrograden Zelltodes. Die Synthese der neurotrophen Faktoren findet in den axonalen Zielgebieten der Nervenzellen statt und diese gelangen durch retrograden Transport innerhalb der Axone in die Somata. Die Auslösung des programmierten Zelltodes wird im Allgemeinen durch die ausbleibende Versorgung des Zellkörpers mit diesen Faktoren erklärt (Oppenheim, 1991). Es konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass es nach einer tektalen Läsion bei adulten Ratten zu keinem Absterben von RGZ kam, wohingegen bei postnatalen Tieren ein Teil der RGZ abstarb (Perry & Cowey, 1982). Von den Autoren

wird jedoch diskutiert, ob bei den adulten Ratten genügend Kolaterale vorhanden sind, um den nötigen Kontakt der RGZ zum Zielgebiet aufrecht zu erhalten und ein Absterben der RGZ zu verhindern. Andere Untersuchungen zeigen, daß das Absterben der RGZ nur zum Teil auf die Unterbrechung des Kontaktes zwischen RGZ und Zielgebiet zurückgeführt werden kann (Fagiolini *et al.*, 1997). In diesen Versuchen wird der axonale Transport bei neugeborenen Ratten durch das Aufbringen des Lokalanästhetikums Lidocain reversibel unterbrochen. Es zeigt sich bei den Tieren mit Lidocain-Anwendung lediglich eine geringe Anzahl abgestorbener RGZ, wohingegen bei Tieren mit durchtrenntem Sehnerv ein massives Absterben der RGZ zu beobachten ist.

### **1.3. Ablauf des retrograden Zelltodes bei retinalen Ganglienzellen**

Werden die Axone durch ihre Umgebung oder durch ungenügendes intrinsisches Potential an einer erfolgreichen Regeneration gehindert, kommt es in den meisten Fällen innerhalb weniger Tage zum retrograden Tod der betroffenen Zellkörper. Das trifft auch für RGZ zu, wenn ihre Axone aufgrund einer Durchtrennung des Sehnervs geschädigt werden. Der Zelltod setzt nicht sofort nach der Schädigung, sondern verzögert ein, wobei Beginn und Ausmaß von der Art der Verletzung, der Entfernung zum Zellkörper und dem Alter des Tieres abhängig sind (Villégas-Péres *et al.*, 1993).

Eine geschädigte Zelle kann auf zweierlei Arten absterben – durch Apoptose oder Nekrose. Beide Wege lassen sich aufgrund spezifischer Merkmale voneinander unterscheiden, wobei in jüngerer Zeit in bestimmten Modellsystemen auch absterbende Zellen gefunden wurden, welche sowohl apoptotische als auch nekrotische Merkmale aufwiesen (Kaneda *et al.*, 1999).

Die Nekrose ist durch eine Schwellung der Zelle und ihrer Organellen gekennzeichnet, was schließlich zur Ruptur der Membranen und zum Verlust des cytoplasmatischen Inhaltes in den extrazellulären Raum führt. Die Nekrose ruft durch die Aktivität phagozytierender Zellen eine Entzündungsreaktion hervor, die zu einer Schädigung benachbarter Zellen führen kann. Die Apoptose hingegen folgt anderen Mechanismen. Der Begriff *Apoptosis* ist griechischen Ursprungs und bezeichnet eigentlich den herbstlichen Fall der Blätter von Bäumen. In der Wissenschaft versteht man unter Apoptose einen programmierten Zelltod, wie er zum Beispiel bei der natürlichen Reduktion überproduzierter Zellen auftritt. Auf zellulärer Ebene handelt es sich um einen durch unterschiedliche Stimuli ausgelösten aktiven Prozess, der nach einem hierarchischen Programm von einer Zelle durchlaufen wird und schließlich mit ihrem Tod und ihrer Phagozytose durch umliegende Zellen endet.

## 1. Einleitung

Beim Eintritt in den vorprogrammierten Apoptosezyklus kommt es zu einer Schrumpfung des Zytoplasmas und zu einer Kondensation zytoplasmatischer Proteine. Das Chromatin des Zellkerns wird stark verdichtet und zu diesem Zeitpunkt durch aktivierte Endonukleasen internukleosomal fragmentiert. Die übrigen Zellorganellen verbleiben zunächst überwiegend intakt. Der weitere Verlauf ist durch eine Auffaltung der Zellmembran und Separation zellulärer, insbesondere nukleärer Fragmente gekennzeichnet. Im letzten Abschnitt werden die verbliebenen Zellreste durch Phagozytose von Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen und endgültig abgebaut.

Die Ursachen der Apoptose und Nekrose sind ebenfalls sehr verschieden. Die Nekrose tritt zumeist in Folge einer Zellschädigung auf, die beispielsweise durch ein physikalisches Trauma oder lang anhaltenden Sauerstoffentzug bedingt ist. Der programmierte Zelltod hingegen ist das Resultat energieabhängiger, regulierter, zellulärer Reaktionswege und stellt den Endpunkt einer zuvor ausgelösten Signalkaskade dar. Der entscheidende Unterschied zur Nekrose besteht darin, dass apoptotische Zellen durch strukturelle Veränderungen der Zellmembran vom Nachbarzellverband als nicht mehr gleichartig erkannt und z.T. phagozytiert werden, bevor die Integrität der Zellmembran endgültig verloren geht. Dadurch wird eine inflammatorische Reaktion mit einer nachfolgenden Schädigung der Nachbarzellen und eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen weitgehend vermieden. Interessanterweise sterben jedoch die RGZ sowohl nach einem physikalischen Trauma ihres Axons, als auch nach einer Ischämie vorrangig durch Apoptose ab. Im folgenden Text soll nun genauer auf die einzelnen Abschnitte und Mechanismen der Apoptose eingegangen werden. Da jedoch bei der Apoptose von RGZ eine Vielzahl von mitunter sehr komplexen Abläufen stattfindet, wird im Zuge dieser Schrift nur eine vereinfachte Darstellung und Beschreibung der Abläufe gegeben.

In Versuchen wurde gezeigt, dass ein gewisser Teil der RGZ nach einer Axotomie einer Apoptose unterliegt (Berkelaar *et al.*, 1994; Garcia-Valenzuela *et al.*, 1994; Quigley *et al.*, 1995). Diese Erkenntnis zeigte einen zuvor nicht bekannten neuen Auslöser der Apoptose. Bis dahin waren nur zwei Auslöser der Apoptose bei Neuronen bekannt. Zum einen war der Verlust der Unterstützung durch neurotrophe Faktoren (Oppenheim *et al.*, 1991) bekannt und zum anderen wusste man von der apoptotischen Wirkung einer übermäßigen Einwirkung von exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat (Lipton *et al.*, 1994). Diese Faktoren sind auch nach einer Axotomie des Sehnervs vorhanden. Zum einen ist der retrograde Transport von neurotrophen Faktoren aus dem Zielgebiet unterbrochen, und zum

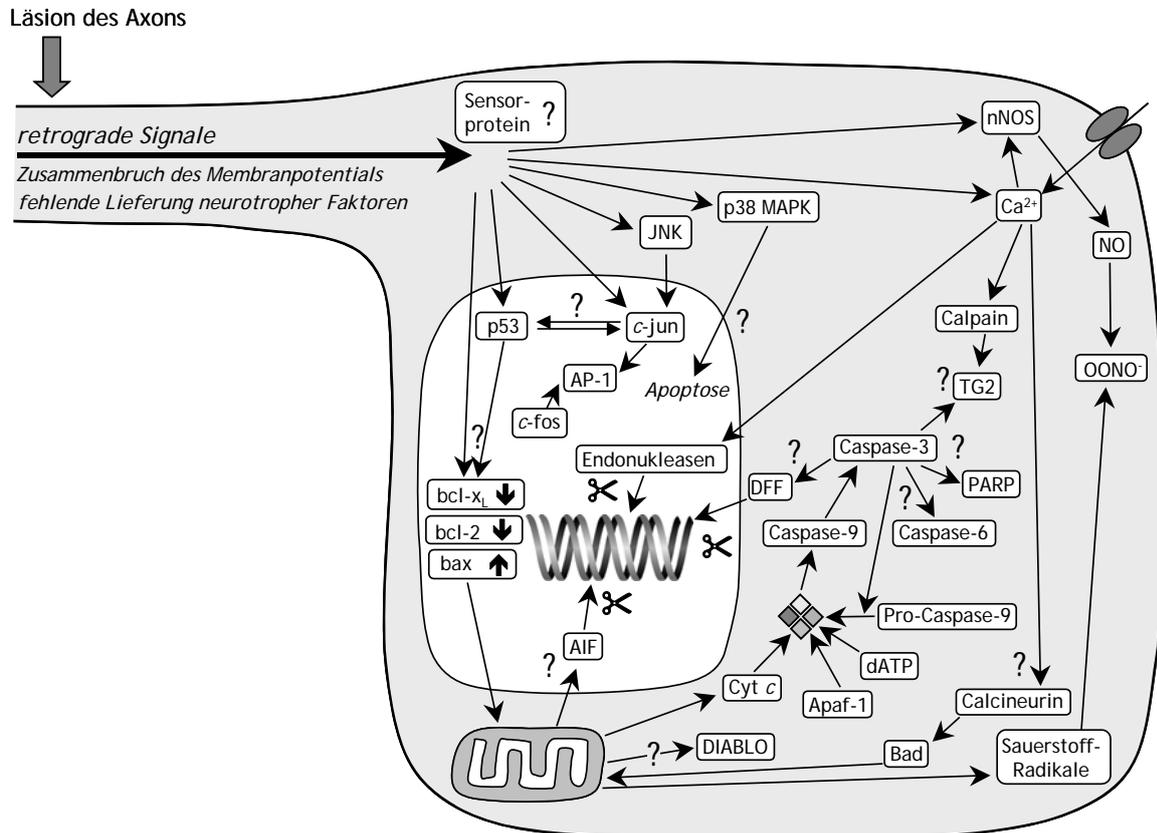
anderen scheint Glutamat eine Rolle beim axotomie-induzierten Zelltod zu spielen (Russelakis - Carneiro *et al.*, 1996). Obwohl es Hinweise gibt, dass ein Teil der RGZ nach einer Axotomie durch Nekrose abstirbt (Thanos *et al.*, 1993; Isenmann *et al.*, 1997; Bien *et al.*, 1999), wurde jedoch durch eine überwiegende Anzahl von experimentellen Untersuchungen bewiesen, dass der größte Teil der axotomierten RGZ durch Apoptose abstirbt. Die regelmäßige Fragmentierung der DNA im Zellkern (Ilschner & Waring, 1992) stellt eines der deutlichsten Merkmale der Apoptose dar. Es entstehen Fragmente, deren Größe ganzzahlige Vielfache in der Größe von 180 bis 200 Basenpaaren beträgt. Durch die Gelelektrophorese kann dieser Effekt als „Leitermuster“ sichtbar gemacht werden. Im Falle einer Nekrose, wo die DNA irregulär fragmentiert wird, liegt eine eher „verschmierte“ Bahn im Gel vor. Im Falle einer Ischämie konnten sowohl apoptotische als auch nekrotische Vorgänge durch die Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Beide Vorgänge sind somit parallel am Absterben der RGZ beteiligt (Kaneda *et al.*, 1999).

Im Zuge der Apoptose sind weitere morphologische Veränderungen nachweisbar, die als Kriterium zur Definition einer Apoptose bei RGZ herangezogen werden können. So ein äußeres Merkmal einer Apoptose ist die Chromatin-Kondensation. Diese ist an „Verklumpungen“ innerhalb des Zellkerns zu erkennen. Der Zellkern wird pyknotisch und es kommt schließlich zur Auflösung der Zellkernmembran. Im Versuch konnten schon 3 bzw. 24 Stunden nach einer durch Ischämie und durch Erhöhung des Augeninnendrucks ausgelösten Läsion ultrastrukturelle Merkmale einer Apoptose, wie die Schrumpfung und Kondensation der Bestandteile des Zellkerns und des Cytoplasmas, nachgewiesen werden (Büchi, 1992). Spätestens zwei Tage nach einer Schädigung des Sehnervs ist eine signifikante Menge von RGZ nachweisbar, die eindeutige morphologische Merkmale einer Apoptose zeigen (Isenmann *et al.*, 1997). Sechs bis sieben Tagen nach einer Schädigung kann die größte Anzahl an RGZ mit eindeutigen morphologischen Merkmalen einer Apoptose nachgewiesen werden (Garcia-Valenzuela *et al.*, 1994; Isenmann *et al.*, 1997). Der Inhalt der apoptotischen Zellen wird in Vesikel aufgeteilt, ohne dass die individuellen Organellen in den Vesikeln geschädigt werden. Diese Vesikel werden von der apoptotischen Zelle abgeschnürt und durch umliegende Zellen aufgenommen. Der gesamte Vorgang läuft unter Energieverbrauch und gut geordnet ab. Somit bleibt eine entzündliche Reaktion des umliegenden Gewebes weitgehend aus.

Die Apoptose kann durch verschiedene Signalwege eingeleitet werden. Das gemeinsame Ziel der unterschiedlichen die Apoptose auslösenden Wege ist die Initiierung der Caspase-Kaskade, die ihrerseits unumkehrbar den Zelltod einleitet.

## 1. Einleitung

Beim *extrinsischen Weg* werden bestimmte Zellmembranrezeptoren mit den sogenannten „Todesdomänen“ aktiviert. Die Bindung von Liganden wie Apo, Fas oder TNF an diese Rezeptoren führt über einen Komplex zur Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -10. Alle bislang verfügbaren Informationen weisen jedoch darauf hin, dass dieser Weg über „Todes-Rezeptoren“ keine Rolle beim Axotomie-induzierten Zelltod spielt.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der zum apoptotischen Zelltod führenden Signalwege in einer retinalen Ganglienzelle (RGZ) nach einer traumatischen Läsion des Axons. Die Fragezeichen kennzeichnen Signalwege, die unklar bzw. für den speziellen Fall des Traumas einer RGZ noch nicht bewiesen sind. Die Funktion des bislang unbekanntes „Sensorproteins“ könnte die durch  $Ca^{2+}$  aktivierbare JNK zumindest zum Teil ausüben. Abkürzungen: AIF - Apoptose induzierender Faktor, AP-1 - Aktivatorprotein 1, Apaf-1 - apoptotische-Protease-aktivierender Faktor-1, Cyt *c* - Cytochrom *c*, DFF - DNS-fragmentierender Faktor, JNK - *c*-jun-*N*-terminale Kinase, nNOS - neuronale NO-Synthase, NO - Stickstoffmonoxid, PARP - Poly-ADP-Ribose-Polymerase, TG2 - Gewebetransglutaminase. Originalabbildung aus Heiduschka, Fischer, Thanos (2004) *Klin. Monatsbl. Augenhkld.*

Bei einem wichtigen *intrinsischen Weg* spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle. Bei der Aktivierung dieses Apoptoseweges öffnen sich unter dem Einfluß eines Überschusses des pro-apoptotischen Proteins Bax Membranporen in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom *c* (bekannt als Bestandteil der Atmungskette im Mitochondrium) und andere pro-apoptotische Proteine ins Cytoplasma freigesetzt werden. Im Cytoplasma bilden Cytochrom *c*, Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) und die Pro-

## 1. Einleitung

Caspase-9 das Apoptosom, wodurch zusammen mit dATP die Caspase-9 aktiviert wird. Die Caspase-9 aktiviert ihrerseits die Caspase-3, welche weitere apoptotische Schritte auslöst bzw. selbst durchführt.

### **1.4. Ansätze der Neuroprotektion bei der Apoptose von RGZ**

Neuroprotektive Maßnahmen haben eine essentielle Bedeutung für die Regeneration von geschädigten RGZ. Im Fall einer Schädigung, z.B. durch eine Axotomie des Sehnervs, dauert es bis zu sechs Tage, bis eine Regeneration der Axone einsetzt. Da es aber innerhalb dieser Zeitspanne zu massiven Verlusten von RGZ kommt, müssen geeignete Maßnahmen eingeleitet werden, mit denen es möglich ist eine maximale Anzahl an RGZ über diesen Zeitraum zu erhalten und zum anderen ihre intrinsischen Funktionen für den Beginn der Regeneration zu konservieren.

Für den Erfolg dieser Maßnahmen ist die genaue Kenntnis der Abläufe der Apoptose nötig. Diese wurden schon weiter oben im Text beschrieben und werden in diesem Abschnitt nur zur besseren Erklärung von Zusammenhängen erneut kurz angeführt.

Die Neuroprotektion muss drei Aspekte erfüllen:

- Durch die Neuroprotektion sollte das Absterben der RGZ verhindert werden. Da zumindest ein großer Teil der RGZ dem Ablauf der Apoptose unterliegt, kann hier der Einsatz von bekannten neuroprotektiven Wirkstoffen aus der Apoptoseforschung angezeigt sein.
- Die neuroprotektive Wirkung auf die RGZ muss solange anhalten, bis die geschädigten Zellen mit der Regeneration ihrer Axone beginnen können. Dieser Zeitraum sollte mindestens eine Woche betragen, im Idealfall sollte jedoch eine Zeitspanne von zwei Wochen abgedeckt werden.
- Die RGZ, die durch diese neuroprotektiven Maßnahmen erhalten wurden, müssen nicht nur zu kurzen Aussprossungen am geschädigten Axon in der Lage sein, sondern sie sollten die Fähigkeit zur Regeneration besitzen, d.h. zum Längenwachstum des geschädigten Axons ins alte Zielgebiet.

## 1. Einleitung

Eine wichtige Rolle spielt auch die Umgebung, mit der die Wachstumskegel der regenerierenden Axone konfrontiert werden. Im Falle einer fehlenden oder mangelhaften Neuroprotektion reagieren die regenerierenden Axone ausgesprochen empfindlich auf hemmende Einflüsse und das Fehlen von trophischen Faktoren in ihrer Umgebung. Wenn jedoch eine ausreichende Neuroprotektion vorliegt, dann zeigen die regenerierenden Axone ein weitaus robusteres Wachstumsverhalten.

In den vergangenen Jahren wurde eine große Bandbreite von verschiedenen Substanzen und Wirkstoffen in Bezug auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften auf axotomierte RGZ getestet. Angesichts dessen, dass ein großer Teil der geschädigten RGZ durch Apoptose abstirbt, liegt es nahe den Vorgang der Apoptose selbst zu hemmen.

Hierzu gibt es verschiedene Möglichkeiten, um in den Ablauf der Apoptose einzugreifen und somit geeignete Ansätze zur ihrer effektiven Hemmung zu finden. Im Folgenden soll kurz auf einige Ansätze zur Neuroprotektion eingegangen werden.

Es wird vermutet, dass infolge einer Läsion des Sehnervs die intrazelluläre **Kalzium-Ionen**-Konzentration ansteigt, wodurch einige wichtige Apoptosewege aktiviert werden. Durch Flupirtin, eine Triaminopyridin-Verbindung, sollte der Einstrom von Kalzium-Ionen in RGZ vermindert werden, die durch Ischämie oder durch eine intravitreale Injektion von NMDA geschädigt worden waren (Nash *et al.*, 2000). In beiden Fällen konnte mit Hilfe von Flupirtin eine Verringerung des Absterbens der RGZ erreicht werden.

Die Aktivität von **Calcineurin** hängt eng mit dem Kalzium-Haushalt einer Zelle zusammen. Calcineurin ist eine Serin/Threonin-Proteinphosphatase und an vielen zellulären Vorgängen und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signaltransduktionswegen beteiligt (für eine Übersicht siehe Rusnak & Mertz, 2000). Die Beteiligung von Calcineurin an der Apoptose von Neuronen scheint über das Cytochrom *c* und die Caspase-3 zu erfolgen (Asai *et al.*, 1999). Versuche an PC12-Zellen zeigten, dass die apoptotische Wirkung von Calcineurin durch ihre Inhibitoren, Cyclosporin A und FK506, aber auch durch Bcl-2 verringert wird. Ebenso ist Calcineurin an der Dephosphorylierung und somit Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bad beteiligt (Wang *et al.*, 1999), und es gibt Hinweise darauf, dass Calcineurin den für das Überleben einer Zelle essentiellen Redoxzustand beeinflusst (Wolvetang *et al.*, 1996).

## 1. Einleitung

Durch eine Hemmung der Proteinbiosynthese mit bekannten Inhibitoren der Proteinbiosynthese, **Cycloheximid** (Garcia-Valenzuela *et al.*, 1994; Rabacchi *et al.*, 1994b; Castagne & Clarke, 1997) und **Aktinomycin D** (Rabacchi *et al.*, 1994b), wurde versucht, die Apoptose einzuschränken. Grundgedanke dieser Versuche war es, dass die Apoptose einen aktiven Prozess darstellt, in dessen Verlauf in der apoptotischen Zelle neue Proteine synthetisiert werden. Durch Versuche konnte gezeigt werden, dass die Anzahl apoptotischer RGZ nach einer Axotomie verringert war, wenn Cycloheximid oder Aktinomycin D als Inhibitor der Proteinbiosynthese eingesetzt wurden.

Das **Bcl-2** ist ein Proto-Onkogen, das zuerst in humanen B-Lymphozyten bei Leukämie (**B-Cell-Leukemia**) beschrieben wurde. Es ist ein 26 kD Protein, das an den mitochondrialen und perinukleären Membranen assoziiert vorliegt. Durch Untersuchungen an transgenen Mäusen sollte geklärt werden, ob Bcl-2 als neuroprotektive Substanz eingesetzt werden kann. In ihren Studien verwendeten Bonfante *et al.* (1996) transgene Mäuse, die Bcl-2 überexprimieren und untersuchten das Ausmaß des Absterbens von RGZ sowohl während der postnatalen Entwicklung, als auch nach einer Axotomie. In beiden Fällen war eine signifikante Verringerung des Zelltodes im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zu beobachten. Diese Ergebnisse konnten aber nur auf einen kurzen Zeitraum nach der Operation übertragen werden, da die Versuchstiere nach dem Eingriff nur noch 30 Stunden am Leben gehalten werden konnten. Um Angaben über einen möglichen Langzeiteffekt des Proto-Onkogens Bcl-2 auf die Apoptose nach einer Axotomie zu erhalten, führten Cenni *et al.* (1996) Versuche an adulten transgenen Bcl-2-Mäusen durch. Auch hier zeigte sich ein starker neuroprotektiver Effekt durch Verwendung von Bcl-2 bei den axotomierten adulten transgenen Bcl-2-Mäusen. Während bei den Wildtyp-Mäusen zwei Monate post Axotomie des Sehnervs nur noch ca. 5% der Gesamtpopulation an RGZ vorhanden waren, lag die Überlebensrate der RGZ bei den transgenen Bcl-2-Mäusen sogar nach dreieinhalb Monaten noch bei 63% der Gesamtpopulation an RGZ. Dies zeigt die starke neuroprotektive Kapazität der ständigen Überexpression von Bcl-2 auf die RGZ. Jedoch tritt bei längeren Zeitspannen eine Schrumpfung der RGZ ein, wobei aber die Funktion der RGZ erhalten bleibt. Dies konnte durch Messungen des RGZ-abhängigen Anteils des Elektoretinogramms (Muster-ERG) gezeigt werden (Porziatti *et al.*, 1996). Im Elektoretinogramm konnten auch nach dreieinhalb Monaten nach Axotomie keine Änderungen im Muster-ERG festgestellt werden, wohingegen bei den Wildtyp-Mäusen während der ersten zwei Monate nach der Axotomie das Muster-ERG praktisch völlig erloschen war.

## 1. Einleitung

Die Inaktivierung der **Caspasen** stellt einen weiteren Ansatz zur Hemmung der Apoptosekaskade dar. Bei den Caspasen handelt es sich um eine Enzymfamilie aus bis heute 14 bekannten Cystein-Proteasen, die starke Sequenzhomologien zum *ced-3*, dem „Todesgen“ des Wurms *Caenorhabditis elegans* besitzen, das während seiner Entwicklung aktiv am programmierten Zelltod beteiligt ist (Yuan *et al.*, 1993).

Verschiedene synthetisch hergestellte Peptide und Peptid-Derivate werden kommerziell angeboten, die als spezifische Inhibitoren für die Caspase-1 (WEHD, YVAD, Z-YVAD, Z-VAD) oder die Caspase-3 (DEVD, IETD) wirken. In Versuchen wurde gezeigt, dass kultivierte RGZ durch Zugabe des Peptids Z-VAD besser überlebten (Chen *et al.*, 1997a). Es konnte ebenso durch Tierversuche festgestellt werden, dass die Caspase-3 eine wichtige Rolle beim durch Axotomie induzierten Zelltod einnimmt. Dies geht auch aus den Ergebnissen von Tezel & Wax (1999) hervor, die eine Verzögerung des apoptotischen Zelltodes von RGZ durch Z-IETD-FMK bei *in-vitro*-Versuchen zeigten. Im folgenden wurden verschiedene Caspase-Inhibitoren auf ihre anti-apoptotische Wirkung getestet. So wurden DEVD bzw. seine Derivate (Kermer *et al.*, 1999b, 2000; Chaudhary *et al.*, 1999), Z-VAD (Schmeiser & Grand, 1999), sowie YVAD (Lucius & Sievers, 1997; Lam *et al.*, 1999a; Katai *et al.*, 1999) bei Versuchen eingesetzt. Die Caspase-3 kann auch intrinsisch durch die phosphorylierte Form der Proteinkinase B (PKB) gehemmt werden. PKB wird durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) phosphoryliert, die ihrerseits durch IGF-I (*insulin-like growth factor I*) aktiviert werden kann. Diesen direkten Weg nutzten Kermer *et al.* (2000) in ihren Versuchen und erzielten nach intravitrealen Injektionen von IGF-I eine verbesserte Überlebensrate von axotomierten RGZ. Inzwischen konnte auch gezeigt werden, dass die spezifische Inhibierung der Caspasen-1, -8 und -9 neuroprotektive Effekte zeigt, wobei noch nicht genau geklärt ist, nach welchem Mechanismus die Caspasen-1 und -8 beim durch Axotomie induzierten Tod der RGZ wirken.

Die Fragmentierung der DNA im Zellkern ist einer der letzten und entscheidenden Schritte im Ablauf der Apoptose von RGZ. Dieser wird von Enzymen, den **Endonukleasen**, ausgeführt. Versuche haben gezeigt, dass diese Endonukleasen durch den organischen Farbstoff Aurintricarboxylsäure (ATA) erfolgreich gehemmt werden können. Bei durch Ischämie oder Axotomie induziertem Zelltod von RGZ zeigte sich eine klare neuroprotektive Wirkung von ATA, die höchstwahrscheinlich von der Hemmung der Endonukleasen herrührt (Lam *et al.*, 1995; Rosenbaum *et al.*, 1997; Heiduschka & Thanos, 2000).

## 1. Einleitung

Auf die anti-apoptotische Wirkung von ATA und dessen damit verbundenen Wirkungsmechanismen wird zu einem späteren Zeitpunkt im Kapitel „Material und Methode“ ausführlicher eingegangen.

Auf zellulärer Ebene stellen die **Mikrogliazellen** einen ebenfalls entscheidenden Faktor für das Überleben oder die Degeneration der RGZ dar. Einerseits produzieren sie überlebensfördernde Faktoren wie „*nerve growth factor*“ (NGF) (Nagata *et al.*, 1993), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und Laminin (Rabchevsky, 1997), andererseits können sie auch neurotoxische Substanzen sezernieren, zu denen der *tumour necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) sowie Stickstoffmonoxid (NO),(Giulian, 1993; Giulian *et al.*, 1993) zählen. So führte die pharmakologische Hemmung der phagozytierenden Mikroglia-Zellen durch den intravitreal injizierten *microglia inhibiting factor* (MIF) zu einer deutlichen Zunahme überlebender RGZ und zu der bis dahin höchsten Anzahl einwachsender Axone in ein an den Sehnervstumpf angenähtes Ischiasnervtransplantat (Thanos *et al.*, 1993; Thanos and Mey, 1995).

### 1.5. Ziel der Arbeit

Bei unseren Untersuchungen am geschädigten Sehnerv ist es unser Ziel, eine möglichst gute Neuroprotektion zu erreichen, damit für die angestrebte Regeneration der retinalen Ganglienzellaxone und die funktionelle Wiederherstellung der Sehbahn möglichst viele überlebende RGZ zur Verfügung stehen. Nur wenn es gelingt, nach der Verletzung eine ausreichend große Neuronenpopulation am Leben zu erhalten, kann der Versuch unternommen werden, physiologische Wachstumsprozesse zu reaktivieren, die eine Regeneration von Axonen erlauben.

Die meisten neuroprotektiv wirkenden Substanzen werden im Tiermodell durch intravitreale Injektion appliziert. Diese ist jedoch in der Klinik mit gewissen Risiken, wie Entzündungen verbunden, und sie ist auch nicht die von den Patienten favorisierte Darreichungsform. Deshalb werden Darreichungsformen gesucht, die mit weniger Risiken und Beeinträchtigungen für den Patienten und somit einer höheren Akzeptanz verbunden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die anti-apoptotisch wirkende Aurintricarboxylsäure (ATA), die bei früheren Untersuchungen erfolgreich intravitreal eingesetzt wurde, auch bei systemischer Applikation neuroprotektiv auf die axotomierten RGZ wirkt. Dazu wurde Tieren, deren Sehnerv intraorbital durchtrennt wurde, Lösungen von ATA intraperitoneal und intravenös injiziert. Zwei Wochen später wurde die Wirkung

## 1. Einleitung

dieser Injektionen anhand der Anzahl der überlebenden RGZ untersucht.

Im folgenden soll detaillierter auf die eingesetzten Techniken und die erzielten Ergebnisse eingegangen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Operationstechnik

#### 2.1.1. Versuchstiere, Instrumente und Material

Für die Operationen wurden Sprague-Dawley-Ratten (*Rattus norvegicus*) mit einem Gewicht zwischen 200 und 250 g verwendet. Dies entspricht einem Alter der Tiere von 8 bis 10 Wochen. Die Haltung erfolgte paarweise bei Raumtemperatur (18 bis 20° Celsius) unter natürlichem Hell-Dunkel-Rhythmus in üblichen Zuchtbehältern (Makrolonkäfig, Typ III). Die Ernährung wurde durch eine *ad-libitum*-Diät aus Standard-Alleinfutter und Leitungswasser sichergestellt. Alle Versuche sind mit Zulassung des Regierungspräsidiums (Aktenzeichen 50.0835.1.0, G23/2001) durchgeführt worden; über die Operationen wurde gemäß §9a (1) des Tierschutzgesetzes Protokoll geführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 84 Tiere verwendet, deren Verteilung sich wie folgt aufschlüsselt:

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| intraperitoneale Anwendung von ATA | 36 Tiere |
| intravenöse Anwendung von ATA      | 24 Tiere |
| intravitreale Anwendung von ATA    | 8 Tiere  |
| Kontrollen                         | 16 Tiere |

Die für die operativen Eingriffe benötigten Instrumente (feine Pinzetten, chirurgische Pinzetten, Mikro-, Kapsel-, Präparationsscheren, Faden- und Skalpellhalter mit spitzen und stumpfen Klingen) stammten von den Firmen Aeskulap, Martin (beide Tuttlingen) und Storz. Tupfer in geeigneten Größen (2 bis 5 mm) wurden selbst zugeschnitten. Die Operationen wurden an einem Zeiss Operationsmikroskop (OMI 19FC) bei 4 bis 16-facher Vergrößerung durchgeführt. Außerdem standen ein Handstaubsauger und ein handelsüblicher Rasierapparat für die Operationsvorbereitung der Ratten zur Verfügung.

#### 2.1.2. Operationen

Vor jedem operativen Eingriff wurden die Ratten durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion eines Gemisches aus Xylazin (Medistar, 2%ige Lösung, 50 µl/100 g Körpergewicht) und Ketanest (Parke-Davis, 5%ige Lösung Ketaminhydrochlorid, 200 µl/100 g Körpergewicht) betäubt. Nach Erreichen des Narkosestadiums, das durch das Erlöschen des

Corneareflexes verifiziert werden konnte, wurde die Kopfhaut der Tiere rasiert. Die Fixierung der Tiere an den Operationstisch erfolgte mit Hilfe eines speziell konstruierten Kopfhalters. Die Extremitäten wurden mit Klebestreifen am Untergrund befestigt.

Unter den oben beschriebenen Bedingungen hielt die Narkose für ca. 1 bis 1,5 Stunden an. Um einer bakteriellen Infektion der Nähte und einem Austrocknen der Hornhaut vorzubeugen, wurden beide Bereiche mit einer antibiotischen Augensalbe (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) am Ende einer jeden Operation abgedeckt und die Tiere in einen Käfig mit frischem Streu gesetzt. Zwei bis drei Stunden nach dem jeweiligen Eingriff bzw. in den darauf folgenden Tagen wurde durch postoperative Kontrollen sichergestellt, dass alle Tiere aus der Narkose erwacht waren, keine Verhaltensauffälligkeiten zeigten, die auf Schmerzen hätten hinweisen können und darüber hinaus, dass sich die Operationsnähte in einwandfreiem Zustand befanden.

### **2.1.2.1. Axotomie des Sehnervs**

Bei allen Versuchen wurde die Axotomie des Sehnervs nur am operativ leichter zugänglichen Sehnerv des linken Auges durchgeführt, so dass die Tiere nie beidseitig erblindeten. Mit einem Skalpell wurde die Kopfhaut der Ratte durch einen ca. 1,5 cm langen, sagittalen Schnitt entlang der Medianlinie aufgetrennt und vorsichtig vom Schädel präpariert, so dass der linke Kopfhautlappen mit einem chirurgischen Faden (4.0, Ethicon) über das linke Auge weggespannt werden konnte. Ein folgender Schnitt entlang des *Os frontale* durch das Bindegewebe oberhalb des Augapfels eröffnete den Zugang zur Orbita bei minimaler Verletzung kleiner Blutgefäße. Eine partielle Entfernung der Tränendrüse und eine Durchtrennung der oberen extrabulbären Muskeln ermöglichten das Auffinden des Sehnervs im retrobulbären Raum. An den am Augapfel verbliebenen Enden der durchtrennten Augenmuskeln wurde ein Haltefaden angebracht (7.0 Ethicon) und das Auge vorsichtig nach unten gezogen sowie fixiert. Anschließend wurden die Meningen des Sehnervs mit einer kleinen Schere längs aufgeschnitten, so dass der freie Sehnerv hervortrat. Er konnte nun leicht angehoben und mit einer feinen Vannas-Schere durchtrennt werden. Hierbei durfte die *Arteria centralis*, die bei Nagetieren innerhalb der Meningen entlang des Sehnervs verläuft, nicht geschädigt werden, da dies zu einer Ischämie der Retina mit Nekrose geführt hätte. Die Durchtrennung des Sehnervs erfolgte in ca. 1 mm Abstand zum Bulbus. Dieser Abstand wurde bei allen Operationen eingehalten.

### 2.1.2.2. Retrograde Färbung retinaler Ganglienzellen

Der retrograde axonale Transport von Fluoreszenzfarbstoffen kann zur spezifischen Markierung der RGZ genutzt werden. Dieses neuroanatomische Verfahren basiert auf der biologischen Eigenschaft lebender Nervenzellen, bestimmte Moleküle aufzunehmen, im Axon zu transportieren und im Soma anzureichern. Bei den in dieser Schrift durchgeführten Untersuchungen wurde der lipophile Carbocyanin-Farbstoff 4Di-10ASP (4-(4-Didecylamino)styryl)-N-methylpyridiniumiodid, Molecular Probes) für die retrograde Färbung verwendet. Dieser wird wegen seiner Lipophilie in Zellmembranen eingelagert. Aufgrund seiner Unlöslichkeit in wässrigen Medien kann der Farbstoff direkt in kristalliner Form an bestimmten Orten des Nervensystems plaziert werden. Bei den in dieser Schrift beschriebenen Versuchen wird der Farbstoff nach seiner Plazierung an den Stumpf des Sehnervs mit inkompletter Freud'scher Adjuvans (Sigma) als Lösungsmittel versetzt. Durch die in der unkompletten Freud'schen Adjuvans enthaltenen langkettigen Kohlenwasserstoffe wird die Aufnahme des Farbstoffes in die Lipidmembranen der Axone beträchtlich erleichtert. Der retrobulbäre Raum wird anschließend mit etwas Gelfoam abgepolstert, um den Bulbus und den Farbstoff in einer stabilen Position zu halten.

Eine weitere Variante der retrograden Färbung ist es, den Farbstoff eine Woche vor der Axotomie in den *Superior colliculus*, das Terminationsgebiet der retinalen Ganglienzellaxone, zu geben. Diese Methode fand aber in dieser Arbeit keine Anwendung.

Der Farbstoff zeigt ein gutes Färbeverhalten. Er verbleibt über eine lange Zeit in den gefärbten RGZ und verursacht weder transzelluläre Färbungen, noch wird er beim Präparieren der Retina ausgewaschen. Außerdem bietet er den nicht zu unterschätzenden Vorteil, dass er im Anregungslicht des Fluoreszenzmikroskops kaum ausbleicht.

### **2.1.3. Applikation von ATA in den verschiedenen Versuchsreihen**

#### **2.1.3.1 Intraperitoneale Injektionen**

Die Darreichung der neuroprotektiven Substanz ATA erfolgte post-operativ durch eine Injektion flach unter das Bauchfell der Ratte. Das Tier war zu diesem Zeitpunkt noch in der Narkose, so dass dieser Vorgang ohne Schmerzen und ohne Stress für das Tier durchgeführt werden konnte.

Entsprechend der Menge des intraperitoneal injizierten ATA und der Häufigkeit der Injektion innerhalb von zwei Wochen wurden die Tiere in folgende vier Gruppen aufgeteilt:

1 mal 1,5 mg ATA

1 mal 7,8 mg ATA

2 mal 7,8 mg ATA

4 mal 7,8 mg ATA

Die Zeitintervalle zwischen den Injektionen bei mehrfacher Applikation waren wie folgt eingeteilt:

- bei zweimaliger Injektion betrug das Intervall sieben Tage
- bei viermaliger Injektion betrug die Intervalle vier, drei, und wieder vier Tage, ehe die Tiere nach weiteren drei Tagen enukleiert wurden.

#### **2.1.3.2 Intravenöse Injektion**

Die Darreichung der neuroprotektiven Substanz ATA erfolgte ebenfalls post-operativ durch eine Injektion in die Schwanzvene des Tieres. Die Injektion wurde nahe der Schwanzwurzel appliziert, da an dieser Stelle der Durchmesser der Schwanzvene größer ist und sie somit gut zu erkennen ist.

Die Konzentrationen und Injektionshäufigkeiten der intravenös injizierten ATA-Menge innerhalb von zwei Wochen waren wie folgt aufgeteilt:

1 mal 1,5 mg ATA

2 mal 1,5 mg ATA

4 mal 1,5 mg ATA

## 2. Material und Methoden

Die Zeitintervalle zwischen den Injektionen bei mehrfacher Applikation wurden wie folgt eingeteilt:

- bei zweimaliger Injektion betrug das Intervall sieben Tage
- bei viermaliger Injektion betrug die Intervalle vier, drei, und wieder vier Tage, ehe die Tiere nach weiteren drei Tagen enukleiert wurden.

### 2.2. Auswertung der Versuche

#### 2.2.1. Fluoreszenzmikroskopische Verfahren

##### 2.2.1.1. Material

###### Geräte

*Präparations-Stereomikroskop (Zeiss):* STEMI SR

*Axiophot (Zeiss):* Fluoreszenzmikroskop mit Epifluoreszenzeinrichtung mit Fluoreszenzfiltern 450 bis 490 nm, 510 bis 560 nm, und 395 bis 440 nm, HBO 50 W-Quecksilberhochdrucklampe und 3 integrierten Kameras

Präparationsbesteck: feine Pinzetten, spitze und runde Skalpellklingen (Nr. 10, Nr. 11), Kapselschere (Storz)

Fixierlösung: 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS, pH 7.4

###### Verbrauchsmaterialien:

*Nitrocellulosefilter (Sartorius):* schwarz, Durchmesser 50 mm, Porengröße 0,45 µm

*Filter (Whatman):* weiß

*Petrischalen (Greiner):* Durchmesser 35 mm

###### Eindeckelmedium:

*Mowiol 4-88 (Hoechst)*

12 g Mowiol wurden zunächst in 30 g fluoreszenzfreiem Glycerin unter intensivem Rühren gelöst. Danach wurden 30 ml destilliertes Wasser zugegeben. Unter leichtem Rühren wurde die entstandene Suspension für einige Zeit stehen gelassen, bevor weitere 60 ml einer 0,2 M Tris/HCL-Puffer-Lösung (pH 8,5) hinzugefügt wurden.

Die Flüssigkeit wurde bei 56°C für 10 min leicht gerührt. Unlösliche Bestandteile wurden bei 5000 g für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C aufbewahrt.

## 2. Material und Methoden

### Objektträger:

von der Firma Engelbrecht (Medizin und Labortechnik GmbH/Edermünde), ca. 76×26 mm, geputzt, gebrauchsfertig.

### Deckgläser:

von der Firma Engelbrecht (Medizin und Labortechnik GmbH/Edermünde), ca. 15×15 mm gebrauchsfertig.

### Film für die Fluoreszenzaufnahmen:

Ilford HP5: 400 ASA Schwarz-Weiß-Film

#### **2.2.1.2. Präparation der Netzhaut**

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen über das Überleben von RGZ nach einer Axotomie werden die Ratten 14 Tage nach Axotomie und Färbung mit Hilfe von in eine Glasglocke eingeleitetem CO<sub>2</sub> getötet, was eine bei Tierversuchen mit kleinen Nagetieren übliche und erlaubte Methode darstellt. Nach E nukleation des Tieres erfolgt ein Skalpelleinstich am Limbus, der als Ansatzpunkt für einen zirkumferentiellen Schnitt mit der Kapselschere dient, so dass auf diese Weise der vordere Teil des Auges mit Cornea, Iris und Linse entfernt werden kann. Es folgen 4 radiale Einschnitte im Winkel von je 90° zueinander, die im nächsten Schritt die flächenhafte Ausbreitung der gekrümmten, kelchförmigen Retina auf einem Nitrocellulosefilter erlauben. Die Netzhaut wird mit Hilfe von zwei feinen Pinzetten vorsichtig von der Sklera abgelöst, bis sie nur noch an der Papille festhängt. Anschließend wird sie als Ganzes vom Augenbecher abgelöst. Die vollständige Abtrennung der Retina erreicht man durch einen Schnitt mit einer gebogenen Mikroschere hinter der Papille, so dass diese nun frei schwimmend, mit der RGZ-Schicht dem Präparator zugewandt, auf dem Nitrocellulosefilter kleeblattförmig ausgebreitet werden kann. Man bezeichnet dieses als retinales Ganzpräparat (*“whole-mount“-Präparat*). Mit dem Nitrocellulosefilter wird die Retina nun auf trockenes weißes Filterpapier (Whatman-Papier) transferiert und somit die Flüssigkeit nach unten weggesogen, ohne das Gewebe ganz auszutrocknen. Dies dient der besseren Haftung der Retina auf dem Nitrocellulosefilter. Reste des noch auf der Retina haftenden Glaskörpers werden anschließend mit feinen Pinzetten vorsichtig entfernt und der Filter samt Netzhaut in eine Petrischale mit Fixiermittel (4%iges PFA in PBS) überführt.

In dem Fixativ verbleiben die ausgebreiteten Gewebe mindestens zwei Stunden, bevor sie in Mowiol eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

### **2.2.1.3. Quantifizierung und Auswertung der Effekte**

Für die Betrachtung der mit 4Di-10ASP gefärbten RGZ und Mikroglia-Zellen eignet sich das FITC-Filter des Fluoreszenzmikroskops.

Bei der Auswertung wurden zwei Effektindikatoren genutzt. Zum einen wurde, um die Effekte der verschiedenen Behandlungen der Retina zu erfassen, die Zahl der gefärbten RGZ bestimmt und zum anderen, im gleichen Zuge, die Zahl der gefärbten retinalen Mikroglia-Zellen. Wie bereits erwähnt, kann die Zahl der retinalen Mikroglia-Zellen mitbestimmt werden, da nach einer Axotomie die degenerierten RGZ von den residenten retinalen Mikroglia-Zellen phagozytiert werden. Dabei nehmen diese den in den Ganglienzellen vorhandenen Farbstoff auf und werden dadurch im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Da sich die mit 4Di-10ASP gefärbten Mikroglia-Zellen in Form, Größe, Morphologie und der Verteilung des Farbstoffs innerhalb des Zellkörpers von den gefärbten Ganglienzellen unterscheiden, kann man sie von letzteren eindeutig differenzieren und separat zählen. Ausschlaggebend für die Beurteilung der Effekte der einzelnen Behandlungen war aber die Zahl der vorhandenen Ganglienzellen 14 Tage nach Axotomie und Färbung. Die Anzahl der Zellen wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt, in dessen einem Okular sich ein Zählgitter befindet. Bei der verwendeten 40-fachen Vergrößerung (400-fache Endvergrößerung) entspricht die ausgezählte Fläche des dargestellten Gitters einer Fläche von  $0,095 \text{ mm}^2$ . Die Anzahl der RGZ pro gezählten Sektor dividiert durch diesen Wert ergibt die Anzahl der RGZ pro  $\text{mm}^2$  auf der Retina.

Bei den in dieser Schrift vorgestellten Versuchen wurde bei den Auszählungen eine möglichst große Anzahl an Sektoren ausgezählt. Diese Anzahl lag in der Regel bei 75 bis 80 ausgezählten Sektoren pro Retina, wobei in Ausnahmefällen diese Zahl unterschritten wurde, aber immer bei über 30 Sektoren pro Retina lag. Durch diese schwankende Sektorenzahl war es erforderlich, bei den weiteren Berechnungen des Durchschnittes und der Standardabweichung die Anzahl der ausgezählten Sektoren bei der Ergebnisdarstellung zu berücksichtigen. Dieses wurde durch eine geeignete Gewichtung der Zählergebnisse erreicht.

Mittels der in das Mikroskop integrierten Kamera konnte das Aussehen der retinalen Ganzpräparate photographisch dokumentiert werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Aurintricarboxylsäure

Wie bereits im Abschnitt über die Neuroprotektion ausgeführt (Kapitel 1.4 - Ansätze der Neuroprotektion bei der Apoptose von RGZ), besteht eine vielversprechende Strategie zur Rettung verletzter Neurone darin, die nach einer Läsion einsetzende Apoptose zu hemmen. Dies kann in den verschiedenen Stadien der Apoptose stattfinden.

Eine Substanz mit neuroprotektiver Wirkung ist Aurintricarboxylsäure (ATA). ATA ist ein roter kristalliner Feststoff, der sich kaum in Wasser, dafür aber gut in organischen Lösungsmitteln löst und reizend auf die Haut und andere Gewebe wirkt.

Der wichtigste anti-apoptotische Wirkungsmechanismus von ATA besteht darin, dass es wirkungsvoll und zuverlässig die Endonucleasen hemmt, die im Verlauf der Apoptose die DNA fragmentieren und somit ein weiteres Überleben der Zelle unmöglich machen (Hallick *et al.*, 1977). Es gibt jedoch weitere wichtige Effekte, die ATA bewirken kann.

ATA inhibiert auch

- DNA-Polymerasen (Givens & Manly, 1976) und RNA-Polymerasen (Akiyama *et al.*, 1977)
- die Initiierung der Transkription (Hunt & Wagner, 1975) und der Translation (Chatterjee *et al.*, 1976)
- die Bildung des ribosomalen Komplexes (Emmerich *et al.*, 1979)
- die Bindung von Nucleasen an DNA und RNA (Gonzales *et al.*, 1980)
- die Assoziation von Blutplättchen mit dem von-Willebrand-Faktor (Phillips *et al.*, 1988)
- Enzyme wie Serinproteasen (Bina-Stein & Tritton, 1976), Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (Hsu & Joshi, 1977), Transferasen (Hibasami *et al.*, 1982), das Proteosom (Hough *et al.*, 1986), Phosphofruktokinase (McCune *et al.*, 1989), Topoisomerase II (Catchpool & Stewart, 1994), Calpain (Posner *et al.*, 1995), ced-3 (Hugunin *et al.*, 1996), sowie die Caspase-9 (Mesner *et al.*, 1999)
- Rezeptoren, wie für Progesteron (Toft *et al.*, 1979), und Estradiol (Moudgil & Eessalu, 1980).

### 3. Ergebnisse

Es gibt Berichte, die besagen, dass ATA RNA-Polymerasen stimulieren kann (Swennen *et al.*, 1981). Der Serotonin-Transporter wurde durch ATA stimuliert (Kekuda *et al.*, 1997). ATA kann auch Neurone vor der Exzitotoxizität durch Glutamat schützen, indem es NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptoren blockiert (Zeevalk *et al.*, 1995).

Bei einer Ischämie kommt es zu einer Verminderung der Expression der GluR2- Untereinheiten von neuronalen Glutamat-Rezeptoren, wodurch diese für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durchlässiger werden (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1992). Der daraus resultierende Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen löst die apoptotische Kaskade aus, und die Zelle stirbt ab (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1997). Durch ATA kann die durch eine Ischämie induzierte Verminderung der Expression der GluR2-Untereinheiten auf der Transkriptionsebene verhindert werden, wodurch die Zahl der hippocampalen Neurone, die nach einer Ischämie absterben, vermindert werden konnte (Aronica *et al.*, 1998).

ATA kann auch eine Phosphorylierung der Tyrosinreste von Proteinen bewirken, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (Okada & Koizumi, 1995, 1997; Torres-Zamorano *et al.*, 1997). Die durch ATA bewirkte Phosphorylierung eines 27-kDa-Proteins, von dem die Autoren vermuten, dass es das Hitzeschock-Protein HSP27 ist, erhöht bei einer Zelllinie die Zahl von überlebenden Zellen (Geier *et al.*, 1997). ATA vermindert die Expression des neuronalen  $\beta$ -amyloiden Vorläuferproteins ( $\beta$ -APP), indem es die Geschwindigkeit des Abbaus der  $\beta$ -APP-mRNA steigert (Joseph *et al.*, 1993).

Die biologischen Effekte vieler Hormone und Cytokine werden durch sogenannte Jak-Tyrosinkinase und cytoplasmatische Stat-Transkriptionsfaktoren vermittelt (Ihle, 1995; Larner & Finbloom, 1995). Zu diesen Effekten gehören solche wichtigen physiologischen Vorgänge wie die Immunität, die Reproduktion, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. In Nb2-Lymphozyten, denen das zum Überleben wichtige Hormon Prolactin entzogen wurde, aktivierte ATA die Tyrosinkinase Jak2 und die nachgelagerten Transkriptionsfaktoren Stat-5a und Stat-5b, wodurch die Lymphozyten beim Entzug von Prolactin nicht abstarben (Rui *et al.*, 1998).

Umfangreiche Arbeit wurde mit ATA auch im Zusammenhang mit AIDS geleistet, als erkannt wurde, dass es im Stande ist, den HTLV-III-Virus zu inhibieren (Balzarini *et al.*, 1986). Später wurde festgestellt, dass ATA an die CD4-Rezeptoren von T-Zellen bindet, wodurch die für eine Verbreitung des HIV notwendige Kopplung des viralen Glycoproteins gp120 an die T-Zellen verhindert wird (Schols *et al.*, 1989).

Diese Beispiele zeigen, dass die anti-apoptotische Wirkung von ATA höchstwahrscheinlich über verschiedene Wege und Mechanismen läuft. Ihre konkrete Ausprägung wird

wahrscheinlich vom jeweiligen System und den Bedingungen abhängen. Zur Verhinderung des Absterbens von RGZ wurde ATA bislang selten eingesetzt. Die Studien außerhalb der Arbeitsgruppe Thanos bezogen sich nicht auf traumatische Läsionen des Sehnervs, sondern auf Schädigungen des Auges durch Ischämie (Lam *et al.*, 1995; Rosenbaum *et al.*, 1997) bzw. durch NMDA oder Kainat (Zeevalk *et al.*, 1993, 1995). Innerhalb der Arbeitsgruppe Thanos wurde ATA nach einer Axotomie der RGZ bei adulten Ratten eingesetzt (Heiduschka & Thanos, 2000). In allen Fällen konnte der Zelltod mit Hilfe von ATA verlangsamt werden.

#### **3.2. Eigene Arbeiten mit Aurintricarboxylsäure**

Um Effekte von pharmakologischen Interventionen auf das Überleben von axotomierten RGZ untersuchen zu können, muss zuerst bekannt sein, wie viele RGZ einer normalen Retina durch die in diesen Versuchen benutzte Färbetechnik mit 4Di-10ASP gefärbt werden. Zu diesem Zweck wurde bei einer Versuchsgruppe (n = 9) der linke Sehnerv durchtrennt und wie schon weiter oben im Text ausführlich beschrieben, der Farbstoff appliziert. Da das Absterben der RGZ erst vier bis fünf Tage post Axotomie spürbar einsetzt, der Farbstoff jedoch bereits innerhalb von drei bis vier Tagen retrograd in die Zellkörper der RGZ transportiert wird, kann die nach dreieinhalb bis vier Tagen post Axotomie und retrograder Färbung präparierte und in PFA-Lösung fixierte Retina für die Ermittlung der Kontrollwerte für den Zustand vor der Degeneration der RGZ verwendet werden. Die Tatsache, dass in diesen Präparaten keine gefärbten Mikroglia-Zellen enthalten waren, kann als ein Hinweis gewertet werden, dass noch keine meßbaren degenerativen Prozesse mit anschließender Phagozytose an den RGZ stattgefunden haben. Bei den ausgezählten Werten war eine gewisse Streuung erkennbar, jedoch waren im Schnitt  $729 \pm 164$  RGZ pro  $\text{mm}^2$  gefärbt. Dieses zeigte eine Färbequote von ca. 28% der gesamten RGZ-Population einer Retina der Ratte durch die in diesen Versuchen angewandte Färbetechnik.

Wenn die Retina erst 14 Tage post Axotomie präpariert wurde (n = 7), war bereits ein großer Teil der RGZ degeneriert und phagozytiert. Dies zeigte sich an der drastisch gesunkenen Anzahl der gefärbten RGZ innerhalb der Retina und dem damit verbundenen Anstieg der Anzahl gefärbter Mikroglia-Zellen. Dieses entspricht dem Verständnis der Mikroglia-Zellen als phagozytierende Zellen des ZNS, welche die nach einer Schädigung absterbenden Neurone relativ schnell phagozytieren. Im Vergleich zum Kontrollwert waren nur noch  $18 \pm 3\%$  der Ausgangspopulation an RGZ vorhanden. Dieses entspricht

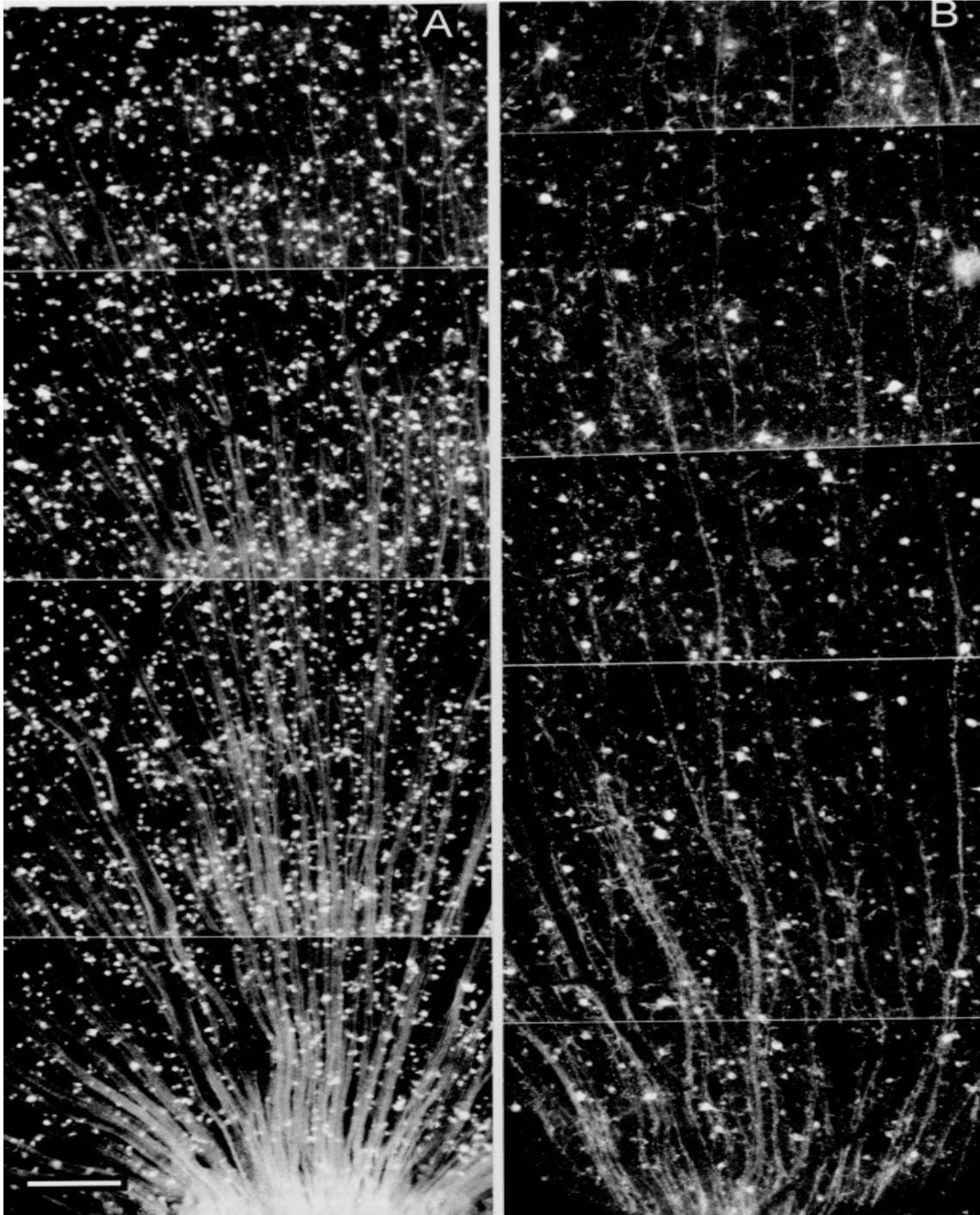
### 3. Ergebnisse

einer Anzahl von  $135 \pm 25$  RGZ pro  $\text{mm}^2$ , wobei diese einer Anzahl von  $308 \pm 60$  angefärbten MG pro  $\text{mm}^2$  gegenüberstehen.

Die so gewonnenen Erkenntnisse über die Anzahl der RGZ, die durch die Färbetechnik und den verwendeten Farbstoff angefärbt werden, bilden die Ausgangspunkte für die weiteren Versuche. Die Anzahl der maximal anfärbbaren RGZ einer normalen Retina und die zu erwartende Anzahl der überlebenden RGZ 14 Tage nach Axotomie ohne pharmakologische Intervention, bilden den Rahmen in dem die im folgenden beschriebenen Versuchen zu bewerten sind.

Die folgende Auswertung der jeweiligen Effekte beziehen sich auf die oben aufgeführte Kontrollgruppe 14 Tage nach Axotomie ohne pharmakologische Intervention.

### 3. Ergebnisse

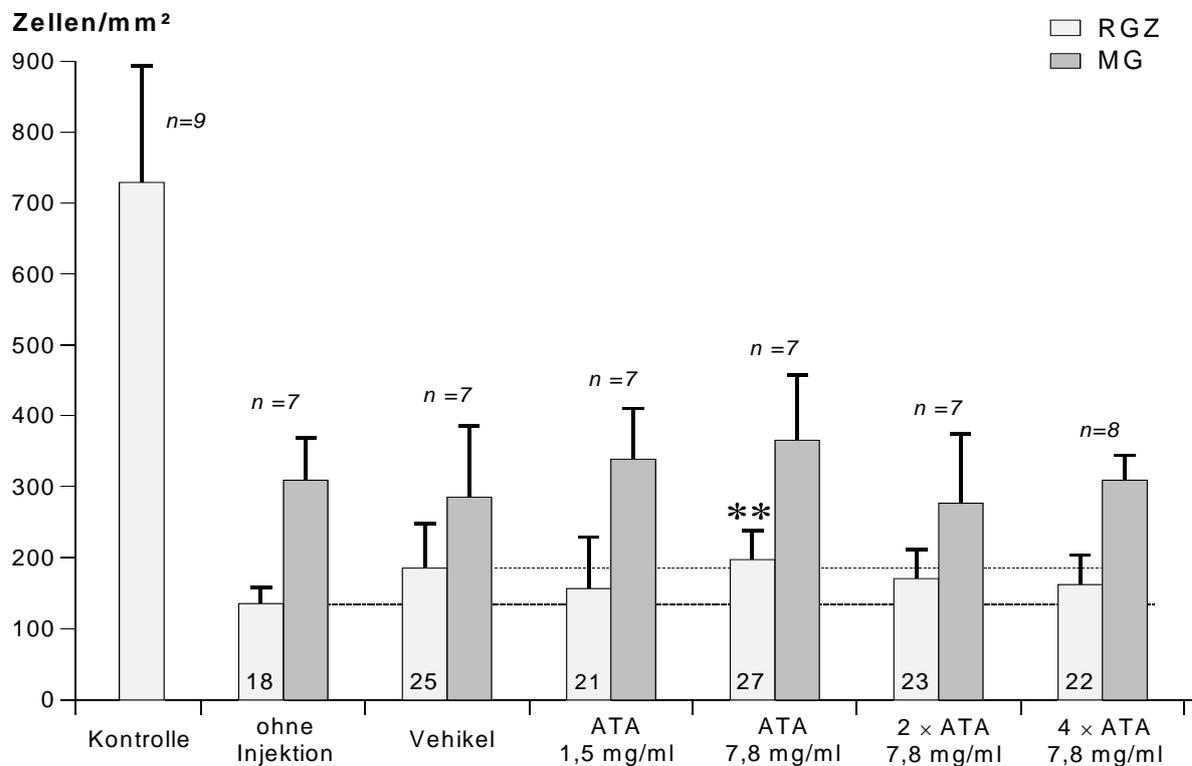


**Abb. 2:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von planaren retinalen Ganzpräparaten (Heiduschka & Thanos, 2000a). Die RGZ wurden zum Zeitpunkt der Axotomie retrograd mit 4Di-10ASP gefärbt. **A)** Die Retina wurde 4 Tage post Axotomie und retrograder Färbung präpariert. Deutlich sind die vielen RGZ und die Axonenbündel zu sehen. **B)** Die Retina wurde 14 Tage post Axotomie und retrograder Färbung präpariert. Die meisten RGZ sind verschwunden. Die kleinen filigranen Strukturen sind Mikroglia-Zellen, die während der Phagozytose der RGZ den Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen haben und nun ebenfalls sichtbar sind. Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.1. Effekte der intraperitonealen Injektion von ATA

Im folgenden Experiment wurde untersucht, welche neuroprotektiven Effekte durch eine intraperitoneale Injektion von ATA erzielt werden können. Zur Klärung dieser Frage wurden die Versuchstiere in fünf Gruppen eingeteilt und erhielten jeweils gruppenspezifische Injektionen.

In Gruppe 1 ( $n = 7$ ) wurde lediglich die Vehikel-Lösung (10 Vol% DMSO in PBS) injiziert, um festzustellen, ob sich diese auf die Anzahl der überlebenden RGZ auswirkt. Im Gegensatz zur Kontroll-Gruppe ohne eine Injektion konnte eine leichte Steigerung der Anzahl überlebender RGZ auf  $25 \pm 9\%$  erzielt werden. Dieses stellte eine Steigerung um +7% dar. Wenn Lösungen von Aurintricarboxylsäure in 10 Vol% DMSO in PBS intraperitoneal injiziert wurden, zeigte sich nach 14 Tagen in allen Gruppen ein höherer Anteil überlebender RGZ im Verhältnis zu Kontroll-Gruppe. Jedoch zeigte sich, dass diese Werte alle im Bereich der Ergebnisse der Gruppe 1 lagen, in der lediglich die Vehikel-Lösung appliziert wurde. Im Falle der Gruppe 2 (1,5 mg ATA;  $n = 7$ ) bestand mit -4% zur Vehikel-Gruppe und nur +3% zur Kontroll-Gruppe kein signifikant statistischer Unterschied zu den Referenzwerten.



**Diagramm 1:** Anzahl der 14 Tage post Axotomie überlebenden RGZ und gefärbten Mikroglia-Zellen (MG) nach verschiedenen **intraperitonealen** Injektionen. Die Zahlen in den Balken geben den prozentualen Anteil am Kontrollwert an. \*\* - signifikanter Unterschied im Vergleich zur Gruppe ohne Injektion nach dem *two-tailed Student's t-test* ( $p = 0.005$ ).

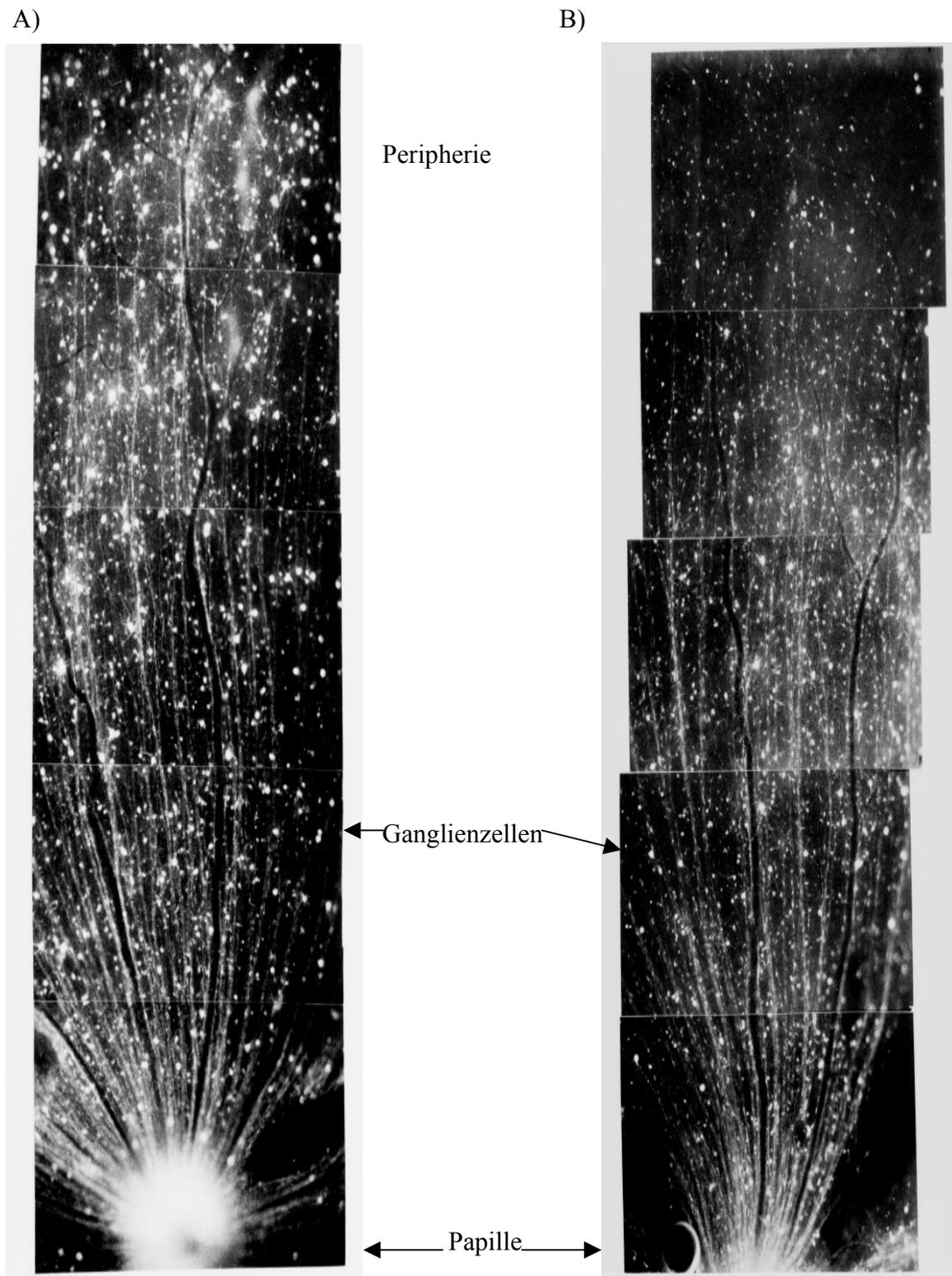
### 3. Ergebnisse

Die Erscheinungsbilder der Gruppe 4 ( $2 \times 7,5$  mg ATA;  $n = 7$ ) und der Gruppe 5 ( $4 \times 7,5$  mg ATA;  $n = 8$ ) glichen, bei geringfügig niedrigerer Anzahl überlebender RGZ, dem der Gruppe 1, bei welcher lediglich die Vehikel-Lösung injiziert wurde. Dementsprechend ließen sich auch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der durchschnittlichen Anzahl überlebender RGZ zwischen den Gruppen feststellen.

Lediglich Gruppe 3 (7,8 mg ATA;  $n = 7$ ) zeigte eine leichte Steigerung zur Vehikel-Gruppe um +2%, somit wurden im Verhältnis zur Kontroll-Gruppe 9% derjenigen RGZ gerettet, die ansonsten degeneriert wären.

Trotz des höheren Anteils überlebender RGZ in allen Gruppen 14 Tage nach Axotomie wurden im Verhältnis zur Kontroll-Gruppe keine signifikanten Unterschiede erzielt. Die festgestellten Unterschiede waren als sehr gering einzustufen und lagen lediglich in dem Bereich, der durch reine Vehikel-Lösung erzielten Ergebnisse. Aus diesem Grund stellen sie keine signifikante Erhöhung der Anzahl überlebender RGZ und die damit angestrebte Neuroprotektion dar.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von planaren retinalen Ganzpräparaten (Limberg & Heiduschka 2004) nach verschiedenen **intraperitonealen** Injektionen. **A)** Nach intraperitonealer Injektion von 2-mal 7,8 mg ATA/kg Körpergewicht. **B)** Nach intraperitonealer Injektion von 4-mal 7,8 mg ATA/kg Körpergewicht.

### **3.2.2. Effekte der intravenösen Injektion von ATA**

Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob durch eine intravenöse Injektion von ATA und dem damit verbundenen Wegfall verschiedener Resorptionsvorgänge neuroprotektive Effekte zu erzielen sind und ob diese signifikante Unterschiede zu den vorausgegangenen Versuchen aufweisen würden.

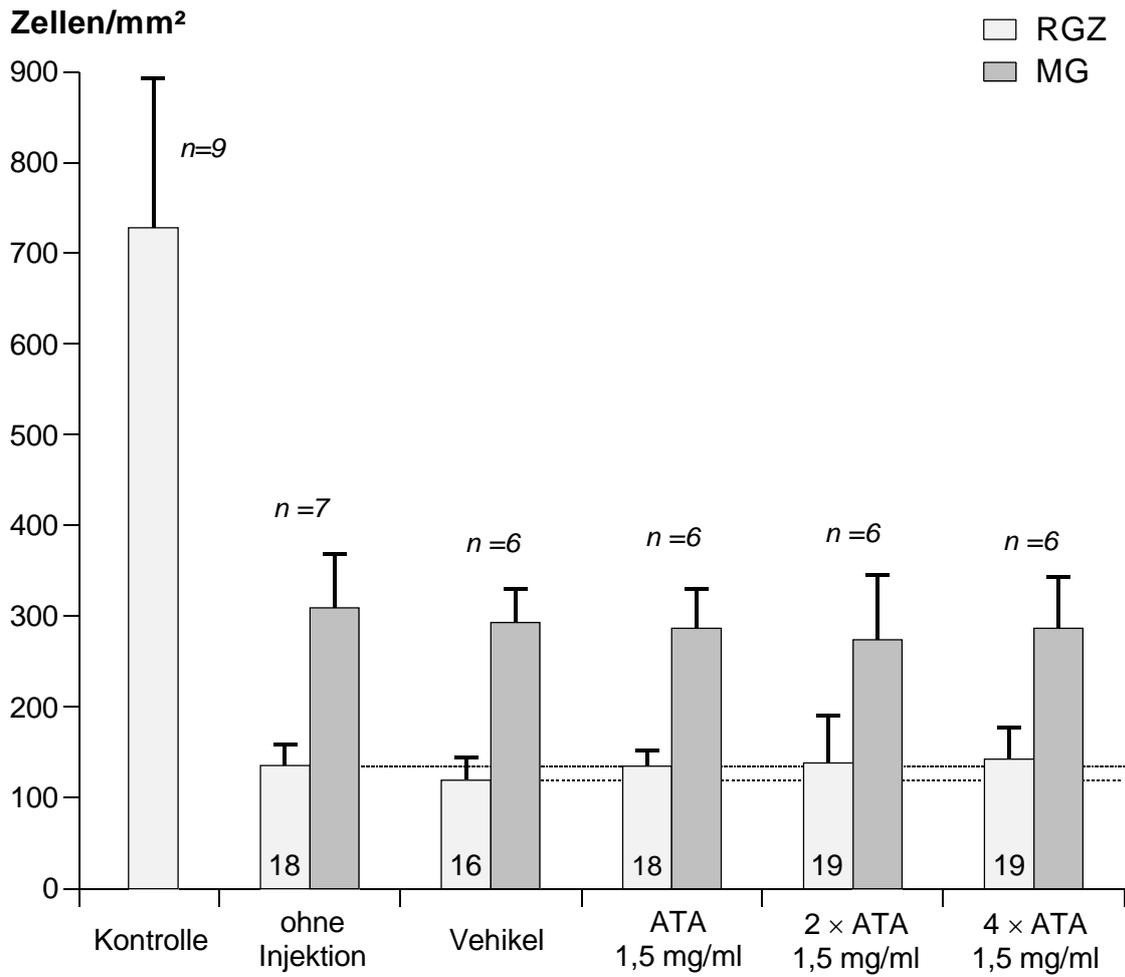
Zu diesem Zweck wurden vier Gruppen mit jeweils sechs Versuchstieren ( $n = 6$ ) zusammengestellt, die gruppenspezifische Injektionen erhielten. Als Referenzdaten wurden die schon weiter oben im Text ausführlich dargestellten Kontroll-Werte herangezogen.

In Gruppe 1 wurde die Vehikel-Lösung (10 Vol% DMSO in PBS) injiziert, um festzustellen, ob durch diese eine neuroprotektive Wirkung erzielt wird. Im Gegensatz zur Kontroll-Gruppe zeigte sich ein leichter Abfall der Anzahl überlebender RGZ auf  $16 \pm 4\%$ . Dies ist ein Rückgang von  $-2\%$  im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist überraschend, da in der Versuchsreihe mit intraperitonealer Injektion mit der reinen Vehikel-Lösung eine Erhöhung der überlebenden RGZ erzielt werden konnte.

Wenn Lösungen von ATA in 10 Vol% DMSO in PBS mehrmals intravenös injiziert wurden, zeigte sich nach 14 Tagen eine geringe Steigerung der Anzahl überlebender RGZ in den Gruppen 3 und 4. Diese minimalen Anstiege von lediglich  $+1\%$  ergaben jedoch keine signifikant höheren Werte als bei der Kontroll-Gruppe. In der 2. Versuchsgruppe, bei der die geringste Konzentration von gelöstem ATA ( $1 \times 1,5$  mg) verwendet wurde, zeigten sich dieselben Ergebnisse wie in der Kontrollgruppe. Somit konnte kein statistischer Unterschied zwischen diesen Gruppen festgestellt werden.

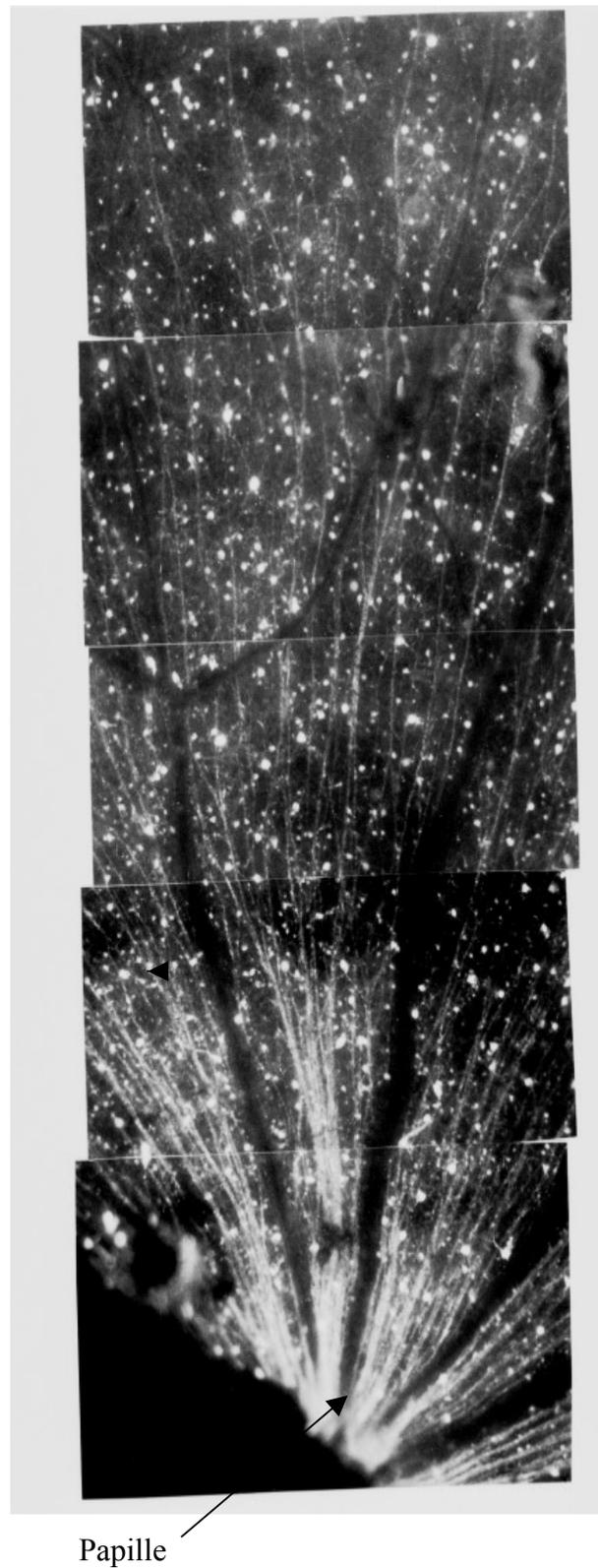
Es zeigte sich, dass auch bei intravenöser Applikation von ATA in 10 Vol% DMSO in PBS die erzielten Werte alle in den Bereichen lagen, welche keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen zeigten, die ohne pharmakologische Interventionen erhalten wurden.

### 3. Ergebnisse



**Diagramm 2:** Anzahl der 14 Tage post Axotomie überlebenden RGZ und gefärbten Mikroglia-Zellen (MG) nach verschiedenen **intravenösen** Injektionen. Die Zahlen in den Balken geben den prozentualen Anteil am Kontrollwert an.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 4:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einem planaren retinalen Ganzpräparat (Limberg & Heiduschka 2004) 14 Tage nach einer Axotomie und 2-maliger **intravenöser** Injektion einer gesättigten ATA-Lösung.

## 4. Diskussion

Bevor die Versuchsergebnisse dieser Arbeit diskutiert werden, sollen die erzielten Ergebnisse der intraperitonealen und intravenösen Injektion von ATA nochmals zusammenfassend aufgeführt werden:

1. Trotz des höheren Anteils überlebender RGZ durch eine intraperitoneale Injektion von ATA, wurden im Verhältnis zur Kontroll-Gruppe keine signifikanten Unterschiede erzielt. Die in den Versuchen erzielten geringen Unterschiede liegen lediglich im Bereich der durch reine Vehikel-Lösung erzielten Ergebnisse und stellen somit keine signifikante Erhöhung der Anzahl überlebender RGZ dar.
2. Es zeigte sich, dass auch die bei intravenöser Applikation von ATA erzielten Werte keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen zeigten, die ohne pharmakologische Interventionen erhalten wurden.

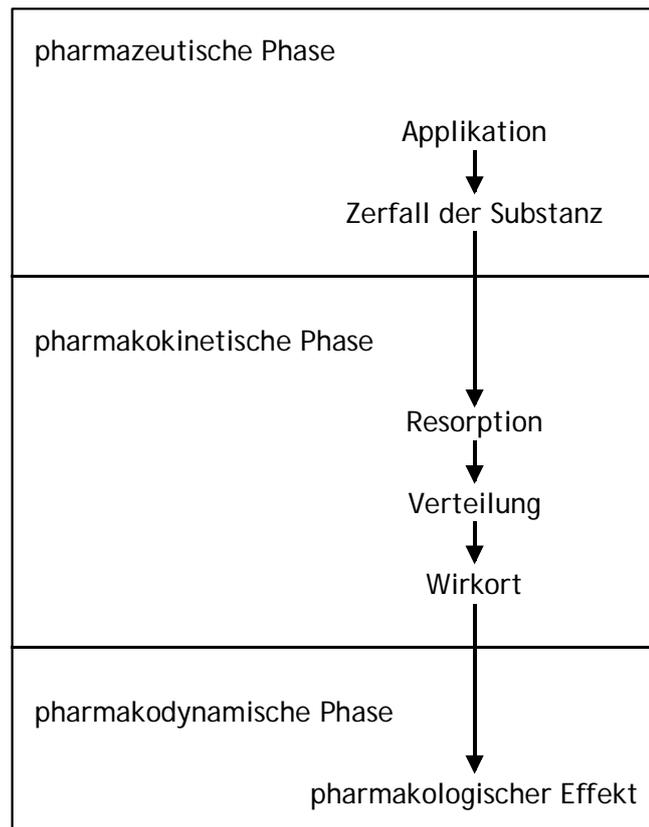
In den folgenden Kapiteln soll nun näher auf die Pharmakokinetik bei systemischer Applikation von Substanzen eingegangen werden, um zum einen eine geeignete Grundlage für die stattfindende Diskussion der Versuchsergebnisse zu schaffen, und zum anderen, um den Vergleich mit der lokalen Applikation von Substanzen zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit ist nur eine vereinfachte Darstellung der Pharmakokinetik im Bezug auf die durchgeführten Versuche möglich, da der Umfang dieses Gebietes sonst das Volumen dieser Arbeit überschreiten würde. Um spezielle Fragen und Detailaspekte zu klären, wird an dieser Stelle auf weiterführende Fachliteratur der Pharmakologie verwiesen (Mutschler Arzneimittelwirkung; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie / Pharmakologie und Toxikologie; Oberdisse, Hackenthal, Kuschinsky).

### 4.1. Allgemeine Pharmakokinetik bei systemischer Applikation von Substanzen

Als Applikation bezeichnet man das Verabreichen von Pharmaka auf Haut und Schleimhäute bzw. die Gabe direkt in das Körperinnere. Sie ist damit der erste Schritt einer Kette von Ereignissen, an deren Ende die Wirkung steht. Eine allgemeinen Übersicht dieser ablaufenden Kette ist in der untenstehenden Abbildung 7 zu sehen.

Pharmaka können lokal oder systemisch appliziert werden. Bei der **lokalen Applikation**, die nur bei wenigen Erkrankungen möglich ist, wird der Wirkstoff direkt an das erkrankte

Gebiet herangebracht. Der Vorteil dieser Applikationsweise liegt darin, dass der Applikationsort in der Nähe des Wirkortes liegt und somit nur eine kurze Penetrations- oder Diffusionsstrecke zu überwinden ist. Die applizierten Mengen können deshalb auch geringer als bei der systemischen Gabe sein, weil die Substanz nicht im Organismus „verdünnt“ wird. Naturgemäß sind bei dieser Applikationsweise systemische Nebenwirkungen seltener. Die **systemische Applikation** kann sowohl direkt in den Blutkreislauf, als auch an extravasale Orte mit nachfolgenden Resorptionsprozessen erfolgen. Soll der Wirkungseintritt rasch erfolgen, muss eine Applikationsart gewählt werden, bei der durch den



**Abb. 5:** Im Organismus ablaufende Vorgänge nach Gabe eines Arzneimittels  
Ernst Mutschler-Arzneimittelwirkungen  
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie  
(6. Auflage - S.4) Modifizierte Darstellung

Wegfall der Resorption die Latenz zwischen Applikation und Wirkungseintritt kurz ist. Dies ist bei intravasalen Injektionen der Fall. Der Wirkstoff kann dabei intraarteriell (i.a.) oder intravenös (i.v.) injiziert werden, wobei die Methode der intravenösen Applikation häufiger Anwendung findet. Bei intravasalen Injektionen kann der Wirkstoff exakt dosiert werden und dessen Bioverfügbarkeit beträgt in der Regel 100%. Durch die rasche Verdünnung im Blut und dessen große Pufferkapazität sind die Anforderungen an die Injektionslösung bezüglich Isotonie (molare Konzentration) und Isohydrie (pH-Wert) geringer als bei subkutanen Injektionen. Nachteilig sind im Vergleich zu anderen Applikationsweisen das erhöhte Risiko einer zu hohen Wirkstoffkonzentration am Wirkort bei zu rascher Injektion, einer Hämolyse nach Injektion konzentrierter Lösungen und das Risiko einer Verschleppung von Keimen.

Wird dagegen eine protrahierte Wirkung angestrebt, kommen solche Applikationsweisen in Betracht, bei denen der Wirkstoff erst nach seiner Resorption wirksam wird. Die häufigste Applikationsweise ist die *orale Gabe*. Auf diese Art der Applikation wird allerdings in dieser Schrift nicht näher eingegangen, da sie keine Anwendung in den Versuchen

find. In dieser Arbeit wurde die intraperitoneale Injektion angewendet. Bei dieser Applikationsart wird der Wirkstoff durch das Bauchfell hindurch in die Bauchhöhle des Tieres appliziert. Es sind bei dieser Form der Applikation einige Gesichtspunkte zu beachten. Stark reizende oder zu Nekrosen führende Substanzen dürfen nicht intraperitoneal appliziert werden. Ebenso muss bei dieser Applikationsweise darauf geachtet werden, dass Isohydrie und Isotonie der Injektionslösung gewahrt werden und weitgehend den physiologischen Verhältnissen angepasst sind.

##### **4.1.1. Resorption**

Die Fähigkeit, aus Lipiddoppelschichten bestehende Membranen und Zellwände zu überwinden, ist eine Voraussetzung für die Resorption von Stoffen, für ihr Eindringen in Zellen und Zellorganellen und für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, sowie der Blut-Retina-Schranke. Da ein Wirkstoff nur dann wirksam werden kann, wenn dieser in entsprechender Konzentration an den Wirkort gelangt, ist eine ausreichende Resorption die Voraussetzung für einen therapeutischen Effekt, sofern der Wirkstoff nicht intravasal oder topisch appliziert wird. Die eigentliche Resorptionsbarriere, die Trennung vom äußeren und inneren Milieu, ist die Oberflächenmembran der Zellen.

Die Zellmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen, die sowohl die gesamte Membran als wassergefüllte Poren durchspannen, als auch in der Innen- bzw. Außenschicht der Membran liegen können und mosaikartig in der mehr oder weniger flüssigen Lipidphase schwimmen (sog. Liquid-Mosaik-Modell, vorgeschlagen von Lenard und Singer). Beide Lipidschichten bestehen aus Phospholipiden und Cholesterin. Die polaren Enden der Phospholipide zeigen zur Außen- bzw. Innenseite der Membran, während die unpolaren Anteile in das Innere der Membran gerichtet sind. Auf der Außenseite können zusätzliche Protein- und Kohlenhydratanteile assoziiert sein.

Umgeben ist die Lipidmembran von einer Hydrathülle, die eine Diffusionsbarriere für sehr lipophile Stoffe darstellen kann.

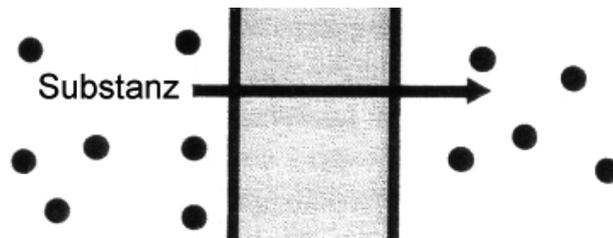
Die Zelle ist nicht als ein statisches Gebilde anzusehen, vielmehr stehen die verschiedenen Räume in der Zelle und die Zelle selbst in ständigem Stoffaustausch mit ihrer Umgebung. Die Strukturen der Zelle befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht und bilden somit die Grundlage für Interaktionen mit anderen Zellen und der Umgebung.

#### 4. Diskussion

Ein Wirkstoff muss somit die Fähigkeit besitzen, diese Membranbarrieren zu überwinden, um zum Wirkort selbst zu gelangen. Zudem soll er auf dem Weg dorthin seine Eigenschaften nicht verändern. Ein Wirkstoff kann auf verschiedene Weise durch die Membran hindurchtreten.

#### Diffusion

Lipophile Stoffe besitzen die Fähigkeit, aus dem Extrazellulärraum in die Membran einzudringen. Sie können dort angereichert werden und von dort aus die Membran in Richtung Zytosol wieder verlassen. Die Richtung und die Geschwindigkeit des Durchtritts hängen von den Konzentrationsverhältnissen in

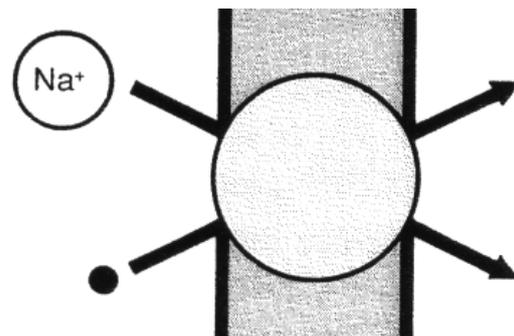


**Abb. 6:** Substanzdurchtritt durch Membranen  
Ernst Mutschler-Arzneimittelwirkungen  
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie  
(6. Auflage - S.8) Modifizierte Darstellung

den Flüssigkeitsräumen und in der Membran ab. Je größer der Konzentrationsunterschied (Gradient) ist, umso größer ist die in der Zeiteinheit diffundierende Wirkstoffmenge (Ficksches Gesetz). Für hydrophile Stoffe stellt die bimolekulare Lipidmembran ein unüberwindbares Hindernis dar.

#### Transport

Unabhängig von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften können Wirkstoffe mit Hilfe von Transportsystemen Membranbarrieren überwinden. Die Voraussetzung dafür ist, dass der zu transportierende Stoff eine Affinität zu einem Transportsystem aufweist und an dieses gebunden durch die Membran geschleust werden kann. *Aktiver Transport* geschieht unter Energieverbrauch entgegen einem Konzentrationsgefälle. Beim *erleichterten*



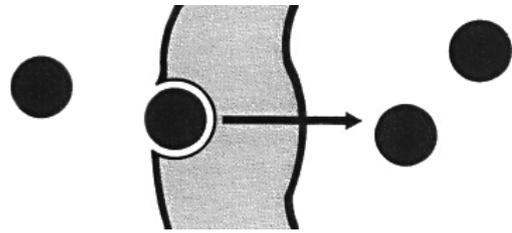
**Abb. 7:** Substanzdurchtritt durch Membranen  
Ernst Mutschler-Arzneimittelwirkungen  
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie  
(6. Auflage - S.8) Modifizierte Darstellung

*Transport* erfolgt der Transport nicht gegen, sondern mit einem Konzentrationsgefälle ohne Energieverbrauch. Der Membrandurchtritt *via* Transportsystem kann durch einen zweiten Stoff, der ebenfalls Affinität zum Transportsystem aufweist, kompetitiv gehemmt werden. Bei mangelhafter Affinität eines Stoffes erfolgt kein Transport. Affinität haben

#### 4. Diskussion

nur solche Stoffe, die Ähnlichkeiten mit dem physiologischen Substrat des Transportsystems aufweisen.

**Phagozytose und Pinozytose** sind endozytische Vorgänge, bei denen sich die Plasmamembran einbuchtet und ungelöste Partikel (Phagozytose) oder Flüssigkeiten mit gelösten Partikeln (Pinozytose) durch die Bildung von Vesikeln umschließt und ins Zellinnere aufnimmt. Die von einer Membran umschlossenen Bläschen können ihren Inhalt in der Zelle mit Hilfe von Lysosomen freisetzen. Eine Besonderheit ist die sog. **rezeptorvermittelte Endozytose**, bei der Substanzen sehr selektiv in die Zelle aufgenommen werden.



**Abb. 8:** Substanzdurchtritt durch Membranen  
Ernst Mutschler-Arzneimittelwirkungen  
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie  
(6. Auflage - S.8) Modifizierte Darstellung

Die Resorption vieler Wirkstoffe erfolgt passiv durch Diffusion. Resorptionsgeschwindigkeit und Resorptionsquote (Verhältnis von resorbiertem Anteil zu applizierter Menge) hängen von unterschiedlichen Faktoren ab. Als wichtigste sind hier zu nennen:

- die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs und dessen Löslichkeit,
- die verwendeten Hilfsstoffe,
- die Dosierung,
- die Art der Applikation und den Ort der Applikation, und
- der pH-Wert im Bereich der resorbierenden Areale.

Um resorbiert werden zu können, muss der Wirkstoff in gelöster Form vorliegen. In der Regel bestimmt die Geschwindigkeit mit der sich der Wirkstoff auflöst, auch die Resorptionsgeschwindigkeit. Diese wird zudem auch noch von den Substanzeigenschaften, wie z.B. Teilchengröße, Kristallform und von den Eigenschaften der Arzneiform (verwendete Hilfsstoffe) bestimmt.

Je nach Art der erforderlichen Wirkung kann versucht werden die Resorption zu steigern, zu verringern, zu beschleunigen oder zu verzögern. Eine möglichst quantitative Resorption sollte bei Wirkstoffen erzielt werden, die eine systemische Wirkung entfalten sollen.

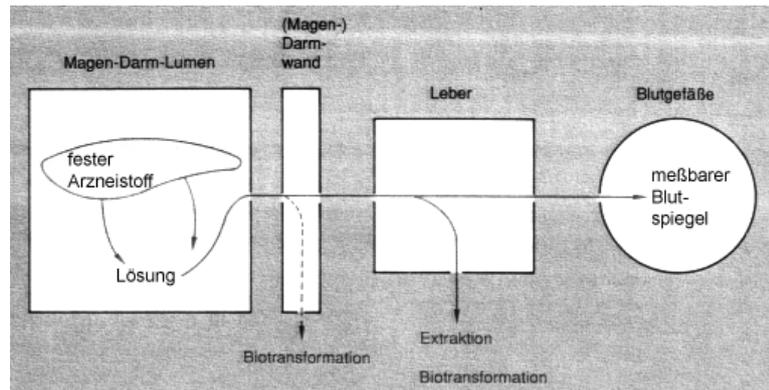
#### 4. Diskussion

Dagegen wird eine Resorptionsverzögerung bei den Wirkstoffen angestrebt, die durch eine langsame Wirkstoff-Freisetzung aus einem Substanzdepot eine anhaltende Wirkung erzielen sollen.

##### 4.1.2. First-pass-Effekt

Die Leber, das Hauptorgan für den Arzneimittelstoffwechsel, erhält beim Menschen pro Minute 1100 ml Blut über die Portalvene und weitere 350 ml über die Leberarterie.

Infolge der Aufweitung des Strömungsquerschnitts wird der Blutfluss in der Leber verlangsamt. Das Endothel ermöglicht einen ungewöhnlich engen Kontakt und intensiven Stoffaustausch zwischen Blut und Leberparenchymzellen, was zusätzlich durch Mikrovilli an der dem Disse-Raum



**Abb. 9:** First-pass-Effekt in schematischer Darstellung  
Ernst Mutschler-Arzneimittelwirkungen  
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie  
(6. Auflage - S.26)

zugewandten Oberfläche der Leberzellen begünstigt wird. Darüber hinaus erlaubt es die spezielle Endothel der Leber-Sinus selbst Proteinen, die Blutbahn rasch zu verlassen. Das gesamte venöse Blut des Magen-Darm-Kanals und damit auch alle darin enthaltenen Substanzen gelangen in die *Pfortader* und durch diese in die Leber. Zur besseren Veranschaulichung kann die nebenstehende Darstellung herangezogen werden. Bevor also ein durch die Magen- oder Dünndarmschleimhaut resorbiertes oder in die Bauchhöhle injiziertes Pharmakon das Herz und von dort aus den Lungen- und Körperkreislauf erreicht, muss es die Leber passieren. Für die Wirksamkeit eines Pharmakons ist es von ausschlaggebender Bedeutung, ob und in welchem Umfang es durch die Leber extrahiert und/oder biochemisch umgewandelt wird. Man spricht in diesem Zusammenhang vom sog. *First-pass-Effekt*. Dieser charakterisiert den Anteil eines Stoffes, der bei dieser Passage durch die Leber metabolisiert und/oder zurückgehalten wird.

##### 4.1.3. Verteilung

Nach der Resorption verteilt sich eine Substanz aufgrund von Konzentrationsunterschieden entsprechend ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften und den gegebenen Besonder-

heiten des Biosystems (Durchblutung, Endothelbeschaffenheit der Gefäße usw.) im Organismus. Die Substanzmoleküle werden mit dem Blut in die Kapillaren transportiert, diffundieren von dort durch die Gefäßwand in den interstitiellen Raum und gelangen schließlich an die Oberfläche der Zellmembran. Von dort können sie durch die weiter oben im Text schon beschriebenen Mechanismen in die Zellen eindringen und in der Zelle ihren Wirkort erreichen, oder bereits an der Membran selbst ihre Wirkung zeigen.

##### **4.1.3.1. Verteilungsräume**

Substanzen können sich in drei unterschiedlich große Flüssigkeitsräume verteilen.

##### **Intravasalraum (Plasmawasser)**

Hier verteilen sich Substanzen, die wegen ihrer Molekülgröße nicht aus dem Gefäßsystem austreten können. Niedermolekulare lipophile und polare Substanzen sind jedoch frei permeabel, sofern sie nicht an Plasmaproteine gebunden sind.

##### **Extrazellulärraum**

Dieses Kompartiment setzt sich aus mehreren Verteilungsräumen zusammen:

- Plasmawasser
- leicht diffusible interstitielle Flüssigkeit
- schwer diffusible interstitielle Flüssigkeit (dichtes Bindegewebes der Haut,
- Muskulatur, Knochen und Knorpel
- transzelluläre Flüssigkeit (Flüssigkeit im Bauchraum und anderen Hohlräumen, Kammerwasser der Augen, Liquor cerebrospinalis, Endo-und Perilymphe)

Zwischen dem Plasmawasser und der leicht diffusiblen interstitiellen Flüssigkeit stellt sich schnell ein Gleichgewicht ein. In ihnen verteilen sich Substanzen, die zwar das Kapillarbett verlassen können, jedoch aufgrund ihrer Hydrophilie die Lipidmembran der Zellen nicht durchdringen können. Der transzelluläre Raum nimmt eine gesonderte Stellung ein, da dort häufig nur ein begrenzter Stoffaustausch möglich ist, weil wirkungsvolle Barrieren die Penetration erschweren oder unmöglich machen. Als Beispiel ist die Blut-Hirn-Schranke zu nennen, die weiter unten im Text näher beschrieben wird.

### **Gesamtkörperwasser**

Dieser Verteilungsraum umfasst extrazelluläre und intrazelluläre Flüssigkeiten und weist im hohen Maße Alters- und Geschlechtsunterschiede auf. Stoffe die Lipidmembranen durchdringen können, wasserlöslich sind und keine Affinität zu anderen Strukturen zeigen, verteilen sich im Gesamtkörperwasser.

#### **4.1.3.2. Verteilungsbestimmende Faktoren**

Da der Wirkstoff zunächst auf dem Blutweg verteilt wird, ist seine Verteilung im Organismus von der Durchblutung der einzelnen Organe und Areale des Körpers abhängig. In Organen mit großer Durchblutung, wie z.B. Gehirn, Niere und Leber, stellt sich schneller ein Gleichgewicht ein als in weniger stark durchbluteten Arealen, wie Fettgewebe, Muskulatur und Haut.

Der Wirkstoff erreicht mit dem Blut die Kapillaren in den Endstrombahnen des Körpers und muss nun, um ins umliegende Kompartiment zu gelangen, die Endothelwand passieren. Hier limitiert die Molekülgröße des Wirkstoffes die Passage durch die Endothelwand. Da die Kapillaren jedoch über große Poren (8 nm) verfügen, die für fast alle Substanzen durchgängig sind, verbleiben lediglich Substanzen mit einer Molekülgröße von über 8 nm in den Gefäßen.

Bei der Aufnahme des Wirkstoffes in das Zellinnere muss dieser die Lipiddoppelschicht der Zellmembran mit Hilfe derer Transportmechanismen passieren. Hier sind Lipophilie, Hydrophilie und Grad der Dissoziation des Wirkstoffes verteilungsbestimmende Faktoren, welche die Substanzaufnahme in die Zelle beeinflussen.

#### **4.1.3.3. Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke**

Hinsichtlich der Verteilung von Molekülen aus dem Blut, nehmen das Gehirn und der umgebende Liquorraum eine Sonderstellung ein, da zwischen Blut und Gehirn bzw. Blut und Liquor nur begrenzte Stofftransporte möglich sind.

Der Aufbau der Hirnkapillaren erklärt die wirkungsvolle Barriere der Blut-Hirn-Schranke. Während in anderen Organen das Gefäßendothel größere Poren bzw. Fenestrae ausbildet, sind die Gehirnkapillaren durch eine kontinuierliche Endothelschicht begrenzt. Zusätzlich sind die Membranen der Zellen durch *Zonulae occludentes* („tight junction“) fest miteinander verbunden, so dass die interzellulären Spalten verschlossen sind. Dem Endothel schließt sich eine Basalmembran an, welcher als weitere permeationshemmende Lipid-

schicht die Endfüßchen der Astroglia aufliegen. Der Stofftransport zwischen Blut und interstitieller Flüssigkeit des Gehirns kann aufgrund der „*tight junctions*“ nur durch die Endothelzellen hindurch erfolgen.

Der Übertritt von Substanzen aus dem Blut in den Liquor wird durch ein einschichtiges kubisches Epithel, das den Kapillarendothelien aufliegt und ebenfalls durch „*tight junctions*“ miteinander verbunden ist, limitiert (Blut-Liquor-Schranke). Dabei weist das Endothel der Kapillaren selbst Poren auf. Damit eine Substanz in den Liquor gelangen kann, muss diese durch das kubische Epithel hindurch, da wegen der „*tight junctions*“ kein Weg um oder zwischen den Zellen möglich ist.

Lipidlösliche Substanzen können die Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke durch einfache Diffusion überwinden. Bei hydrophilen Substanzen mit großem Molekulargewicht ist die Aufnahme ins ZNS und in den Liquor erschwert, wobei kleinere hydrophile Substanzen mit niedrigerem Molekulargewicht durch aktiven Transport aufgenommen werden können. Für Säuren und Basen spielt zusätzlich der Dissoziationsgrad im Blut eine große Rolle.

#### **4.1.3.4. Blut-Retina-Schranke**

Der retinale Blutkreislauf ist ein Endarteriensystem, und in den terminalen Versorgungsgebieten eines gesunden Auges bestehen weder Kollateralen, noch direkte Shunt-Verbindungen zwischen Arteriolen und Venolen. Das retinale Kapillarnetz stellt die einzige physiologische Verbindung zwischen zu- und abführendem System dar. Gemeinsam mit dem zirkulatorischen System des ZNS besitzt der retinale Blutkreislauf die einzigartigen Eigenschaften eines druckunabhängigen, konstanten Blutflusses (Autoregulation) und eines limitierten selektiven Austausches von Metaboliten (Blut-Retina-Schranke).

Die Durchblutung des Auges ist wesentlich höher als die anderer Organe gleicher Größe. Der arterielle Zufluss zum Auge stammt aus der *A. ophthalmica*. Die *A. ophthalmica* ist ein Ast der *A. carotis interna* und zweigt sich von dieser nach dem Eintritt in die Schädelhöhle ab. Sie verlässt die mittlere Schädelgrube durch den *Canalis opticus*, zieht durch den *Anulus tendineus communis* in die Augenmuskelpyramide hinein und liegt zunächst lateral, dann medial über dem *N. Opticus*. Dort teilt sie sich in das retinale Gefäßsystem und das ziliare Gefäßsystem auf. Das retinale Gefäßsystem besteht aus der *A. centralis retinae*, die hauptsächlich die inneren Schichten der Netzhaut versorgt; das ziliare System besteht aus einer Vielzahl von Nebenästen der *A. ophthalmica*, die hauptsächlich die Versorgung der Uvea sowie die äußeren Schichten der Retina sicher stellen.

Beide Systeme haben einen unterschiedlichen histologischen Aufbau der Gefäße.

Beim **retinalen Gefäßsystem** ist die *A. centralis retinae* der Hauptast des Versorgungssystems. Diese Arterie besitzt eine muskuläre Wand und zählt morphologisch zu den echten Arterien. Mit ihrer Aufzweigung entstehen Arteriolen die Endarterien darstellen und in der Nervenfaserschicht liegen. Die Arterien ziehen fast senkrecht in die Netzhautschichten ein und bilden mehrere Kapillarnetze. Sie reichen maximal bis an den Außenrand der inneren Körnerschicht bzw. bis zur mittleren Grenzmembran. Zur Peripherie hin nimmt die Kapillardichte deutlich ab.

Netzhautkapillaren weisen zwei besondere Zelltypen auf: Endothelzellen und Perizyten. Die Endothelzellen sind durch *Zonula occludens* fest miteinander verbunden, sie kleiden das Lumen der Kapillaren aus und bilden eine Basalmembran. Diese interzellulären Brücken verhindern den Durchfluss von Flüssigkeiten aus dem Gefäßlumen in das umliegende Gewebe. Die Perizyten liegen der Basalmembran der Endothelzellen außen auf und bilden eine zweite Basalmembran als äußere Begrenzung der Kapillaren. Die Gefäße werden zudem von *perivaskulärer Glia* aus Astrozyten und Müller-Zellen umhüllt.

Im Gegensatz zu den Netzhautkapillaren ist die Endothelauskleidung des **ziliaren Gefäßsystems** gefenstert. Eine Bewegung von Flüssigkeiten, Glukose, und Elektrolyten zwischen der Choroidea und den benachbarten Strukturen ist daher möglich und bildet die Grundlage der nutritiven Aufgabe der Choroidea für die äußere Netzhaut.

Die Barriere zwischen allgemeiner Blutzirkulation bzw. Gesamtorganismus und Augeninnerem liegt innerhalb der Uvea oder ist ihr unmittelbar benachbart. Es werden zwei Barriere-Abschnitte unterschieden. Zum einen liegt eine Barriere als **Blut-Kammerwasser-Schranke** vor, bei der die Barrierefähigkeit durch die nicht-gefensterte Endothelauskleidung der Irisgefäße und die *Zonulae occludentes* des nichtpigmentierten Ziliarepithels entsteht und die Nutrition des vorderen Augenabschnitts betrifft. Zum anderen besteht eine Barriere zwischen Blut und Retina. Die Retina reicht vom Sehnervenkopf bis zur *Ora serrata*. Nur an diesen beiden Stellen ist sie fest mit der Unterlage verbunden. Ansonsten tritt die Außenfläche der sensorischen Netzhaut nur lose mit dem retinalen Pigmentepithel in Kontakt. Die **Blut-Retina-Schranke** entsteht durch das nicht gefensterte Endothel der Netzhautgefäße und durch die Verhoeff-Membran des retinalen Pigmentepithels. Die apikalen Kanten der Pigmentepithelzellen grenzen hier die sensorische Netzhaut von der Aderhaut ab. Die Blut-Retina-Schranke weist im Bereich der Papille einen

physiologischen Defekt auf. Dieser stellt die Ernährung des Papillengewebes auch bei extrem hohen intraokularen Druckwerten durch Diffusion vorübergehend sicher, wenn eine vaskuläre Versorgung durch ortsständige Kapillaren nicht mehr gewährleistet ist. Hierbei gelangen Nährstoffe aus dem juxtapapillären Raum der Choroidea, unter Umgehung der Verhoeff-Membran, direkt durch das Elschnig- und Jacoby-Gewebe in das prälaminaire Papillengewebe.

Eine spezielle Darstellung über die Mikrovaskularisation des Rattenauges gibt die Studie von Sugiyama *et al.* (1999).

#### **4.1.4. Dosis-Wirkungs-Beziehung**

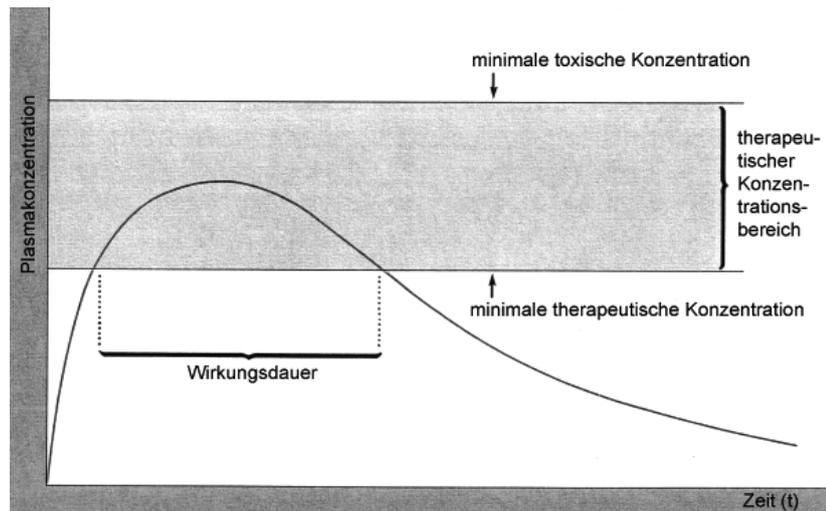
Die Wirkung einer Substanz hängt von der applizierten Menge, der Dosis, ab. Wird eine Dosis gewählt die nicht ausreicht, um die für die Wirkung nötige Schwellenkonzentration zu überschreiten (unterschwellige Dosierung), bleibt die Wirkung aus. In Abhängigkeit von der Art des zu erreichenden Effekts wird durch eine Steigerung der Dosis eine zunehmend stärkere Wirkung erkennbar sein und es kann eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bestimmt werden. Zusätzlich ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung vom Dosierungsintervall abhängig. Die Dosierung kann in einer einmaligen Applikation des Wirkstoffs oder in einer mehrfachen Applikation mit vorgegebenem Dosierungsintervall vollzogen werden.

Der charakteristische phasenhafte Zeitverlauf der Konzentration im Plasma setzt sich aus den Teilprozessen Invasion, Verteilung und Elimination zusammen, wobei sich die einzelnen Teilprozesse zeitlich überlappen. Dieses lässt sich mit der sog. Bateman-Funktion mathematisch beschreiben (siehe zu dieser Thematik weiterführende Literatur der Pharmakokinetik: Mutschler Arzneimittelwirkung; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie / Pharmakologie und Toxikologie; Oberdisse, Hackenthal, Kuschinsky).

Durch eine intravenöse Injektion reichert sich der Wirkstoff schnell im Blut an (Invasion). Mit dem Blut erreicht der Wirkstoff einzelne Organe (Verteilung) und kann bei entsprechenden Eigenschaften auch von diesen aufgenommen werden, wobei die gut durchbluteten Gewebe (z.B. das Gehirn) einen im Vergleich zu den weniger gut durchbluteten Geweben einen größeren Anteil erhalten. Die Aufnahme in das Gewebe lässt die Konzentration im Blut sinken. Der Abstrom von Wirkstoff in das Lebergewebe und in die Nieren bedeutet seinen Eintritt in die Eliminationsorgane. Wenn nach intravenöser Zufuhr einer Substanz die Verteilung im Körper deutlich schneller erfolgt als die Elimination, stellt sich dieses in einem anfänglich raschen und dann stark verlangsamten Abfall des Plasmaspiegels dar. Die schnelle Komponente des Abfalls wird als  $\alpha$ -Phase (Verteilungsphase)

und die langsame Komponente als  $\beta$ -Phase (Eliminationsphase) bezeichnet.

Die Geschwindigkeit der Invasion hängt von der Applikationsart ab. Je rascher die Invasion erfolgt, desto kürzer ist die Zeit ( $t_{\max}$ ), die bis zum Erreichen des Plasmaspiegelmaximums ( $c_{\max}$ ) vergeht, desto höher ist  $c_{\max}$ , und desto früher beginnt der Plasmaspiegel wieder zu fallen. Dieses spiegelt



**Abb. 10:**Plasmakonzentrationsverlauf einer einmaligen Wirkstoffapplikation  
Ernst Mutschler-Arzneimittelwirkungen  
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie  
(6. Auflage - S.36)

den kinetischen Verlauf einer einmaligen intravenösen Injektion wider. Wird der Wirkstoff in einer bestimmten Dosis über einen gewissen Zeitraum in bestimmten Zeitabständen zugeführt, hängen Verlauf und Höhe des Plasmaspiegels vom Verhältnis zwischen der Halbwertszeit der Elimination und der Dauer des Applikationsintervalls ab. Wenn die mit einer Dosis zugeführte Menge vollständig ausgeschieden ist bevor die neue Dosis injiziert wird, ergeben sich bei wiederholter Injektion in regelmäßigen Zeitabständen immer wieder gleiche Plasmaspiegel. Erfolgt eine Injektion, bevor die mit der vorausgegangenen Dosis zugeführte Menge vollkommen ausgeschieden ist, addiert sich diese Folgeinjektion zu dem Rest, der von der vorausgegangenen Dosis noch im Körper vorhanden ist. Dieses nennt man Kumulation des Wirkstoffes. Je kürzer das Applikationsintervall im Vergleich zur Eliminationshalbwertszeit gewählt wird, um so größer ist die verbliebene Restkonzentration, zu der sich am Ende des Applikationsintervalls die neue Dosis addiert, desto stärker kumuliert der Wirkstoff im Körper. Diese Wirkstoffkumulation steigert sich bei gegebenem Applikationsintervall jedoch nicht grenzenlos, es stellt sich vielmehr bei einer gewissen Konzentration ein Kumulationsgleichgewicht („*steady state*“) ein. Dies beruht auf der Konzentrationsabhängigkeit der Eliminationsprozesse. Je höher die Konzentration ansteigt, umso größer wird die Menge des pro Zeiteinheit eliminierten Wirkstoffes. Nach mehreren Dosen ist die Konzentration auf einen Wert geklettert, bei dem die pro Zeiteinheit eliminierte Menge der pro Zeiteinheit zugeführten Menge entspricht.

In diesem Fall ist das Kumulationsgleichgewicht erreicht. Auf diesem Konzentrationsniveau spielen sich bei einer Fortsetzung der regelmäßigen Einnahme die Plasmaspiegelschwankungen ab.

Die beschriebenen Mechanismen der Pharmakokinetik in den vorausgegangenen Abschnitten sollen den Rahmen abstecken, in dem die durchgeführten Versuche stattfanden. Auf dieser allgemeinen Grundlage sollen nun die eigenen Arbeiten mit Aurintricarboxylsäure (ATA) und die erzielten Ergebnisse diskutiert werden.

#### **4.2. Farbstoff**

Der in den Versuchen verwendete lipophile Farbstoff 4Di-10Asp hat sich schon in früheren Arbeiten nach seiner Applikation an dem durchtrennten Sehnervstumpf als ein zuverlässiger Fluoreszenzmarker für RGZ erwiesen. Grundsätzlich kann man zu diesem Zweck verschiedene Stoffe aus der Gruppe der Carbocyanine, Stilbene, oder der Cyanate verwenden (Thanos *et al.*, 1994). Aus den bisherigen Erfahrungen hat sich allerdings 4Di-10Asp als der geeignetste Farbstoff herausgestellt. Im Gegensatz zu wasserlöslichen Fluoreszenzmarkern wie Fluorogold diffundieren seine Farbstoffmoleküle nicht aus den Neuronen in die extrazelluläre Umgebung, wodurch eine spezifische und langlebige Markierung von RGZ und im Falle ihrer Degeneration von phagozytierenden Mikrogliazellen innerhalb der Retina garantiert wird. Obwohl somit nach einer Schädigung des Sehnervs zwei gefärbte Zellpopulationen in der Retina vorliegen, lassen sich beide Zelltypen aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie und Art und Weise der intrazellulären Farbstoffverteilung sicher voneinander unterscheiden. Nachteilig an der Applikation des 4Di-10Asp am durchtrennten Sehnervstumpf ist zum einen, dass sich auf diese Weise nur ca. ein Drittel der RGZ einer Retina anfärben lässt und zum anderen, dass diese Methode eine komplette Axotomie aller Projektionsneurone voraussetzt (Mey and Thanos, 1993). Dennoch lässt sich bei standardisierter Versuchsdurchführung der Anteil überlebender RGZ quantifizieren. Die für die Färbung notwendige Durchtrennung des Sehnervs stellt ebenfalls kein Hindernis dar, da diese Läsion ohnehin Bestandteil des Versuchsprotokolls ist.

#### **4.3. Vehikel-Lösung**

In der Versuchsreihe, in der die intraperitoneale Injektion angewendet wurde (Kapitel 3.2.1. Effekte der intraperitonealen Injektion von ATA), zeigte sich in Gruppe 1 (n = 7), in der lediglich die Vehikel-Lösung (10 Vol% DMSO in PBS) injiziert wurde, ein erstaun-

licher neuroprotektiver Effekt. Im Gegensatz zur Kontroll-Gruppe konnte eine leichte Steigerung der Anzahl überlebender RGZ auf  $25 \pm 9\%$  erzielt werden, was eine Steigerung der Anzahl überlebender RGZ um  $+7\%$  bedeutet. Dieses Ergebnis zeigt gewisse neuroprotektive Effekte des DMSO bei intraperitonealer Injektion. Es wurde bereits diskutiert, dass die Ursache dieser Wirkung in der Eigenschaft des DMSO gesehen wird, freie Radikale abzufangen (Shimizu *et al.*, 1997; Philis *et al.*, 1998), oder dass die Möglichkeit einer Beeinflussung von Membranen und/oder Ionenkanälen, z.B. Natriumkanälen (Hülsmann *et al.*, 1999) besteht. Ebenfalls diskutieren Hülsmann *et al.* (1999) eine mögliche Hemmung synaptischer Aktivität und somit eine Verringerung des Energieverbrauches der betreffenden Neurone, sowie eine erhöhte Produktion von ATP, was ebenfalls zum beobachteten neuroprotektiven Effekt des DMSO beitragen könnte.

Es ist jedoch nicht bekannt, warum keinerlei neuroprotektive Effekte bei intravenöser Injektion der reinen Vehikel-Lösung erzielt wurden. Gründe können hier zum einen in einer schnelleren Ausscheidung des DMSO vermutet werden. Nach der Injektion sinkt die DMSO-Konzentration sehr schnell ab, da das DMSO im Blut stark verdünnt wird. Durch den Blutfluss kommt es zu einem Abstrom von Wirkstoff in das Lebergewebe und in die Nieren. Dieses bedeutet den Eintritt der Substanz in die Eliminationsorgane und die damit verbundene Ausscheidung.

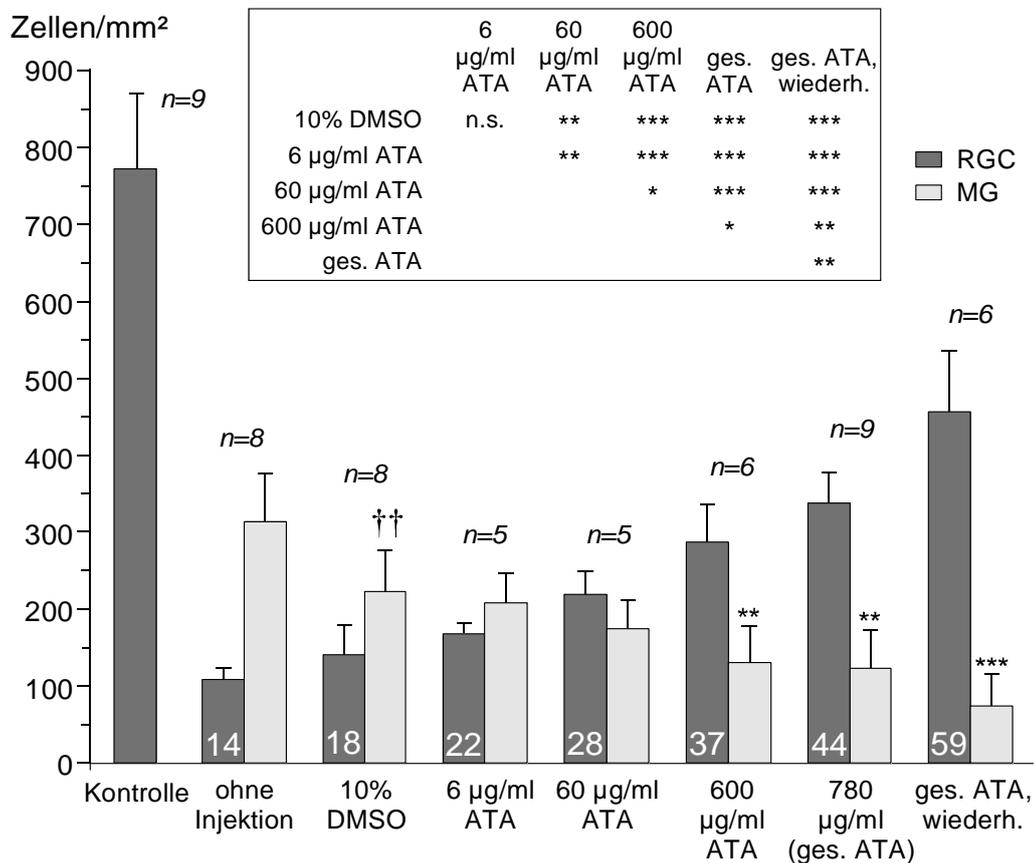
Zum anderen kann bei intraperitonealen Injektion eine Substanzmodulation durch den First-pass-Effekt stattfinden. Diese kann zum Beispiel eine effektivere Substanzaufnahme des modulierten Stoffes in die RGZ zur Folge haben und damit einen neuroprotektiven Effekt auf die RGZ ausüben.

#### **4.4. Vergleich zwischen systemischer und lokaler Applikation von ATA**

Die in unseren Versuchen erzielten Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen vorausgegangener Versuche, in denen Lösungen von Aurintricarboxylsäure (ATA) in 10 Vol% DMSO in PBS lokal ins Auge (intravitreal) injiziert wurden (Heiduschka & Thanos, 2000).

Es zeigte sich in diesen Versuchen eine signifikant höhere Anzahl überlebender RGZ nach Auswertung 14 Tage post Axotomie, die von der eingesetzten Konzentration von ATA abhängig ist. Interessant ist, dass sich bei Erhöhung der Konzentration bis zu einer gesättigten Lösung, bei der das ATA in einer Konzentration von etwa  $0,78 \mu\text{g/ml}$  vorliegt, kein Sättigungseffekt zeigt; sondern statt dessen steigt der Anteil überlebender RGZ bis

43 ± 5% der Ausgangspopulation an. Noch größer ist der Anteil überlebender RGZ, wenn die intravitreale Injektion nach einer Woche wiederholt wird. In diesem Fall überleben sogar 59 ± 10% der Ausgangspopulation an RGZ. Dieses stellt die Rettung von nahezu 53% der ansonsten abgestorbenen RGZ dar.



**Diagramm 3:** Anzahl der überlebenden retinalen Ganglienzellen (RGC) und gefärbten Mikroglia-Zellen (MG) 14 Tage nach einer Axotomie. Gezeigt sind die Werte nach verschiedenen **intravitrealen** Injektionen unmittelbar nach der Axotomie. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar, und die Zahlen in den Balken den prozentualen Anteil am Kontrollwert. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ . Abbildung aus Heiduschka & Thanos, 2000.

Die in diesen Versuchen erzielten Ergebnisse zeigen das hohe Maß an neuroprotektiver Potenz, die einer intravitrealen Injektion von ATA innewohnt.

Es zeigen sich durch den direkten Vergleich der erzielten Werte bei systemischer *versus* lokaler Applikation von ATA große Unterschiede in der neuroprotektiven Wirkung dieses Stoffes. Vergleichbare Studien mit anderen Stoffklassen zeigten mögliche Parallelen zu der hier vorliegenden Problematik.

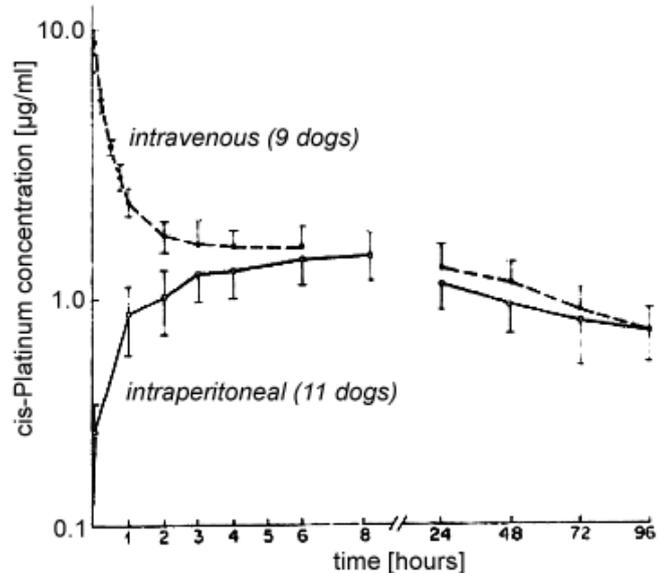
Mögliche Ansatzpunkte zur Klärung stecken in den verschiedenen Wegen, die das Pharmakon im Körper zu seinem Zielort bewältigen muss, dem First-pass-Effekt in der Leber

#### 4. Diskussion

und der Blut-Hirn- bzw. Blut-Retina-Schranke, sowie in der Molekülgröße der Substanz selber.

In einer Studie über die systemische Applikation von *Cisplatin*, einem divalentem Platin-Komplex, zeigen Pretorius *et al.* (1981) einen Vergleich zwischen i.v. und i.p. Applikation dieses Stoffes. In den Versuchen

wurde die Konzentration von Cisplatin im Serum, im Urin und im Gewebe gemessen. Ebenso wurden der Konzentrationsverlauf und seine zeitliche Änderung nach den verschiedenen Applikationen untersucht. In der nebenstehenden Abbildung ist der Konzentrationsverlauf nach einmaliger i.v. und i.p. Applikation von 3 mg Cisplatin/kg Körpergewicht aufgezeigt. Es zeigt sich, dass nach i.v. Applikation von 3 mg Cisplatin/kg Körpergewicht schon



**Abb. 11:** Cisplatin Serumkonzentration versus Zeit nach i.v. und i.p. Applikation von 3 mg/kg Cisplatin im Tierversuch bei Hunden. Cancer Treat Rep 65:1055-1062, 1981

nach 5 min ein maximaler Serumspiegel von 13,5 µg/ml erreicht werden konnte, wobei die Cisplatin-Konzentration eine Halbwert-Zeit von 11,6 min aufwies. Nach einer i.p. Applikation von 3 mg Cisplatin/kg Körpergewicht wurde erst nach 4 Stunden der maximale Serumspiegel von 1,5 µg/ml erreicht. Dieser lag im Vergleich zu dem maximal erreichten Serumspiegel, bei i.v. Applikation, deutlich niedriger. Jedoch glichen sich beide Serumkonzentrationsverläufe nach einer Zeitspanne von ca.4 Stunden post Applikation. In der Abbildung sind somit für beide Applikationsarten noch nach 96 Stunden post Applikation ein Wert von unter 1µg/ml nachweisbar. Die Autoren des Textes nehmen dazu jedoch keine besondere Stellung. Nachteilig wurden in dieser Studie die deutlich höheren Volumina genannt, die bei i.p. Applikation zur Erzielung von adäquaten Serumspiegeln appliziert werden mussten. Außerdem traten bei wiederholten i.p. Injektionen bei einigen Versuchstieren abdominale Schmerzen und lokale bakterielle Entzündungen in Form einer bakteriellen Peritonitis auf.

Durch Versuche mit *CGP 64128A*, einem Phosphorothioat-Oligonucleotid, konnten die verschiedenen Verteilungswege dieser Substanz und ihre Verteilung und Anreicherung in

bestimmten Geweben nach systemischer Applikation gezeigt werden (Nicklin *et al.*, 1997). Es zeigte sich, dass nach einer i.v. Applikation des Stoffes ein schneller Anstieg der Serumkonzentration auf den Maximalwert zu beobachten war. Der Stoff wurde jedoch rasch wieder abgebaut, was schließlich in eine langsame Eliminationsphase mündete. Diese Beobachtungen decken sich mit den allgemeinen Beschreibungen der Pharmakokinetik. Interessant hingegen ist die Verteilung des Stoffes in den verschiedenen Geweben des Körpers. Diese war hoch in Leber und Niere, gering in Lunge, Knochen, Muskulatur und Haut und vernachlässigbar im ZNS und Auge.

Nach i.p. Applikation von CGP 64128A konnte eine Verzögerung von ca. 15 min nachgewiesen werden, bis die Substanz im Blutkreislauf nachgewiesen werden konnte. Ebenso stellte sich die maximale Serumkonzentration erst nach einer Zeit von 60-180 min ein und lag, gesehen zur i.v. Applikation, deutlich unter dessen Maximalkonzentration. Jedoch konnte eine beträchtliche Bioverfügbarkeit der Substanz von ca. 30-50%, bei einer Dosis von 0,6 mg/kg, über eine Zeit von 360 min gemessen werden. Spezielle Angaben zur Anreicherung in den Geweben nach einer i.p. Applikation werden im vorliegenden Text nicht aufgeführt. Es ist aber davon auszugehen, dass diese denen der i.v. Applikation ähneln. Jedoch könnten lediglich geringere Stoffkonzentrationen, bedingt durch die niedrigeren gemessenen Serumkonzentrationen, in den einzelnen Organen und Geweben vermutet werden.

Ergänzend zur oben genannten Studie ist eine Veröffentlichung von Ezra *et al.* (1990) über Cyclosporin A zu nennen. Cyclosporin A wurde in den 70er Jahren entdeckt und ist ein zyklisches Polypeptid aus 11 Aminosäureresten. Es hemmt im wesentlichen konzentrationsabhängig und reversibel die Produktion und Sekretion von Interleukin-2 in den T-Helfer-Zellen und unterbindet damit die Bildung und Proliferation von zytotoxischen T-Lymphozyten. Auf zellulärer Ebene wird Cyclosporin A in den T-Lymphozyten an das Protein Cyclophilin gebunden und dieser Rezeptorkomplex in den Zellkern transportiert. Dort tritt er mit spezifischen Stellen auf dem Chromosom in Wechselwirkung. Als Resultat werden die Translokation der mRNA sowie die folgende Synthese und Freisetzung von Lymphokinen wie Interleukin-2 gehemmt.

Bei den durchgeführten Versuchen wurde radioaktives Cyclosporin A als Indikator für die Anreicherung des applizierten Stoffes im Gewebe bei unterschiedlichen Applikationsarten benutzt. Es zeigte sich, dass nach einer i.p. Applikation eine verstärkte Anreicherung der Substanz in Leber und Milz und nur bei ca. 50% der Versuchstiere auch geringe Anreicherungen im Gewebe des Auges festzustellen waren. Die Anreicherung im Blut lag unterhalb

derer, die in Leber und Milz gemessen wurden. Dieses lässt sich jedoch durch die kurze Zeitspanne von nur 60 min zwischen Applikation und Tötung der Versuchstiere erklären. Somit lag die nötige Zeitspanne zum Erreichen eines maximalen Serumspiegels weit unterhalb derer, die bei vorausgegangenen Versuchen bei i.p. Applikationen benötigt wurden. Bei i.v. Applikationen war eine Anreicherung in Leber und Milz zu erkennen. Zudem lag die Blutkonzentration 10-mal höher als die gemessenen Werte bei i.p. Applikation. Ebenso lag bei allen Versuchstieren eine Anreicherung der Substanz im Gewebe des Auges vor. Somit können lediglich die bei einer i.v. Applikation der Substanz erreichbaren hohen Serumkonzentrationen genutzt werden, um zumindest kleine Anreicherungen der Substanz im Gewebe des Auges zu erzielen. Hinzu kommt, dass diese Anreicherungen überwiegend im chorioretinalen Komplex und im orbitalen Fettgewebe zu finden waren.

Bei lokaler Applikation in Form von Augentropfen, lag eine deutliche Einlagerung des Stoffes in Geweben des Auges vor. Diese lagen in hohen Konzentrationen in Bereichen der Cornea, Conjunktiva und Sclera. Es konnten lediglich geringe Stoffmengen in der Leber, in der Milz und im Blut selber erfasst werden. Somit kann gesagt werden, dass der Stoff nicht oder nur in geringen Mengen die Blut-Retina-Schranke passieren konnte und somit kein effektiver Stoffaustausch zwischen Retina und Blut stattfindet.

Dieses stimmt mit den in der Literatur der Pharmakokinetik beschriebenen Prozessen überein und wurde schon weiter oben im Text beschrieben. Dort werden Stoffe in denjenigen Organen akkumuliert, die eine erhöhte Durchblutung aufweisen. Zu diesen zählen auch Niere und Leber, wie die Studien belegen. Jedoch zählt das Gehirn ebenso zu den stark durchbluteten Organen. Verwunderlich ist aber hier, dass trotz starker Durchblutung keine Anreicherung der Substanz erfolgte. Hier muss die limitierende Blut-Hirn-Schranke und in Bezug auf das Auge, die Blut-Retina-Schranke als mögliche Verteilungsbarriere in Betracht gezogen werden, da diese einen Stoffaustausch verhindert, oder auf ein uneffektives Maß reduziert. Es kann hier die Molekülgröße der Substanz oder ihre Hydrophobizität für ihre Passage limitierend wirken. Wie bereits beschrieben, ist ATA ein schwer in Wasser löslicher kristalliner Feststoff. Deshalb werden in der zu injizierenden ATA-Lösung 10 Vol% DMSO eingesetzt. Nach der Injektion der ATA-Lösung sinkt die DMSO-Konzentration sehr schnell ab, da das DMSO erstens stark verdünnt wird und zweitens schnell in das umliegende Gewebe abdiffundiert. Daher ist damit zu rechnen, dass ein großer Teil des ATA im wässrigen Milieu des Blutes oder des Peritoneums feinkristallin ausfällt und somit in dieser Form relativ langsam ins umliegende Gewebe übertritt. Aufgrund der Hydrophobizität von ATA ist zu erwarten, dass einzelne Moleküle durch die

Zellmembranen hindurch zu gelangen vermögen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch das Ausmaß der Passage des ATA durch die Blut-Retina-Schranke nicht quantifiziert werden. Auf Grund der wenig signifikanten Ergebnisse der intravenösen und intraperitonealen Injektionen im Gegensatz zu den Ergebnissen der intravitrealen Injektion kann jedoch gesagt werden, dass die Konzentration der Substanz keinen therapeutischen Bereich erreicht und die Substanz somit keine effiziente neuroprotektive Wirkung entfalten kann.

In einer Studie über *Timolol*, einen  $\beta$ -Blocker zur Behandlung des Glaukoms, zeigte sich ebenfalls eine geringe Konzentrationen der Substanz im Auge nach einer systemischen Applikation (Tan *et al.*, 2001).

In dieser Studie wurden Untersuchungen an Ratten durchgeführt, in denen die lokale Applikation von Timolol in Form von Augentropfen und die einmalige i.p. Injektion von Timolol verglichen werden sollten. Bei den i.p. Injektionen wurden Timolol-Konzentrationen von 5-75 mg/kg Körpergewicht verwendet.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei i.p. Injektion eine deutliche Dosis-Reaktions-Beziehung zwischen applizierter Dosis und gemessener Konzentration im Plasma und den Geweben des Auges zu erkennen ist, wobei in der Iris die höchste Konzentration an Timolol gemessen werden konnte. Ebenso ist in dieser Studie erkennbar, dass deutlich höhere Konzentrationen der Substanz appliziert werden müssen, mit entsprechend möglichen Nebenwirkungen auf den Gesamtorganismus, um überhaupt geringe messbare lokale Werte im Gewebe des Auges zu erhalten. Die niedrigste i.p. applizierte Konzentration an Timolol in diesen Versuchen lag bei 5 mg/kg. Diese Konzentration ist 5-6 mal höher als die therapeutisch angewandte Konzentration beim Menschen. Diese benötigten Konzentrationen, übertragen auf die Humanmedizin und somit auf den Menschen, lassen Einwände auf mögliche negative Effekte auf den Gesamtorganismus zu. Deutlich wird hierbei die niedrige Aufwand-Nutzen-Relation bei einer systemischen Applikation der Substanz.

Mögliche Erklärungen können im First-pass-Effekt gefunden werden. Da die Substanz nach einer i.p. Injektion dem allgemeinen Weg der Resorption in die Gefäße des Peritoneums folgt und dadurch die Leber erreicht, unterliegt die Substanz dem First-pass-Effekt. Dies könnte eine Reduzierung der Substanzmenge durch Metabolisierung und anschließende Ausscheidung zur Folge haben. Dadurch steht nach der Passage der Leber und durch den damit verbundenen First-pass-Effekt eine geringere Substanzmenge zur Verfügung, um über den Blutkreislauf die angestrebten Zielorgane zu erreichen.

Das Fazit dieser Studie zeigt, dass i.p. Applikationen nicht geeignet sind, um therapeutisch nutzbare Substanzkonzentrationen lokal im Auge zu erreichen.

#### 4. Diskussion

Ebenso ergänzt eine Studie mit *Cyclosporin A* die oben genannten Ergebnisse (Pfau *et al.*, 1995). Das Ziel dieser Studie war der Vergleich okulärer Gewebekonzentrationen nach systemischer Applikation von Cyclosporin A, mit denen nach lokaler Applikation in der Anwendung beim Menschen. Aus diesem Grund wurden die Cyclosporinkonzentrationen im Serum, im Kammerwasser und in der Bindehaut nach systemischer Applikation mit denen von Patienten nach lokaler Applikation von 2%igen Cyclosporin A-Augentropfen verglichen.

Im Rahmen von Kataraktoperationen wurden zwei Patientenkollektive miteinander verglichen. Der Versuchsaufbau gliederte sich in eine Gruppe von Patienten ( $n = 6$ ), die aufgrund einer vorangegangenen Nierentransplantation systemisch mit Cyclosporin A behandelt wurden. Das Medikament wurde täglich morgens verabreicht. Die zweite Gruppe von Patienten ( $n = 10$ ) bekam am Ende des ersten Tages (18 Uhr) und dreimal während des zweiten Tages (7, 12 und 18 Uhr) jeweils 1 Tropfen Cyclosporin A-Augentropfen in das zu operierende Auge getropft, um einen Gewebespiegel aufzubauen. Die Cyclosporin A-Augentropfen wurden aus Sandimmun-Lösung (Fa. Sandoz, Basel) hergestellt, welche 2%ig in Erdnussöl gelöst wurde. Am dritten Tag wurde dann die Kataraktoperation durchgeführt, wobei zwischen der letzten Tropfenapplikation und der Operation 14-20 Stunden lagen.

Die Patienten mit systemischer Applikation wiesen alle nachweisbare Cyclosporinspiegel im Serum auf ( $77 \pm 47$  ng/ml), womit diese zum Teil deutlich unterhalb des therapeutischen Bereichs von 100-200 ng/ml lagen. Ebenso lag überraschender Weise auch bei vier Patienten aus der Gruppe mit lokaler Applikation nach nur viermaliger Tropfenapplikation ein messbarer Serumspiegel vor.

Nachweisbare Spiegel im Kammerwasser zwischen  $16 \pm 16$  ng/ml zeigten sich bei 3 Patienten aus der Gruppe mit systemischer Applikation, wobei die jeweilige Höhe des Spiegels nicht in allen Fällen mit der Serumkonzentration und der Konzentration in der Bindehaut korrelierte. Auch bei vier Patienten in der Gruppe mit lokaler Applikation war ein Kammerwasserspiegel von  $33 \pm 45$  ng/ml messbar.

Messbare Bindehautspiegel fanden sich bei 5 Patienten der Gruppe mit systemischer Applikation. Diese Werte lagen allerdings bei  $2,6 \pm 2,3$  ng/mg. Die Bindehautspiegel der Patienten mit lokaler Applikation lagen bei  $10,1 \pm 10,0$  ng/mg. Vergleicht man die beiden Patientengruppen bezüglich der Bindehautspiegel miteinander zeigt sich, dass nach lokaler

Applikation signifikant höhere Werte erreicht wurden als nach systemischer Gabe.

Wie die oben aufgeführten Ergebnisse zeigen, werden bereits nach viermaliger lokaler Applikation von 2%iger Cyclosporin A-Lösung in Form von Augentropfen am menschlichen Auge ein im Durchschnitt höherer therapeutischer Bereich der Substanzkonzentration im Serum, im Kammerwasser und in der Bindehaut erreicht als nach systemischer Applikation. Bei systemischer Applikation wurden zum Teil deutlich geringere Serum- und Kammerwasser-Spiegel gemessen. Diese lagen zum Teil unter dem therapeutischen Bereich der Substanz. Bei einer systemischen Applikation spielt außerdem der Zeitfaktor, welcher zur Erreichung des maximalen Serumspiegels benötigt wird, eine wichtige Rolle. Es zeigt sich, nach den vorliegenden Ergebnissen der Studie, dass lokale Wirkspiegel eher nach lokaler als nach systemischer Applikation erzielt werden.

Somit kann gesagt werden, dass auf reine Augen-Behandlungen bezogen, eine lokale Applikation eines Pharmakons als am effektivsten zu bewerten ist. Des Weiteren werden durch eine lokale Applikation mögliche Nebenwirkungen des Pharmakons verringert.

Bei systemischer Applikation eines Pharmakons scheinen zu viele Komponenten die Effektivität der applizierten Substanz zu beeinflussen. In diesem Zusammenhang werden der Zeitfaktor zur Erreichung des Serumspiegels, die zu überwindenden Gewebe-Barrieren, der First-pass-Effekt, die Blut-Retina-Schranke und die allgemeinen hohen Nebenwirkungen auf den Gesamtorganismus bei systemischer Applikation limitierende Faktoren für den Einsatz der systemischen Applikation sein. Zusätzlich zu den oben aufgeführten limitierenden Faktoren, spielt die Beschaffenheit der Substanz selbst eine große Rolle. Es kann hier die Molekülgröße der Substanz oder die Hydrophobizität für dessen Passage limitierend wirken. Somit ergeben sich nach Applikation der Substanz Differenzen bei der Penetration in die verschiedenen Gewebe und Verteilung im Organismus.

Abschließend zu dieser Schrift kann gesagt werden, dass zur Zeit keine effiziente Applikations-Alternative zur intravitrealen Injektion von ATA besteht.

## Literaturverzeichnis

### A

- Akiyama, S., Kuwano, M., Yamamoto, M. & Endo, H. (1977) The effect of aurintricarboxylic acid on RNA polymerase from rat liver. *J. Biochem. Tokyo* **81**: 135-141
- Aronica, E.M., Gorter, J.A., Grooms, S., Kessler, J.A., Bennett, M.V.L., Zukin, R.S. & Rosenbaum, D.M. (1998) Aurintricarboxylic acid prevents GluR2 mRNA downregulation and delayed neurodegeneration in hippocampal CA1 neurons of gerbil after global ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 7115-7120.
- Asai, A., Qui, J.-H., Narita, Y., Chi, S., Saito, N., Shinoura, N., Hamada, H., Kuchino, Y. & Kirino, T. (1999) High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 34450-34458.

### B

- Balzarini, J., Mitsuya, H., De Clercq, E. & Broder, S. (1986) Aurintricarboxylic acid and Evans Blue represent two different classes of anionic compounds which selectively inhibit the cytopathogenicity of human T-cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**: 64-71.
- Baumbach, G.L., Cancilla, P.A., Martin-Amat, G., Tephly, T.R., McMartin, K.E., Makar, A.B., Hayreh, M.S. & Hayreh, S.S. (1977) Methyl alcohol poisoning. IV. Alterations of the morphological findings of the retina and optic nerve. *Arch. Ophthalmol.* **95**: 1859-1865.
- Berdan, R.C., Easaw, J.C. & Wang, R. (1993) Alterations in membrane potential after axotomy at different distances from the soma of an identified neuron and the effect of depolarization on neurite outgrowth and calcium channel expression. *J. Neurophysiol.* **69**: 151-164.
- Berkelaar M., Clarke D.B., Wang Y.C., Bray G.M., Aguayo A.J. (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci* **14**(7):4368-4374
- Berninger, T.A., Bird, A.C. & Arden, G.B. (1989) Leber's hereditary optic atrophy. *Ophthalmic Paediatr. Genet.* **10**: 211-227.
- Bien, A., Seidenbecher, C.I., Böckers, T.M., Sabel, B.A. & Kreutz, M.R. (1999) Apoptotic versus necrotic characteristics of retinal ganglion cell death after partial optic nerve injury. *J. Neurotrauma* **16**: 153-163.
- Bina-Stein, M. & Tritton, T.R. (1976) Aurintricarboxylic acid is a nonspecific enzyme inhibitor. *Mol. Pharmacol.* **12**: 191-193.
- Bonfanti, L., Strettoi, E., Chierzi, S., Cenni, M.C., Liu, X.H., Martinou, J.-C., Maffei, L. & Rabacchi, S.A. (1996). Protection of retinal ganglion cells from natural and axotomy-induced cell death in neonatal transgenic mice overexpressing bcl-2. *J. Neurosci.* **16**: 4186-4194.
- Büchi, E.R. (1992) Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: an electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp. Eye Res.* **55**: 605-613.

## C

- Castagne, V. & Clarke, P.G. (1997) Inhibition of glutathione synthesis can enhance cycloheximide-induced protection of developing neurons against axotomy. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **102**: 285-290
- Catchpoole, D.R. & Stewart, B.W. (1994) Inhibition of topoisomerase II by aurointricarboxylic acid: implications for mechanisms of apoptosis. *Anticancer. Res.* **14**: 853-856.  
Cell 75(4):641-652
- Cenni, M.C., Bonfanti, L., Martinou, J.C., Ratto, G.M., Strettoi, E. & Maffei, L. (1996) Long-term survival of retinal ganglion cells following optic nerve section in adult bcl-2 transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.* **8**: 1735-1745.
- Chatterjee, N.K., Polatnick, J. & Bachrach, H.L. (1976) Cell-free translation of foot-and-mouth disease virus RNA into identifiable non-capsid and capsid proteins. *J. Gen. Virol.* **32**: 383-394.
- Chaudhary, P., Ahmed, F., Quebada, P. & Sharma, S.C. (1999) Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **67**: 36-45.

## E

- Emmerich, B., Erben, V., Weller, C., Schuster, H., Preis, R. & Rastetter, J. (1979) Characterisation of protein synthesis in cell-free extracts from different mammalian cells by their sensitivity to inhibitors of polypeptide-chain initiation. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **360**: 1099-1111.
- Ezra David Ben, MD, PhD, Maftzir Genia, MSc (1990) Ocular penetration of cyclosporin A in rat eye. *Arch Ophthalmol* 108(4):584-7)

## F

- Fagiolini, M., Caleo, M., Strettoi, E. & Maffei, L. (1997) Axonal transport blockade in the neonatal rat optic nerve induces limited retinal ganglion cell death. *J. Neurosci.* **17**: 7045-7052.

## G

- Garcia-Valenzuela, E., Gorczyca, W., Darzynkiewicz, Z. and Sharma, S.C. (1994) Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J. Neurobiol.* **25**, 431-438.
- Geier et al., 1997
- Giulian D., (1993) Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia* 7, 102-110
- Giulian D., Corpuz M., Chapman S., Mansouri M. and Robertsen C. (1993) Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 3,681-693.
- Givens, J.F. & Manly, K.F. (1976) Inhibition of RNA-directed DNA polymerase by aurointricarboxylic acid. *Nucleic Acids Res.* **3**: 405-418.
- Gonzalez, R.G., Haxo, R.S. & Schleich, T. (1980) Mechanism of action of polymeric aurointricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein-nucleic acid interactions. *Biochemistry* **19**: 4299-4303.

## H

- Hallick, R.B., Chelm, B.K., Gray, P.W. & Orozco, E.M., Jr. (1977) Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Res.* **4**: 3055-3064
- Heiduschka, P. & Thanos, S. (1998) Direct assessment of NO production during neuronal cell death *in vivo*. *NeuroReport* **9**: 4051-4057.
- Heiduschka, P. & Thanos, S. (2000a) Aurintricarboxylic acid promotes survival and regeneration of axotomised retinal ganglion cells *in vivo*. *Neuropharmacology* **39**: 889-902.
- Hibasami, H., Tanaka, M. & Nagai, J. (1982) Kinetic studies on inhibition of aminopropyltransferases by aurintricarboxylic acid *in vitro*. *Chem. Biol. Interact.* **40**: 319-323.
- Hough, R., Pratt, G. & Rechsteiner, M. (1986) Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* **261**: 2400-2408.
- Howell, N. (1998) Leber hereditary optic neuropathy: respiratory chain dysfunction and degeneration of the optic nerve. *Vision Res.* **38**: 1495-1504.
- Hsu & Joshi, 1977
- Huginin, M., Quintal, L.J., Mankovich, J.A. & Ghayur, T. (1996) Protease Activity of *in Vitro* Transcribed and Translated *Caenorhabditis elegans* Cell Death Gene (*ced-3*) Product. *J. Biol. Chem.* **271**: 3517-3522.
- Hunt, D.M. & Wagner, R.R. (1975) Inhibition by aurintricarboxylic acid and polyethylene sulfonate of RNA transcription of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **16**: 1146-1153.

## I

- Ihle, J. N. (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature* **377**: 591-594.
- Ilschner, S.U. & Waring, P. (1992) Fragmentation of DNA in the retina of chicken embryos coincides with retinal ganglion cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**: 1056-1061.
- Isenmann, S. & Bähr, M. (1997) Expression of c-Jun protein in degenerating retinal ganglion cells after optic nerve lesion in the rat. *Exp. Neurol.* **147**: 28-36.
- Isenmann, S., Wahl, C., Krajewski, S., Reed, J.C. & Bähr, M. (1997) Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **9**: 1763-1772.

## J

- Joseph, R., Tsang, W., Han, E. & Saed, G.M. (1993) Neuronal  $\beta$ -amyloid precursor protein gene expression: regulation by aurintricarboxylic acid. *Brain Res.* **625**: 244-255.

## K

- Kaneda, K., Kashii, S., Kurosawa, T., Kaneko, S., Akaike, A., Honda, Y., Minami, M. & Satoh, M. (1999) Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Res.* **815**: 11-20.
- Katai, N., Kikuchi, T., Shibuki, H., Kuroiwa, S., Arai, J., Kurokawa, T. & Yoshimura, N. (1999) Caspase-like proteases activated in apoptotic photoreceptors of Royal College of Surgeons rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**: 1802-1807.
- Kekuda, R., Torres-Zamorano, V., Leibach, F.H. & Ganapathy, V. (1997) Human serotonin transporter: regulation by the neuroprotective agent aurointricarboxylic acid and by epidermal growth factor. *J. Neurochem.* **68**: 1443-1450.
- Kermer, P., Klöcker, N. & Bähr, M. (1999b) Long-term effect of inhibition of ced 3-like caspases on the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo. *Exp. Neurol.* **158**: 202-205.
- Kermer, P., Klöcker, N., Labes, M. & Bähr, M. (2000) Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 in vivo. *J. Neurosci.* **20**: 722-728.

## L

- Lam, T.T., Abler, A.S. & Tso, M.O. (1999a) Apoptosis and caspases after ischemia-reperfusion injury in rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**: 967-975.
- Lam, T.T., Fu, J., Hrynewycz, M. & Tso, M.O.M. (1995) The effect of aurointricarboxylic acid, an endonuclease inhibitor, on ischemia/reperfusion damage in rat retina. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **11**: 253-259.
- Larner, A.C. & Finbloom, D.S. (1995) Protein tyrosine phosphorylation as a mechanism which regulates cytokine activation of early response genes. *Biochem. Biophys. Acta* **1266**: 278-287.
- Lipton, S.A. & Rosenberg, P.A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* **330**: 613-622.
- Lucius, R. & Sievers, J. (1997) YVAD protect post-natal retinal ganglion cells against axotomy-induced but not free radical-induced axonal degeneration in vitro. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **48**: 181-184.

## M

- McCune, S.A., Foe, L.G., Kemp, R.G. & Jurin, R.R. (1989) Aurointricarboxylic acid is a potent inhibitor of phosphofructokinase. *Biochem. J.* **259**: 925-927.
- McKellar, M.J., Hidajat, R.R. & Elder, M.J. (1997) Acute ocular methanol toxicity: clinical and electrophysiological features. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* **25**: 225-230.
- McKerracher, L., Vidal-Sanz, M., Essagian, C. & Aguayo, A.J. (1990) Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J. Neurosci.* **10**: 2834-2841.

- Mesner, P.W., Jr., Bible, K.C., Martins, L.M., Kottke, T.J., Srinivasula, S.M., Svingen, P.A., Chilcote, T.J., Basi, G.S., Tung, J.S., Krajewski, S., Reed, J.C., Alnemri, E.S., Earnshaw, W.C. & Kaufmann, S.H. (1999) Characterization of caspase processing and activation in HL-60 cell cytosol under cell-free conditions. Nucleotide requirement and inhibitor profile. *J. Biol. Chem.* **274**: 22635-22645.
- Moudgil, V.K. & Eessalu, T.E. (1980) Inhibition of rat uterine estradiol receptor by aurintricarboxylic acid. *Life Sci.* **27**: 1159-1167.

## N

- Naeser, P. (1988) Optic nerve involvement in a case of methanol poisoning. *Br. J. Ophthalmol.* **72**: 778-781.
- Nagata K., Takei N., Nakajima K., Saito H., and Kohsaka S. (1993) Microglia conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J. Neuroscience Res.* **34**, 357-363
- Nash, M.S., Wood, J.P.M., Melena, J. & Osborne, N.N. (2000) Flupirtine ameliorates ischaemic-like death of rat retinal ganglion cells by preventing calcium influx. *Brain Res.* **856**: 236-239.
- Nicklin P.L., Bayley D., Giddings J., Craig S.J., Cummins L.L., Hastewell J.G., Phillips J.A. (1998) Pulmonary bioavailability of a phosphorothioate oligonucleotide (C 64128A): comparison with other delivery routes. *Pharm Res.* **15**(4):583-91

## O

- Okada, N. & Koizumi, S. (1995) A neuroprotective compound, aurin tricarboxylic acid, stimulates the tyrosine phosphorylation cascade in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 16464-16469.
- Okada, N. & Koizumi, S. (1997) Tyrosine phosphorylation of ErbB4 is stimulated by aurintricarboxylic acid in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**: 266-269.
- Oppenheim R.W., (1991) Cell death during development of the nervous system.
- Oppenheim, R.W., Prevette, D., Yin, Q.W., Collins, F. & MacDonald, J. (1991) Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* **251**: 1616-1618.

## P

- Peinado-Ramón, P., Salvador, M., Villegas-Pérez, M.P. & Vidal-Sanz, M. (1996) Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative *in vivo* study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**: 489-500.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., Gorter, J.A., Bennett, M.V.L. & Zukin, R.S. (1997) The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* **20**: 464-470.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., Zukin, R.S., Bennett, M.V.L., Cho, S. & Pulsinelli, W.A. (1992) Switch in Glutamate Receptor Subunit Gene Expression in CA1 Subfield of Hippocampus Following Global Ischemia in Rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 10499-10503.

- Perry, V.H. & Cowey, A. (1982) A sensitive period for ganglion cell degeneration and the formation of aberrant retino-fugal connections following tectal lesions in rats. *Neuroscience* **7**: 583-594.
- Petorius R.Gerald, Petrilli E, Kean Charles, Ford Larry, Hoeschele James, Lagasse Leo (1981) Comparison of the iv and ip routes of administration of cisplatin in dogs. *Cancer Treat Rep.* 65(11-12):1055-62
- Pfau B., Kruse F.E., Rohrschneider K., Zorn M., Fiehn W, Burk R.O.W., Völker H.E. (1995) Comparison between local and systemic administration of cyclosporin A on the effective level in conjunctiva, aqueous humor and serum. *Ophthalmologie.* 92(6):833-9
- Phillips, M.D., Moake, J.L., Nolasco, L. & Turner, N. (1988) Aurin tricarboxylic acid: a novel inhibitor of the association of von Willebrand factor and platelets. *Blood* **72**: 1898-1903.
- Porciatti, V., Pizzorusso, T., Cenni, M.C. & Maffei, L. (1996) The visual response of retinal ganglion cells is not altered by optic nerve transection in transgenic mice overexpressing Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 14955-14959.
- Posner, A., Raser, K.J., Hajimohammadreza, I., Yuen, P.W. & Wang, K.K.W. (1995) Aurintricarboxylic acid is an inhibitor of  $\mu$ - and m-calpain. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **36**: 291-299.
- Purves, D. and Nja, A. (1976) Effect of nerve growth factor on synaptic depression after axotomy. *Nature* **260**: 35-536.

## Q

- Quigley, H.A. (1998) Neuronal death in glaucoma. *Progr. Retinal Eye Res.* **18**: 39-57.
- Quigley, H.A., Nickells, R.W., Kerrigan, L.A., Pease, M.E., Thibault, D.J. & Zack, D.J. (1995) Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**: 774-786.

## R

- Rabacchi, S.A., Bonfanti, L., Liu, X.H. & Maffei, L. (1994b) Apoptotic cell death induced by optic nerve lesion in the neonatal rat. *J. Neurosci.* **14**: 5292-5301.
- Rabchevsky A. G., Streit W. J. (1997) Grafting of cultured microglia cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* 47(1): 34-48.
- Rosenbaum, D.M., Rosenbaum, P.S., Gupta, A., Michaelson, M.D., Hall, D.H. & Kessler, J.A. (1997) Retinal ischemia leads to apoptosis which is ameliorated by aurintricarboxylic acid. *Vision Res.* **37**: 3445-3451.
- Rui, H., Xu, J., Mehta, S., Fang, H., Williams, J., Dong, F. & Grimley, P.M. (1998) Activation of the Jak2-Stat5 signaling pathway in Nb2 lymphoma cells by an anti-apoptotic agent, aurintricarboxylic acid. *J. Biol. Chem.* **273**: 28-32.
- Rusnak, F. & Mertz, P. (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* **80**: 1483-1521.
- Russelakis-Carneiro, M., Silveira, L.C. & Perry, V.H. (1996) Factors affecting the survival of cat retinal ganglion cells after optic nerve injury. *J. Neurocytol.* **25**: 393-402.

## S

- Schmeiser, K. & Grand, R.J. (1999) The fate of E- and P-cadherin during the early stages of apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**: 377-386.
- Schols, D., Baba, M., Pauwels, R., Desmyter, J. & De Clercq, E. (1989) Specific interaction of aurointricarboxylic acid with the human immunodeficiency virus/CD4 cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 3322-3326.
- Sekkat, A., Maillard, P., Dupeyron, G., Bensouda, J., Arne, J.L. & Bec, P. (1982) Neuropathies optiques au cours d'une intoxication aigue par le methanol. *J. Fr. Ophthalmol.* **5**: 797-804.
- Skene, J.H. & Willard, M. (1981) Changes in axonally transported proteins during axon regeneration in toad retinal ganglion cells. *J. Cell-Biol.* **89**: 86-95.
- Solberg et al. (1998)
- Sugiyama K., Gu Z., Kawase C., Yamamoto T., Kitazawa Y., (1999) Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **40**(13):3084-90
- Swennen, L., Moens, L., Heip, J. & Kondo, M. (1981) Preferential stimulation by aurointricarboxylic acid of DNA-dependent RNA polymerase II activity in isolated larval nuclei of *Artemia salina*. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **362**: 133-142.

## T

- Tan A.Y., MD, LeVatte T.L., BSc, Archibald M.L., MSc, Tremblay F., PhD, Kelly Melanie E. M., PhD, Cauhan B.C. (2002) Timolol concentrations in rat ocular tissues and plasma after topica and intraperitoneal dosing. *J Glaucoma.* **11**(2):134-42
- Tezel, G. & Wax, M.B. (1999) Inhibition of caspase activity in retinal cell apoptosis induced by various stimuli in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**: 2660-2667.
- Thanos, S. & Mey, J. (1995) Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cells in the retina of adult rats. *J. Neurosci.* **15**: 1057-1079.
- Thanos, S., Mey, J. & Wild, M. (1993) Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurosci.* **13**: 455-466.
- Toft, D., Roberts, P.E., Nishigori, H. & Moudgil, V.K. (1979) Characterization of the avian progesterone receptor through the use of inhibitors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **117**: 329-341.
- Torres-Zamorano, V., Kekuda, R., Leibach, F.H. & Ganapathy, V. (1997) Tyrosine phosphorylation and epidermal growth factor-dependent regulation of the sodium-coupled amino acid transporter B0 in the human placental choriocarcinoma cell line JAR. *Biochim. Biophys. Acta* **1356**: 258-270.

**V**

- Varon, S. and Adler, R. (1981) Trophic and specifying factors directed to neuronal cells. *Adv. Cell Neurobiol.* **2**: 115-163.
- Vaux, D.L. (1993) Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 786-789.
- Villégas-Péres M. P., Vidal-Sanz M., Rasminsky M., Bray G. M. and Aguayo A. J. (1993) Rapid and protracted phases of retinal ganglion cells loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.* **24**:23-36

**W**

- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F. & Reed, J.C. (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**: 339-343.
- Wolvetang, E.J., Larm, J.A., Moutsoulas, P. & Lawen, A. (1996) Apoptosis induced by inhibitors of the plasma membrane NADH-oxidase involves Bcl-2 and calcineurin. *Cell Growth Differ.* **7**: 1315-1325.

**Y**

- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H. M., Horvitz H. R. (1993) The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell.* **75**(4):641-652

**Z**

- Zeevalk, G.D., Schoepp, D. & Nicklas, W.J. (1993) Aurintricarboxylic acid prevents NMDA-mediated excitotoxicity: evidence for its action as an NMDA receptor antagonist. *J. Neurochem.* **61**: 386-389.
- Zeevalk, G.D., Schoepp, D. & Nicklas, W.J. (1995) Excitotoxicity at both NMDA and non-NMDA glutamate receptors is antagonized by aurintricarboxylic acid: Evidence for differing mechanisms of action. *J. Neurochem.* **64**: 1749-1758.
- Zeng, B.Y., Anderson, P.N., Campbell, G. & Lieberman, A.R. (1995) Regenerative and other responses to injury in the retinal stump of the optic nerve in adult albino rats: transection of the intracranial optic nerve. *J. Anat.* **186**: 495-508



## Danksagung

Zum Abschluss meiner Dissertation möchte ich allen denjenigen Menschen herzlich danken, die mich bei meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gebührt...

...an erster Stelle Herrn PD. Dr. Peter Heiduschka, für die ausgezeichnete und geduldige Betreuung während meiner gesamten Arbeit. Zusätzlich für seine fachmännische Hilfestellung bei der Erstellung von Diagrammen und Tabellen, aber auch bei sonstigen Problemen beim erstellen dieser Arbeit.

...Herrn Prof. Dr. Dr. Solon Thanos, Leiter der Experimentellen Ophthalmologie der Universitäts-Augenklinik Münster und dem Laborteam der Experimentellen Ophthalmologie der Universitäts-Augenklinik Münster für die hilfreiche und engagierte Zusammenarbeit weit über den experimentellen Abschnitt hinaus.

...Frau Karin Rose, die mir sehr beim Umgang mit den Tieren geholfen hat und zudem bei offenen Fragen immer zur Seite stand.

...Frau Wagener für die exzellente und schnelle Ausführung aller Fotoarbeiten.

...Frau Katrin Wiegers und Frau Eva Pollmüller für die wertvolle sprachliche und grammatikalische Hilfe beim verfassen dieser Arbeit.

...allen anderen hier nicht genannten Kolleginnen und Kollegen, sowie Freunden, die diese aufregende Zeit mit mir bestritten haben, für die Geduld und das mir entgegengebrachte Verständnis.

Münster, im Mai 2006



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster . 48128 Münster

### Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn  
Dr. Peter Heiduschka  
Klinik u. Poliklinik f. Augenheilkunde  
Abt. für Experimentelle Ophthalmologie  
des Universitätsklinikums Münster  
Domagkstr. 15

48149 Münster

Dienstgebäude  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: 431  
Frau Möllers

Aktenzeichen  
50.0835.1.0 (G 23/2001)

20. April 2001

Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 06.03.2001, hier eingegangen am  
14.03.2001

### G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Dr. Heiduschka,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

**Untersuchung der funktionellen Wiederherstellung des traumatisierten Sehnervs der Ratte durch implantierte Mikroelektrodenarrays.**

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr  
Dr. Peter Heiduschka  
Klinik und Poliklinik für  
Augenheilkunde - Abteilung f.  
Experimentelle Ophthalmologie  
d. Universitätsklinikums Mstr.  
Domagkstr. 15

48149 Münster

Herr  
Prof. Dr. Dr. Solon Thanos  
Klinik und Poliklinik für  
Augenheilkunde - Abteilung f.  
Experimentelle Ophthalmologie  
d. Universitätsklinikums Mstr.  
Domagkstr. 15

48149 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

Diese Genehmigung gilt bis zum 30. 04. 2004.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

300 Ratten.

**Auflagen:**

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

**Rechtsbehelfsbelehrung:**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

**Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.**

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

  
Dr. Piontkowski