

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. G.I.W. Duncker

Vergleichende funktionelle und morphologische Beurteilung der Nebenwirkung von  
Chloroquin und Amiodaron auf die Mausretina nach chronischer Gabe per os

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Gulay Turdumambetova

geboren am 10.06.1975 in Frunze (Bishkek, Kirgisistan)

Gutacher:

1. Prof. Dr. G. Duncker

2. Prof. Dr. H. Krastel (Heidelberg)

**29.01.2008**

**05.11.2008**

## **Widmung**

Meinen Eltern, Turdumambetov Aaly und Shygaewa Aina, sowie auch meinen Geschwistern, Gulnara und Timur, die mich während der ganzen Zeit der wissenschaftlichen Tätigkeit sehr stark moralisch unterstützten, widme ich diese Arbeit. Ihre Liebe und Ermutigungen haben mir die Kraft gegeben, diese Arbeit zu Ende zu führen.

## **Kurzreferat**

**Zielsetzung:** Vergleichende und quantitative Analyse der funktionellen und morphologischen Veränderungen der Mausretina nach chronischer Gabe von Chloroquin und Amiodaron. Diese Medikamente zählen zu den kationisch-amphiphilen Arzneimitteln, die eine generalisierte Lipidose verursachen können.

**Material und Methoden:** Die vorliegende Studie basiert auf einem vorausgegangenen, durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführten Experiment. Es erfolgte Elektroretinographie mit der Auswertung der a- und b-Welle, Funduskopie und stichprobenartige Licht- und Elektronenmikroskopie der über 26 Wochen mit Chloroquin (n=25) und über 37 Wochen mit Amiodaron (n=20) behandelten Mäuse (Tagesdosis 150-200 mg/kg KG) sowie Kontrollmäuse (n=19). Im Rahmen der aktuellen Studie wurden die Auswertung der oszillierenden Potentiale des ERG bei mehreren Reizintensitäten, die Beurteilung der funduskopischen Befunde und die systematische Elektronenmikroskopie der Retina nahezu aller Versuchstiere durchgeführt.

**Ergebnisse:** Die Amplituden der oszillierenden Potentiale zeigten ihr Optimum der Auswertbarkeit bei einer Reizintensität von  $100 \text{ mcds/m}^2$ , sowie auch die Gipfelzeit bei  $3000 \text{ mcds/m}^2$  und die Frequenz bei  $10 \text{ mcds/m}^2$ . In der Chloroquingruppe gab es bereits nach 12 Wochen deutliche, im Laufe der Zeit irreversible funduskopische, histologische und bei den meisten Reizintensitäten signifikante ERG-Veränderungen. In den histologischen Präparaten lokalisierten sich lamelläre Einlagerungen vorwiegend in den inneren Netzhautschichten und im retinalen Pigmentepithel. In der Amiodarongruppe waren die oszillierenden Potentiale bei den o.g. optimalen Reizintensitäten signifikant schlechter als in der Kontrollgruppe nach 16 und 22 Wochen. Bei einem Drittel dieser Mäuse wurden nach 22 und 37 Wochen vorwiegend in der Photorezeptorenschicht gelagerte, granuläre Einschlusskörperchen, sowie nach 8, 12 und 32 Wochen, vermutlich auf Störungen im retinalen Pigmentepithel beruhende, funduskopische Veränderungen beobachtet. Die funktionellen und morphologischen Veränderungen waren reversibel.

**Schlussfolgerungen:** Es konnte eine retinotoxische Wirkung sowohl des Chloroquins als auch des Amiodarons nachgewiesen werden. Dabei traten die durch Amiodaronbehandlung verursachten Veränderungen später und in geringerer Ausprägung auf, waren reversibel und basierten vermutlich auf einem anderen Pathomechanismus. Die oszillierenden Potentiale reagierten sensitiver auf toxische Medikamentenwirkung als die a- und b-Wellen.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Kationisch-amphiphile Medikamente: Struktur, Eigenschaften</b>	<b>1</b>
1.1.1 Chloroquin	1
1.1.2 Amiodaron	4
<b>1.2 Lipidspeicherung</b>	<b>9</b>
1.2.1 Medikamenten-induzierte Lipidspeicherung	9
1.2.2 Formen der Speichereinschlusskörperchen	9
<b>1.3 Retina der Maus</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Elektrophysiologische Untersuchungen der Netzhaut</b>	<b>14</b>
1.4.1 Ganzfeld-ERG	15
1.4.2 Oszillierende Potentiale: Charakteristika	15
<b>2 Fragestellung und Ziel</b>	<b>17</b>
<b>3 Material und Methodik</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Vorausgegangene Arbeit</b>	<b>18</b>
3.1.1 Vorstellung und Haltung der Versuchstiere	18
3.1.2 Elektroretinographische Untersuchung	20
3.1.3 Funduskopische Untersuchung	21
3.1.4 Histologische Untersuchung	21
3.1.5 Ergebnisse der vorausgegangenen Forschungsarbeit	22
<b>3.2 Die Arbeit im Rahmen der vorliegenden Studie</b>	<b>23</b>
3.2.1 Auswertungsparameter des ERG	23
3.2.2 Beurteilung der funduskopischen Untersuchungen	23
3.2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	23
3.2.4 Statistik	24
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>25</b>
<b>4.1 ERG Ergebnisse</b>	<b>25</b>
4.1.1 Abhängigkeit der Messergebnisse von der Lichtintensität	25
4.1.2 Vergleich der Frequenzen	27
4.1.3 Vergleich der Amplituden	28
4.1.4 Vergleich der Gipfelzeiten	30
4.1.5 Zusammenfassung der ERG-Veränderungen	31
<b>4.2 Ergebnisse der funduskopischen Untersuchungen</b>	<b>32</b>
4.2.1 Kontrolltiere	32

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
4.2.2 Chloroquintiere	32
4.2.3 Amiodarontiere	33
4.2.4 Korrelation zwischen den ERG- und funduskopischen Befunden	33
<b>4.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen</b>	<b>35</b>
4.3.1 Kontrolltiere	35
4.3.2 Chloroquintiere	35
4.3.3 Amiodarontiere	37
4.3.4 Korrelation zwischen den ERG- und histologischen Befunden	37
4.3.5 Lokalisation der Einlagerungen	39
4.4 Korrelation zwischen den histologischen- und funduskopischen Befunden	39
<b>5 Diskussion</b>	<b>40</b>
<b>5.1 Abhängigkeit der Parameter der oszillierenden Potentiale von der Lichtintensität</b>	<b>40</b>
<b>5.2 Diskussion der Ergebnisse in der Chloroquingruppe</b>	<b>41</b>
5.2.1 Funduskopie	41
5.2.2 Histologie	41
5.2.3 ERG	44
<b>5.3 Diskussion der Ergebnisse in der Amiodarongruppe</b>	<b>45</b>
5.3.1 Funduskopie	45
5.3.2 Histologie	45
5.3.3 ERG	52
<b>5.4 Korrelation zwischen den histologischen- und funduskopischen Befunden</b>	<b>53</b>
<b>5.5 Korrelation zwischen den funktionellen und morphologischen Befunden</b>	<b>54</b>
<b>5.6 Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen</b>	<b>55</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>8 Anlage</b>	<b>63</b>
<b>Thesen</b>	<b>69</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen, Symbole, Fremd- und Fachwörtererläuterungen

<b>ÄKS</b>	Äußere Körnerschicht
<b>Albinen</b>	Die Tiere mit genetisch-bedingter fehlender Pigmentierung (Melaninmangel)
<b>Amsler Grid</b>	Gitterlinien an einem weißen Blatt mit einem schwarzen Punkt in der Mitte. Es wird als Selbsttest für die Makulopathie verwendet.
<b>ÄPS</b>	Äußere plexiforme Schicht
<b>AS</b>	Außensegment der Photorezeptorenschicht
<b>Bulbus</b>	Augapfel
<b>Bull's eye</b>	Makulopathie, die funduskopisch wie Ochsenauge aussieht
<b>Chalazion</b>	Lidpathologie, in derer Grund Cyste der meibomischen Drüse liegt
<b>D</b>	Dioptrien (Refraktionseinheiten)
<b>ERG</b>	Elektroretinographie bzw. Elektroretinogramm
<b>EOG</b>	Elektrookulographie bzw. Elektrookulogramm
<b>GKG</b>	Gesamte Kontrollgruppe
<b>GZ</b>	Ganglienzellen
<b>GZS</b>	Ganglienzellschicht
<b>HE</b>	Harte Exsudate (Lipideinlagerungen, typisch bei erhöhter Permeabilität der Gefäßwände)
<b>IKS</b>	Innere Körnerschicht
<b>IPS</b>	Innere plexiforme Schicht
<b>In vivo</b>	im lebenden Organismus
<b>In vitro</b>	im Reagenzglas
<b>IS</b>	Innensegment der Photorezeptorenschicht
<b>KG</b>	Kontrollgruppe
<b>LE</b>	Lokale Einlagerungen
<b>Neovaskularisation</b>	Gefäßneubildung
<b>NFS</b>	Nervenfaserschicht
<b>NH</b>	Netzhaut
<b>OP</b>	oszillierende Potentiale
<b>p</b>	Irrtumswahrscheinlichkeit
<b>Perimetrie 10-2</b>	Gesichtsfelduntersuchung des zentralen Bereiches (10 Grad)
<b>per os</b>	Per orale Gabe
<b>pK</b>	Das Parameter, das die Kapazität der Moleküle für Protonenaufnahme zeigt
<b>PRS</b>	Photorezeptorenschicht
<b>RPE</b>	retinales Pigmentepithel
<b>Sensitivitätsthreshold</b>	Der minimale Lichtreiz, der die Antwort der Netzhaut initiiert
<b>Skotom</b>	Gesichtsfeldausfall
<b>VG</b>	Versuchsgruppe
<b>VECP</b>	Visuell evozierte kortikale Potentiale
<b>WFV 1</b>	weißfleckige Veränderungen Typ 1, die als Einlagerungen aussehen
<b>WFV 2</b>	weißfleckige Veränderungen Typ 2, die eher auf Pigmenblattstörungen ruhen

## **1 Einleitung**

Medikamente verfügen neben den therapeutischen auch über unerwünschte Nebenwirkungen, die den klinischen Einsatz dieser Heilmittel limitieren. Eine Reihe von Medikamenten wie das Antimalariamittel und Antirheumatikum Chloroquin (14, 28, 50, 58), das Antiarrhythmikum Amiodaron (84, 85), das Herz-Kreislauf-Arzneimittel Perhexilin (40, 58), das Antiparasitikum Suramin (89), das Chemotherapeutikum Tamoxifen (54, 55, 58, 59), das Anorektikum Chlorphentermin (29, 58) und das antivirale Pharmakum Tiloron (15) verursachen ähnliche organische, u.a. retinale und/oder korneale Veränderungen wie bei einigen genetisch-bedingten Speicherkrankheiten (M. Fabry, M. Tay-Sachs, M. Nieman-Pick und M. Krabbe). Diese Veränderungen, die eher durch biochemische Eigenschaften als durch ihre therapeutische Wirkung hervorgerufen werden, führen am häufigsten zur generalisierten Lipidose. Alle diese Präparate haben einen amphiphilen Charakter. Sie enthalten in ihren Strukturformeln sowohl einen oder mehrere hydrophobe-lipophile aromatische Ringe, die mit dem hydrophobischen Teil der Lipide agieren, als auch eine hydrophile Aminogruppe, die sich an den polaren Teil der Lipide, z.B. Phosphatgruppe bindet (56). In der Regel haben sie darüber hinaus die Fähigkeit, die Zellwände passiv zu durchdringen (58), wodurch die intrazelluläre Speicherung der Medikamente möglich wird.

### **1.1 Kationisch-amphiphile Medikamente: Struktur, Eigenschaften, gemeinsame Nebenwirkung**

#### **1.1.1 Chloroquin**

**(Resochin®, Weimerquin®, Nivaquine®, Silbesan®, Chlorochin®, Aralens®)**

**Substanz, Metabolismus, Pharmakokinetik, Wirkungsmechanismen, Nebenwirkungen**

Chloroquin ist biochemisch betrachtet ein 4-Aminocholinderivat mit der molekularen Formel C<sub>18</sub>-H<sub>26</sub>-Cl-N<sub>3</sub> (Abb. 1). Seit den 50er Jahren wird es für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis, des systemischen Lupus erythematoses und anderer rheumatischer und dermatologischer Erkrankungen angewendet. Chloroquin wird auch als antiinfektiöses Mittel erfolgreich angewendet. Es hat ein breites Wirkungsspektrum gegen die Protozoen Plasmodium vivax, malariae und ovale, sowie Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, den Erreger von Lambliasis, und verschiedene Arten von Babesia, die eine der Malaria etwas ähnliche Infektion, Babesiose, bei Menschen und Tieren hervorrufen.

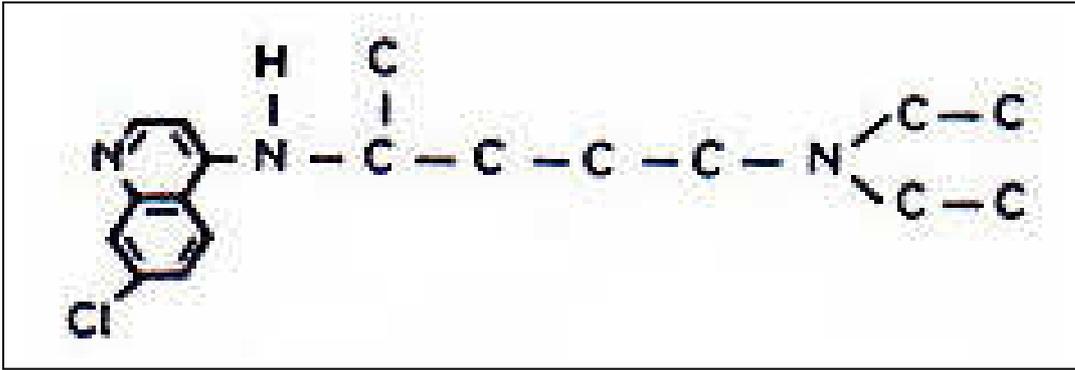


Abb. 1. Strukturformel des Chloroquins

Chloroquin wird schnell und fast komplett (90%) aus dem gastrointestinalen Trakt resorbiert. Die maximale Konzentration im Plasma erreicht das Medikament in ein bis zwei Stunden nach per os Gabe (33). Sein Hauptmetabolit ist Desethylchloroquin, das in seiner Wirkung im Vergleich zum Chloroquin etwas schwächer ist. Das Medikament erreicht im Herzen, in der Lunge und der Niere eine um mehr als 10-fache, in Erythrozyten eine 40-50-fache, in den parenchymatösen Zellen eine bis zu 500-fache (in der Leber eine 200-700-fache), und in den pigmentierten Zellen der Chorioidea und Retina eine bis zu 1000-fache Plasmakonzentration (34, 65, 79). Seine Bioverfügbarkeit beträgt ca. 50%. Die Eiweißbindung des Chloroquins liegt bei ca. 50-55%, in Vollblut ist es meistens an Erythrozyten gebunden (65).

Chloroquin wird zu 40-70% über die Nieren und zu einem kleinen Teil über den gastrointestinalen Trakt ausgeschieden. Die Halbwertszeit variiert je nach Applikationsart von drei Stunden bis zu zwei Monaten (34, 79). Ausschlaggebend für die Nebenwirkung bei hoher Dosierung ist Kumulation.

Bei rheumatischen und dermatologischen Erkrankungen beträgt die Tagesdosis üblicherweise 4 mg/kg KG. Bei der Behandlung der Malaria ist die Dosierung deutlich höher (1500-1800 mg/d). Es wird empfohlen, das Medikament abzusetzen, wenn nach einer sechsmonatigen Therapie einer rheumatischen Erkrankung bzw. nach einer zweitägigen Behandlung eines akuten Malariaanfalls keine Besserung aufgetreten ist (34, 79).

Als okuläre Nebenwirkung kommt es in 30-75% der Fälle zu einer Cornea verticillata (48, 58). Es handelt sich dabei um epitheliale wirbelförmige Hornhauttrübungen, welche durch intrazelluläre lamelläre Einschlüsse hervorgerufen werden (36). Dabei geben die Patienten in 50% der Fälle schon nach ein paar Behandlungsmonaten eine Beeinträchtigung der Sehschärfe und Halos um Lichtquellen an (48, 64, 65).

Darüber hinaus verursachen lamelläre Einschlusskörperchen eine Myopathie der extraokulären Muskeln (65). Die Akkumulation von multiplen lamellären Inklusionen in der Linse führt in Tierexperimenten zu den subkapsulären Trübungen (27).

Eine durch Chloroquintherapie verursachte Retinopathie wurde zuerst von Hobbs et al. (1959) beschrieben (47). Die Häufigkeit der Chloroquin-Retinopathie variiert in Abhängigkeit von den Diagnosekriterien und von den Angaben verschiedener Autoren von 0,001% bis 58% (60, 62, 73).

Dabei sind zwei Krankheitsbilder zu unterscheiden: Eine früh auftretende reversible Prämakulopathie (62, 102) und eine spät auftretende irreversible Retinopathie (31, 48, 102).

Die Prämakulopathie, die sich ophthalmoskopisch als Irregularität des Pigmentes mit Verlust des fovealen Reflexes sowie funktionell durch Skotome bei der Gesichtsfeld-Untersuchung mit rotem Stimulus und Farbsinnstörung äußert, tritt bereits nach einem Jahr der Therapie bei 4% bis 40% der Patienten auf (71, 82).

Bei der irreversiblen Retinopathie, die mit einer Inzidenz von 13% zu finden ist, zeigt sich klinisch ein retinales und subretinales Ödem mit Pigmentstörungen (Schießenscheibenmakula („bull’s eye“)) (Abb.2), die mit zentralem und parazentralen Skotomen und einer Sehschärfenminderung einhergehen (6, 17, 64, 82).

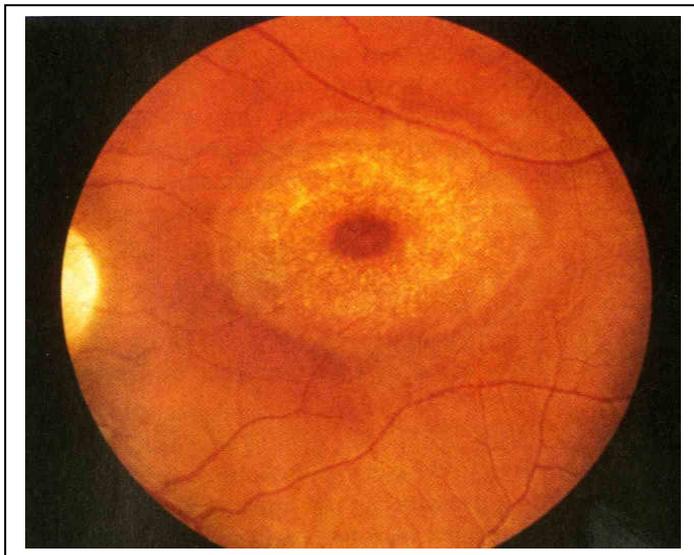


Abb. 2. „Bull’s Eye“ Chloroquin-Makulopathie (J.Kanski. Klinische Ophthalmologie, 2004)

Später entwickeln sich die Pigmentstörungen in der Peripherie der Netzhaut vergleichbar mit den bei der Retinitis pigmentosa (17). Die Retinopathie kann auch nach dem Absetzen des Medikamentes weiter fortschreiten (6, 47, 48, 71). Diese Retinopathie zählt durch ihre Irreversibilität zu den schwerwiegendsten Komplikationen der Chloroquintherapie.

Das Risiko einer Chloroquin-Retinopathie wird von einer Reihe Autoren bei einer Tagesdosis

von weniger als 4 mg/kg (vergleichbar mit Standardtagesdosis von 250 mg) unabhängig von Therapiedauer und kumulativer Dosis als sehr gering eingeschätzt (17, 19, 31, 34, 73, 79).

Andere Autoren betonen dagegen, dass schon ab einer kumulativen Dosis von 100 g mit der Entwicklung einer Retinopathie zu rechnen ist (12). Das Risiko steigt ab einer kumulativen Dosis von 300 g. Bei einer gesamten Dosis über 900 g wird eine über 58%ige Inzidenz der Retinopathie angegeben (12, 60, 70). Zwischen der Retinopathie und dem Geschlecht sowie dem Alter läßt sich keine Korrelation feststellen (73).

Durch die American Academy of Ophthalmology (AAO, 2002) werden folgende Risiko-Faktoren als hoch eingestuft: eine Dosis ab 3 mg/kg, eine Therapiedauer von mindestens 5 Jahren, vorhandene Leber/Nieren- sowie Netzhauterkrankungen und ein Alter von über 60 Jahren. Bei Patienten mit diesen Risiko-Faktoren ist eine jährliche ophthalmologische Untersuchung (Visus, Amsler-Netz bzw. Perimetrie nach Humphrey 10-2, Farbsinntest, Ophthalmoskopie) zu empfehlen. Bei einem Verdacht bzw. klaren Zeichen retinaler Toxizität sollte die Chloroquinbehandlung abgebrochen werden. In Zweifelsfällen ist eine ophthalmologische Untersuchung in 3 Monaten zu wiederholen. Bestehen keine Risiko-Faktoren, sollten die Patienten initial und dann, bei unauffälligem Befund, je nach Alter ein bis vier-jährlich untersucht werden (32, 63).

Die Chloroquin-Charakteristiken sind in Tab. 1 zusammengefasst.

### 1.1.2 Amiodaron

(Amiodarex®, Tachydaron®, Cordarex®, Cordarone®, Amiohexal®, Amiodura®)

Amiodaron ist ein diiodiertes Benzofuranderivat mit der Formel  $C_{25}H_{29}I_2N_2O_3 \cdot HCl$  (Abb. 3).

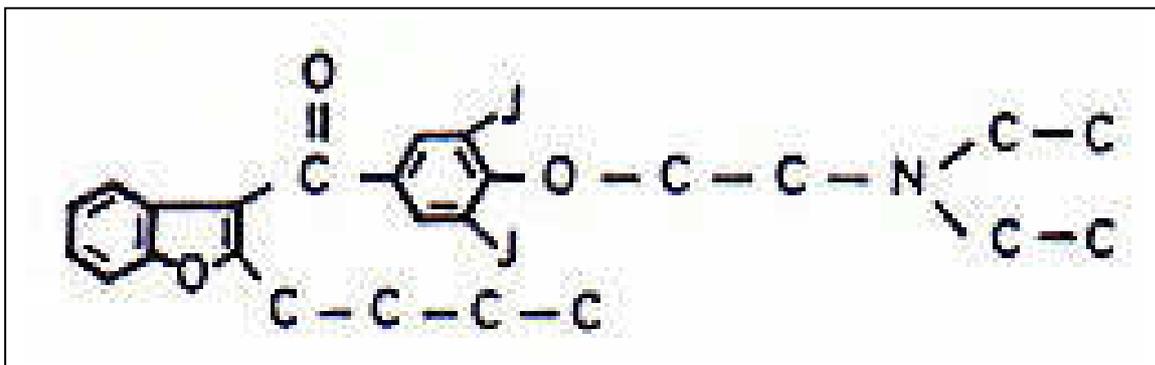


Abb. 3. Strukturformel des Amiodarons

Das Medikament wurde vor ca. 40 Jahren zunächst zur Behandlung der Angina pectoris

eingeführt. Einige Jahre später wurde seine antiarrhythmische Wirkung bekannt und seitdem wird das Amiodaron bei nicht anders zu beherrschenden lebensgefährlichen Herzrhythmusstörungen (ventrikulären Tachykardien, Fibrillationen oder supraventrikulären Arrhythmien) eingesetzt (86).

Amiodaron wird bei per os Applikation langsam resorbiert und erreicht seine maximale Plasmakonzentration ca. drei bis sieben Stunden nach Einnahme, seine Bioverfügbarkeit beträgt ca. 50% mit Variationen der Angaben von 20 bis 80% (66). In Rattenexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Amiodaronkonzentration im Gehirn-Gewebe und Blut am niedrigsten und im Fettgewebe am höchsten ist (80). Das Fettgewebe dient als Depot für Amiodaron. In Plasma binden sich ca. 96% des Medikaments an Proteine, überwiegend an Albumine und weniger an  $\beta$ -Lipoproteine (66). In der Leber werden ca. 99% des Amiodarons zu Desäthylamiodaron metabolisiert, welches die gleiche pharmakologische Wirkung hat. Etwa 1% des Amiodarons wird durch die Nieren unverändert ausgeschieden (61). Einen therapeutischen Effekt hat das Medikament bereits bei einer Plasmakonzentration von 0,5 bis 2,0 bzw. 2,5  $\mu\text{g/ml}$  (53, 57). Die Nebenwirkungen des Medikamentes werden ab einer Amiodaronplasmakonzentration von 2,0 bzw. 2,5  $\mu\text{g/ml}$  (53, 57, 74, 94) und einer Desäthylamiodaronkonzentration von 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , entsprechend einer Tagesdosis von mindestens 300 - 600 mg/d beobachtet (45, 58). Nach Angaben anderer Autoren, hängen die Nebenwirkungen von einer kumulativen Dosis ab und wurden schon ab 9 g nachgewiesen (45, 49). Wie auch bei den anderen kationisch-amphiphilen Medikamenten kann die Eliminationshalbwertszeit von Amiodaron relativ lang sein und zwischen 20 und 160 Tagen variieren, was sich auch in der Reversibilität der Nebenwirkungen widerspiegelt (57, 86, 102).

Die Inzidenz der Toxizität von Amiodaronbehandlung schwankt je nach Kriterien von 5% bis 93% (43, 45, 53, 74, 86). Dies führt bei 1 bis 26% der Patienten zum Absetzen der Therapie (86).

Die ersten Amiodaron-bedingten Veränderungen am Auge wurden von Francois 1968 beschrieben (37). Amiodaron-Lipidkomplexe akkumulieren in der Bindehaut, Hornhaut, im Epithel des Ziliarkörpers und der Iris, in der Linse, Aderhaut, Netzhaut, dem Sehnerven, im Endothel der Gefäße und in extraokulären Muskeln (13, 24, 39).

Die Hyperpigmentation und Irritation der Augenlidhaut wurden bei 5% der Patienten (49, 97), das Syndrom des trockenen Auges durch die Senkung der Tränendrüsensekretion bei 16% der Patienten und das Auftreten multipler Chalazien in Einzelfällen beschrieben (53, 61, 94, 97).

Die bekanntesten okulären Nebenwirkungen von Amiodaron sind wie bei Chloroquin die

epithelialen wirbelförmigen Hornhauteinlagerungen (Cornea verticillata, Abb. 4), die sich bei 70-100% der mit Amiodaron behandelten Patienten innerhalb von ein bis sechs Monaten entwickeln (25, 39, 49, 52, 53). Die Patienten können Farbkreise um Lichtquellen, erhöhte Lichtempfindlichkeit und extrem selten auch eine Sehverschlechterung empfinden, wobei alle Symptome und die Korneaeinlagerungen nach dem Absetzen des Amiodarons innerhalb von 3-20 Monaten rückläufig sind (24, 49, 53).

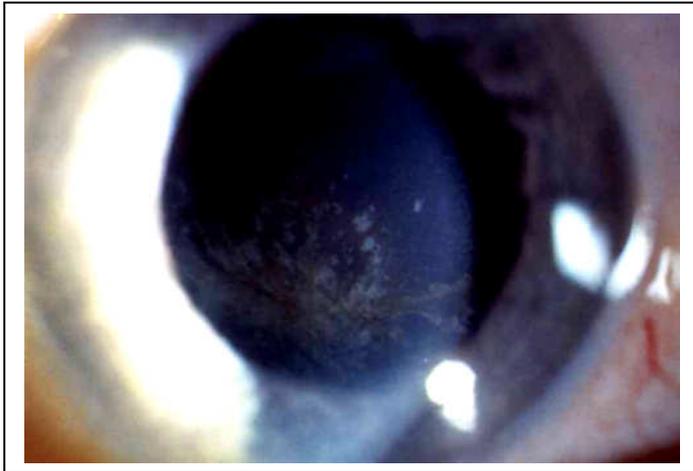


Abb. 4.  
Ausgeprägte Cornea verticillata mit typischen wirbelförmigen Einlagerungen im unteren Drittel nach 24-monatiger Amiodaron-Therapie bei einem 80-jährigen Patienten.

Die bis heute beschriebene schwerwiegendste Nebenwirkung von Amiodaronbehandlung ist die Optikusneuropathie mit Papillenödem und Blutungen. Bei der Hälfte dieser Patienten wird eine irreversible Sehschärfenminderung beobachtet. Die Inzidenz der Optikusneuropathie variiert bei Patienten unter Amiodarontherapie von 1,3% bis 1,79% (35, 41). Jedoch ist die Zahl vom latenten Optikusschaden viel höher, denn die Einschlusskörperchenakkumulation im Sehnerv führt nicht zwingend zu einer klinisch nachweisbaren Optikusneuropathie. Bisher sind 48 publizierte Fälle einer Amiodaron-induzierten Optikusneuropathie bekannt (91).

Die Amiodaron-Charakteristiken sind in der Tab. 1 zusammengefasst.

Nach den Leitlinien des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands (BVA) und der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) sollen Amiodaronpatienten ca. alle sechs Monate ophthalmologisch untersucht werden (99, 102).

Im Unterschied zum Optikusschaden ist ein kausaler Zusammenhang zwischen Amiodaron und einer Retinopathie nicht eindeutig zu sichern.

**Tab. 1. Zusammenfassung der Charakteristiken von Chloroquin und Amiodaron**

	<b>Chloroquin</b>	<b>Amiodaron</b>
<b>Therapeutische Wirkung</b>	Antirheumatikum, Antimalariamittel, Mittel gegen Protozoenerkrankungen	Antiarrhythmikum
<b>Wirkungsmechanismus</b>	<p>1) Chloroquin-Lipid-Komplexe binden sich mit den lysosomalen Enzymen, die extrazellulär freigesetzt sind,</p> <p>2) Inhibition der Lymphozyten Proliferation und Generation des Interleukins-1 (76),</p> <p>3) Stabilisierung der Lysosomenmembranen (76),</p> <p>4) Anbindung an Purin-Basen der DNA Plasmodien und dadurch Hemmung der Nukleinsäuren- und Proteinsynthese (2, 76),</p> <p>5) Chloroquin gelangt in die Verdauungsvakuole der Plasmodien, wo es folgende Enzyme blockiert (81):</p> <p>a) Hydrolasen, so dass der Parasit verhungert;</p> <p>b) Hämpolymerase, so dass Hämoglobin nicht proteolytisch wird.</p>	<p>1) Nicht-kompetitive Hemmung der <math>\alpha</math>- und <math>\beta</math>-adreno-Rezeptoren (61, 86),</p> <p>2) Verminderung der präsynaptischen Freisetzung sympathischer Transmitterstoffe (86),</p> <p>3) Verzögerung des während der Repolarisation aktiven <math>K^+</math>-Ausstroms ohne Störung der Depolarisationsphase, Blockade der <math>Ca^{++}</math>-Kanäle in Slow-Zellen (86).</p> <p>Es führt zu</p> <p>a) Unterdrückung der Spontanautomatie ischämischer Purkinje-Zellen ohne eine Beeinträchtigung der Automatie gesunder Purkinje-Zellen;</p> <p>b) Leitungsblockaden in Kammern und His-Purkinje-Fasern (86) (Depression der Sinus- und AV-Knoten);</p> <p>c) Verlängerung der Refraktärzeit und Aktionsdauer in allen kardialen potentialleitenden Herzzellen (Verlängerung der Aktionsdauer ohne Störung des Ruhepotentials);</p> <p>d) systemischer und koronarer Vasodilatation (57).</p>
<b>Therapeutische Dosis</b>	durchschnittlich 250-400 mg/d (variiert von 100 bis 1000 mg/d bzw. bei Malaria 1800 mg/d), empfohlen bis max.4 mg/kg KG	durchschnittlich 200-600 mg/d (variiert von 100 bis 1400 mg/d),
<b>Allgemeine Nebenwirkungen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Exantheme, Dermatose, Pruritus, Photosensitivität,</li> <li>- Pigmentierungsstörung (Haut, Nägel, Haare) (33, 66, 71, 76),</li> <li>- respiratorische Arrest (66),</li> <li>- Kardiomyopathie, Hypotension (66),</li> <li>- gastrointestinale Störungen: Anorexia, Erbrechen, abdominale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hautdiskoloration, Hyperpigmentierung, Photosensitivität (43, 86),</li> <li>- interstitielle Pneumonie und Lungenfibrose (52, 65, 74, 86, 97),</li> <li>- kardiale Probleme in 2 bis 5% der Fälle (Bradykardie, sinoatriale Blockade, Sinus-Arrest, torsade de pointes) (65, 86),</li> <li>- gastrointestinale Störungen bis auf 33% (Anorexia, Blähungen, Diarrhöe, Erbrechen,</li> </ul>

	Krämpfe, Diarrhöe, Leberschäden (66), - Neuropathien bzw. Myastenie (66), Schlafstörungen, Unruhe, Psychosen (76), Depressionen, Apathie, Müdigkeit, Hörstörung (33, 76) - hämatologischer Effekt (Neutropenie, Anämie, Trombozytopenie, Methämoglobinämie (66).	Bauchschmerzen) (43, 65, 74), Leberstörungen (Erhöhung der Leberenzyme, akute Hepatitis) (57, 65), - zentrale Neuropathie (mit Tremor und Ataxie, Müdigkeit) (43, 45, 74, 86), periphere Polyneuropathie (65, 86), - Schilddrüsenfunktionsstörungen (Hyper- und Hypofunktion) (43, 45).
<b>Zielorgane</b>	Tier Modell: peripheres Nervensystem, Parenchymorgane, Muskeln, Fett, Haut.	
<b>Okuläre Nebenwirkungen</b>	Cornea verticillata, Retinopathie (Störungen im Bereich der GZS, IKS, AKS) (102), Optikusneuropathie (33), Akkomodationsparese, neuromuskuläre Blockade der extraokulären Muskeln (66)	Cornea verticillata (91, 102), Optikusneuropathie (35, 40, 91), trockenes Auge (53, 97)

## **1.2 Lipidspeicherung**

### **1.2.1 Medikamenten-induzierte Lipidspeicherung**

Für den Pathomechanismus der lysosomalen Speicherung durch die kationisch-amphiphilen Medikamente werden folgende zwei Mechanismen diskutiert:

1. Der Mechanismus der direkten „Medikament-Lipid-Interaktion“: Die in dem Zytoplasma und in den Lysosomen protonisierte Gruppe des Medikamentes (Amionogruppe) bindet sich direkt an negativ-geladenen Lipidteil, z.B. Phosphatgruppe. Hier kommt durch den relativ langsamen Ablauf eine graduelle Akkumulation zustande. Dadurch entstehen Komplexe, die für die Enzyme unverdaubar sind. Dieser Mechanismus wird generell den kationisch-amphiphilen Medikamenten zugeschrieben (56, 58, 77).

2. Der Mechanismus „Medikament-Enzym-Interaktion“: Das Medikament stört primär die Funktion des Enzymes direkt oder durch Änderung des pH-Wertes in den Lysosomen. Bei kurzzeitiger Behandlung führt eine rasche intralysosomale Akkumulation der protonisierten Form des Medikamentes durch einen osmotischen Effekt zur Schwellung der Lysosomen und Funktionsstörung der Enzyme. Das intralysosomale Material wird schlecht verdaubar. Bei chronischer Behandlung lagern sich gebildete Chloroquin-Lipid-Komplexe als intralysosomale Strukturen ab (58).

In-vivo besteht für viele Organzellen die Möglichkeit zur Exozytose der abnormalen Lysosome in Kapillaren oder in ein anderes exkretorisches System im Rahmen des Zellschutzes und der Zellreinigung (1). Es wird vermutet, dass das auch der Grund der Reversibilität der lysosomalen Speicherung nach Absetzen der kationisch-amphiphilen Medikamente ist. Im extrazellulären Raum sinkt die Medikamentenkonzentration und die Mechanismen der Zellautoregulation überwiegen. Die Lipid-Medikament-Komplexe dissoziieren, die Lipide werden durch entsprechende Enzyme bearbeitet und die Lipidose löst sich auf, wenn noch keine Zellnekrose vorhanden ist (1, 28, 58).

In der Regel zeigen sich die Veränderungen nach der Behandlung mit den kationisch-amphiphilen Medikamenten als reversible abnormale membrangebundene lysosomale Einschlusskörperchen (58).

## 1.2.2 Formen der Speichereinschlusskörperchen

Man unterscheidet folgende Formen der Einschlusskörperchen (1, 58):

- 1) Vakuolen: Diese entsprechen der Phase der Hydratation. Die „leere Vakuolen“ entstehen bei der oben beschriebenen Schwellung der Lysosomen. Bei Tierversuchen mit Chloroquinapplikation wurden solche Vakuolen in Lymphozyten und Kapillarendothelzellen sowie in Perikarya der Photorezeptorzellen beobachtet. Diese „leere Vakuolen“ können aber ihren ursprünglichen Inhalt durch die Präparation des Materials verloren haben (58). Bei chronischer Gabe der kationisch-amphiphilen Medikamente sieht man meistens keine solchen Vakuolen.
- 2) Kristalloide Einschlusskörperchen: Phase der Dehydratation. Die ungebundenen intralysosomalen Medikamentenmoleküle werden weniger und die sich in einer wässrigen Umgebung befindenden Lipid-Medikamenten-Komplexe werden in eine Lipid-Matrix eingebettet. Je feiner die Struktur der kristalloiden Einschlusskörperchen ist, desto niedriger ist der Wasser- und um so größer ist der Lipid-Anteil. Die Einschlusskörperchen haben meistens hexagonale bzw. rechteckige Struktur (Lipid-Wasser-Kristalle). Im Auge sind solche Einschlusskörperchen nach der chronischen Behandlung mit Lipidose-induzierenden Medikamenten überwiegend im RPE vorhanden.
- 3) Gemischte lamellär-kristalloide Einschlusskörperchen: Sie bilden sich bei weiterer Dehydratation.
- 4) Lamelläre Einschlusskörperchen (Myelin-Figur, Myeloid-Körperchen): Diese entsprechen der späteren Phase der Lipidose und haben entweder eine konzentrische oder eine parallele Anordnung. Lamellen spiegeln die graduelle Akkumulation der Lipide wider: je dichter sie zu einander liegen, desto intensiver und länger läuft der Speicherungsprozess. Der lamelläre Charakter der Einschlusskörperchen wird sowohl auf Fragmente der Biomembranen von Zellen bzw. Organellen als auch auf die Lipid-Medikament-Komplexe zurückgeführt (21, 58).

Für dasselbe Medikament und Tier sind in der Regel beide Hauptformen der Einschlusskörperchen (kristalloid-hexagonale und lamelläre) vorhanden – jede Speicherform ist vom Gewebetyp abhängig, wahrscheinlich wegen der unterschiedlichen Lipide, die in den Zellen metabolisiert werden (58).

Die medikamenteninduzierten Lipidosen sind durch die Akkumulation mehrerer Typen der polaren Lipide, unter anderem Phospholipide und Glykolipide, gekennzeichnet und betreffen

meistens die Orgazellen, die unter normalen Bedingungen auch große Lipidmengen metabolisieren müssen. Bei den experimentellen Versuchen an Ratten zeigten sich ausgeprägte Veränderungen im RPE sowie geringere in den retinalen Ganglienzellen (58).

Im experimentellen Rahmen wäre die Beurteilung morphologischer und funktioneller retinaler Veränderungen bei langfristiger Amiodarongabe wichtig, um die retinale Toxizität feststellen bzw. ausschließen zu können. Bei eingetretender Nebenwirkung wäre auch zu untersuchen, ob sich die Amiodaron-bedingte Retinopathie ähnlich entwickelt wie z.B.beim Chloroquin.

Trotz zahlreicher Berichte über okuläre Nebenwirkungen des Chloroquins und einiger über die des Amiodarons, liegt nach unserem Kenntnisstand bisher keine vergleichende quantitative Einschätzung der funktionellen (durch oszillierende Potentiale des Elektretinogramms dargestellte) und morphologischen (Ophthalmoskopie und elektronenmikroskopische Histologie) Veränderungen bei Mäusen vor.

### **1.3 Retina der Maus**

Die Netzhaut wandelt visuelle Signale in Nervenimpulse um, die weiter über die Fasern des Sehnerven ins zentrale Nervensystem geleitet werden.

Wie beim Menschen besteht die Netzhaut der Mäuse aus folgenden Schichten (von außen nach innen): retinales Pigmentepithel (RPE), Photorezeptorenschicht (PRS), äußere Körnerschicht (ÄKS), äußere plexiforme Schicht (ÄPS), innere Körnerschicht (IKS), innere plexiforme Schicht (IPS), Ganglienzellschicht (GZS), Nervenfaserschicht (NFS) (68, 98, Abb. 5 und 6). Außerdem gibt es noch eine äußere sowie eine mittlere und eine innere Grenzmembran.

1. Das retinales Pigmentepithel (RPE) ist einschichtig, die Zellen besitzen einen Kern und multiple Melanosome. Das RPE trennt die sensorische Retina von der Chorioidea. Seine Basalmembran ist ein Teil der Blut-Retina-Schranke. Die Mikrovilli des RPE erfüllen eine phagozytotische Funktion in Bezug auf die alten Außensegmentdisken der Photorezeptoren, eine Regeneration von Sehpigmenten, den aktiven Transport von Metaboliten und die Absorption von Streulicht (400-800 nm) (98).
2. Die Photorezeptorenschicht (PRS). Die Mäuse haben wie die meisten Mammalia eine

Netzhaut mit Stäbchen und Zapfen. Allerdings variiert der Anteil an Zapfen nach Autorenangaben von 1% bis 10% (67, 83). Die Mäuse haben keine Makula. Sie sind als nachtaktive Tiere auf das Dämmerungssehen eingerichtet, wobei die Hornhaut das Licht sammelt und die große runde Linse die Strahlen auf der gesamten Netzhaut abbildet. Am hinteren Pol finden sich überwiegend die mittelwelligen (grünempfindlichen) sowie in der Peripherie der Netzhaut die kurzwelligen (blauempfindlichen) Zapfen (88). Wie beim Menschen entstehen die Photorezeptoren aus einem Außensegment (mit vielen Disken) und einem Innensegment.

In der Rattenretina erneuern sich die Außensegmente (AS) der Stäbchen innerhalb von neun Tagen (58). Dabei werden pro Tag (24 h) ca. 250-300 autophagische Vakuolen mit AS-Material in den Innensegmenten (IS) und etwa 30000 bis 40000 Diskenmembranen durch eine Pigmentepithelzelle verarbeitet (78).

3. Die äußere Körnerschicht (ÄKS) besteht aus den Zellkernen der Photorezeptorzellen. Die Zapfenkerne sind überwiegend in der äußeren Hälfte der ÄKS lokalisiert und werden allmählich zur Peripherie hin weniger. Mikroskopisch ist diese Schicht durch eine Überlagerung von acht bis zwölf Zellkernen in einer Kolumne gekennzeichnet. Zapfen-Kolumnen bestehen aus ca. fünf Kernen (20, 50).
4. Die äußere plexiforme Schicht (ÄPS) beinhaltet die Fortsätze der Photorezeptorzellen sowie die Dendriten der Bipolar-, Horizontal- und interplexiformen Zellen. Dabei interagieren die Horizontalzellen durch waagerechte Verbindungen mit den Synapsen der Photorezeptorzellen und Bipolarzellen.
5. Die innere Körnerschicht (IKS) wird durch die Zellkerne der Bipolar-, Horizontal-, Amakrinen-, Müller- und interplexiformen Zellen gebildet. Mikroskopisch besteht diese aus drei bis vier lockeren Zellschichten.
6. Die innere plexiforme Schicht (IPS) besteht aus den Fortsätzen der Bipolar-, Amakrinen-, Müller- und interplexiformen Zellen sowie den Dendriten der Ganglienzellen.
7. In der Ganglienzellschicht (GZS) befinden sich die Zellkerne der Ganglienzellen und die Fortsätze der Müller-Zellen.
8. Die Nervenfaserschicht (NFS) erhält nur die Axone der Ganglienzellen, die sich in der Papille des Sehnerven sammeln und dann bis zu den subkortikalen Sehzentren ziehen.

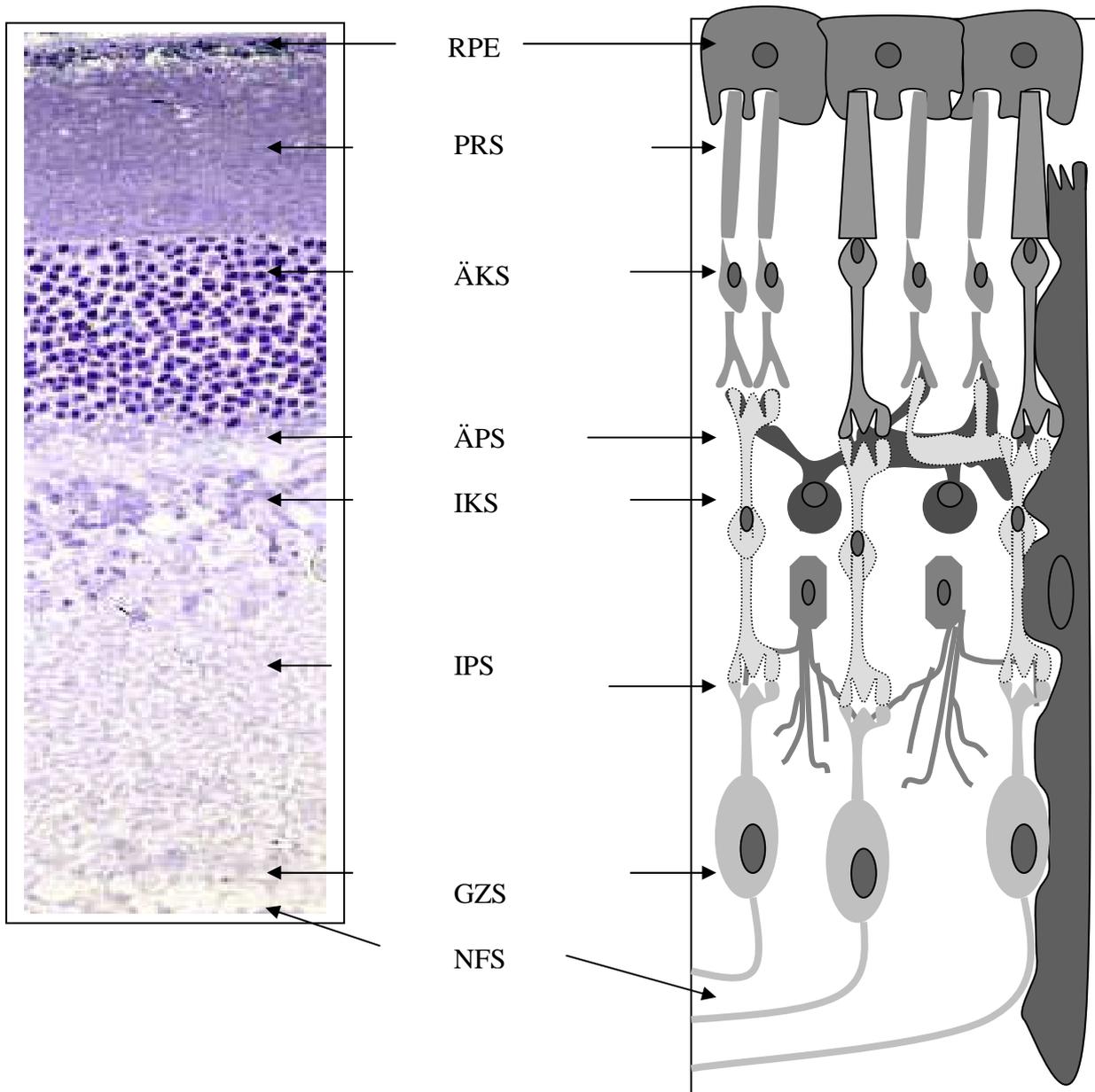


Abb. 5. (links) Retina der Maus.

Toluidinblaufärbung. Lichtmikroskopie (Semidünnschnitt), x200.

Abb. 6. (rechts) Grafische Darstellung der Retinastruktur.

RPE - retinales Pigmentepithel, PRS - Photorezeptorenschicht, ÄKS - äußere Körnerschicht, ÄPS - äußere plexiforme Schicht, IKS - innere Körnerschicht, IPS - innere plexiforme Schicht, GZS - Ganglienzellschicht, NFS - Nervenfaserschicht

Die Versorgung der Netzhaut wird durch zwei Gefäßsysteme gewährleistet: die Choriokapillaren der Aderhaut versorgen die äußeren Schichten (RPE - durch Diffusion, Photorezeptorzellen - mittelbar durch das RPE) und die retinalen Gefäße versorgen die inneren Schichten wie NFS, GZS, IPL und IKS über Kapillaren und die ÄPS durch Diffusion. Bei der Maus sind die Gefäße am hinteren Pol der Netzhaut wie Radspeichen orientiert und bilden in der Peripherie Arkaden. Ophthalmoskopisch sieht der Sehnervendiskus kolobomähnlich aus, da das Myelin schon an der Lamina cribrosa endet (10).

## 1.4 Elektrophysiologische Untersuchung der Netzhaut

Die Netzhautfunktion lässt sich u.a. durch die elektrophysiologischen Methoden wie die Ganzfeld-Elektroretinographie (Ganzfeld-ERG), die Muster-Elektroretinographie (Muster-ERG), die multifokale Elektroretinographie (mf-ERG) und die Elektrookulographie (EOG) nichtinvasiv und dabei objektiv gut untersuchen (7, 9, 51). Die elektrophysiologischen Untersuchungsstrategien stellen die Funktion bestimmter Komponenten der Netzhaut dar (9) (Tab. 2). Nicht selten sind bei noch unauffälligem ophthalmoskopischen Befund bereits Pathologiekurven erkennbar. Deshalb haben die elektrophysiologischen Methoden bei der Früherkennung bestimmter Krankheitsbilder im Auge einen hohen Stellenwert (6).

**Tab. 2. Elektrophysiologische Untersuchungsverfahren zur funktionellen Darstellung verschiedener Netzhautschichten**

<b>Netzhautschichten</b>	<b>Komponente</b>	<b>Untersuchungsverfahren bzw. ERG Komponente</b>
RPE	Retinales Pigmentepithel	EOG, c-Welle des ERG
Photorezeptoren	Zapfen und Stäbchen	a-Welle (spätes Rezeptorpotential von den Innensegmenten der Rezeptoren) des Ganzfeld-ERG und des multifokalen ERG; ERP (frühes Rezeptorpotential von den Außensegmenten der Rezeptoren)
Äußere Körnerschicht	Zellkerne der Photorezeptorzellen	a-Welle des Ganzfeld-ERG und des multifokalen ERG
Äußere Plexiforme Schicht	Fortsätze der Photorezeptorzellen, Dendriten der Horizontal- und Bipolarzellen	a- und b-Wellen des Ganzfeld-ERG und des multifokalen ERG
Innere Körnerschicht	Zellkerne der Bipolar- und Müller-Zellen	b-Welle des Ganzfeld-ERG und des multifokalen ERG
Innere Plexiforme Schicht	Fortsätze der Bipolar- und Amakrinenzellen, Dendriten der Ganglienzellen	oszillierende Potentiale (OP)
Ganglienzellschicht	Ganglienzellen und die Fortsätze der Müller-Zellen	Muster-ERG
Sehnervfasern	Sehnervfasern	Visuell-evozierte kortikale Potentiale (VECP)

Die Ganzfeld-ERG ist bei Mäusen wegen der fehlenden Compliance und wegen der Verteilung der Stäbchen und Zapfen über die gesamte Netzhaut die einzig mögliche adäquate Methode für die Untersuchung der Retinafunktion (20).

### 1.4.1 Ganzfeld-ERG

Die ERG-Kurve hat folgende Komponenten:

- 1) Hauptkomponente: a- und b-Wellen
- 2) Nebenkomponekte: early Rezeptorpotential (ERP), oszillierende Potentiale (OP), c-Welle (Abb. 7).

Die a-Welle entsteht durch die Hyperpolarisation der Photorezeptorzellen. Der Impuls wird durch die Photorezeptoren weiter an die Bipolarzellen geleitet, wodurch eine Depolarisation der b-Welle entsteht. Durch die Bipolarzellen geht der Impuls durch die innere plexiforme Schicht zu den Ganglienzellen und dann weiter durch Optikusnervenfasern zu den cerebralen Sehzentren.

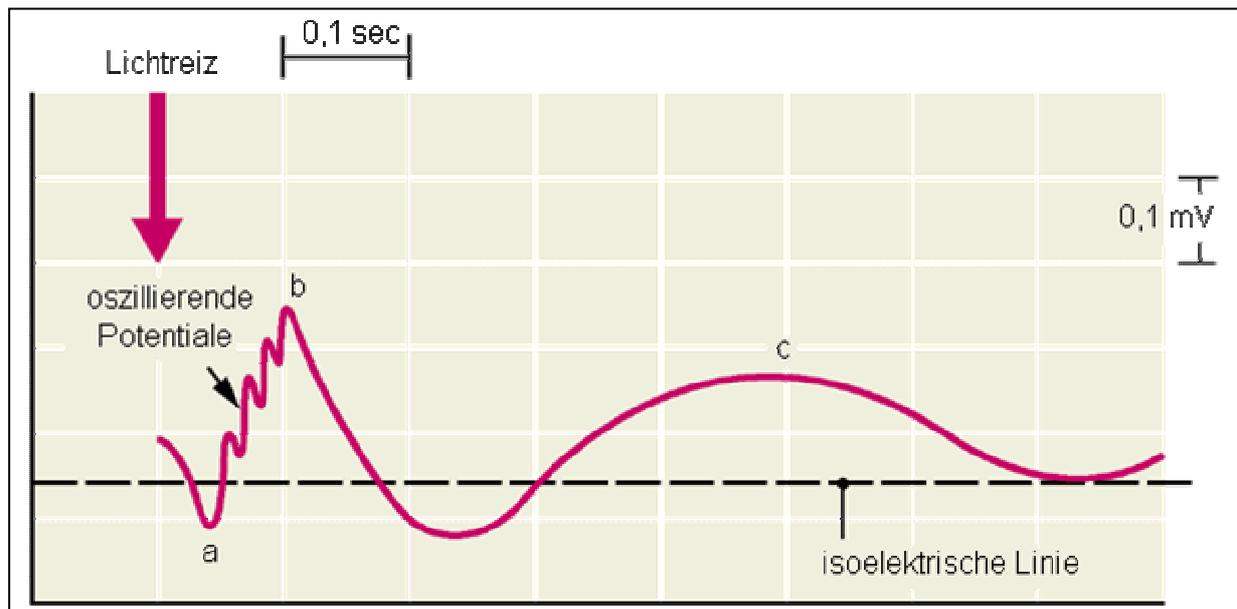


Abb. 7. Elektretinogrammdarstellung nach Th.Axenfeld

(Th.Axenfeld, Lehrbuch und Atlas der Augenheilkunde, Fischer Verlag, 1980)

### 1.4.2 Oszillierende Potentiale: Charakteristika

Die Regulationsaktivität der rücklaufenden Bindungen („feed-back pathways“) aus den inneren zu den äußeren Schichten der Retina (höchstwahrscheinlich von den Dendriten der

neben der Bipolarzellen liegenden Amakrinenzellen) beeinflusst das Aktionspotential der Bipolarzellen, was durch die zusätzlichen Mini-Gipfel an dem steigenden Anteil der b-Welle des ERG als oszillierende Potentiale erkennbar wird (95, 96). Diese spiegeln die schnellen neuronalen Adaptationsprozesse der Netzhaut durch die rücklaufenden Bindungen wider, die die Sensitivitätsschwelle der Amakrinen- und Ganglienzellen regulieren (96).

Registrierbar sind fünf oszillierende Potentiale, dabei sind das IV. und V. OP nicht immer gut erkennbar.

Experimentell wurde herausgefunden, dass bei Primaten das I. bis III.OP in einer Netzhauttiefe (von der Membrana limitans interna nach außen gezählt) von ca. 20%-30%, was dem Niveau der Amakrinenzellen und der IPS entspricht, sowie das IV und V. OP von ca. 40% generiert werden (96).

Die oszillierenden Potentiale sind mittelbar durch Aktivität der Bipolarzellen mit der Funktion von Photorezeptoren verbunden (96). So zeigt sich bei angeborenen Retinopathien mit einem spezifischen Schaden des Stäbchen- oder Zapfensystems durch sekundäre Aktivitätsschwäche der Bipolarzellen eine Reduktion der Amplitude des II. bzw. IV. OP. Das III.OP ändert sich bei einer gemeinsamen Schädigung von beiden Photorezeptorensystemen (96).

Einige Autoren vermuten, dass die oszillierenden Potentiale auch retrograde axoplasmatische Veränderungen und/oder Durchblutungsstörungen in Ganglienzellen sowie Schädigungen der Membranen der Ganglienzellendriten widerspiegeln (92, 96).

Insgesamt stellen die OP die Zusammenarbeit von Amakrinenzellen, Bipolarzellen und Ganglienzellen dar. Dies ist wahrscheinlich der Grund, dass die OP mit ihrer Amplitude und Gipfelzeit auf toxische Einflüsse eher reagieren und empfindlicher sind, als die a- und b-Welle (96). Beim Menschen spiegeln die oszillierenden Potentiale eher die Funktion der zentralen Netzhaut als der Peripherie wider (96). Dies kann für die Diagnostik makulärer Prozesse beitragen.

Die oszillierenden Potentiale der b-Welle werden durch folgende drei Parameter charakterisiert: Frequenz, Amplitude (von isoelektrischer Linie bis zum höchsten Punkt der Potentialkurve nach Isolierung der oszillierenden Potentiale von den a- un b-Wellen) und Gipfelzeit (die Zeit vom Blitz bis zum höchsten Punkt der Potentialkurve). Die oszillierenden Potentiale des humanen ERG haben eine sehr hohe Frequenz (von ca. 90 bis 160 Hz). Da die b-Welle die Frequenz von ca. 25 Hz hat, ist eine Niedrigpassfiltrierung nötig, um die oszillierenden Potentiale darstellen zu können (96).

## 2 Fragestellung und Ziel

Das Ziel unserer Studie besteht in der Einschätzung und dem Vergleich funktioneller und morphologischer Veränderungen der Mausretina nach chronischer Gabe von Chloroquin und Amiodaron durch die Bewertung der oszillierenden Potentiale des im Rahmen tierexperimenteller Arbeit erfolgten Elektroretinogramms und der Funduskopie sowie durch die systematische Durchführung der Elektronenmikroskopie.

Hauptfragestellung der Studie ist, ob die Amiodarongabe zu den nachweisbaren Veränderungen der Mausretina führt?

Darüber hinaus sollten während dieser Studie folgende Fragen bearbeitet und beantwortet werden:

1. Häufigkeit und Intensität der elektronenmikroskopisch nachweisbaren retinalen Veränderungen bei den Laboratoriumstieren.
2. Genaue topographische Zuordnung der pathologischen Veränderungen in der Netzhaut.
3. Sind die durch Chloroquin und durch Amiodaron verursachten retinalen Einlagerungen bei Mäusen vergleichbar?
4. Sind die oszillierenden Potentiale des ERG für die Darstellung der durch Chloroquin- und Amiodarongabe verursachten Veränderungen besser geeignet als die a- und b-Welle?
5. Bei welcher Reizintensität sind funktionelle Veränderungen durch die oszillierenden Potentiale am besten nachweisbar?
6. Korrelation zwischen den funktionellen und morphologischen Befunden.
7. Ist die funduskopische Erkennung von der Lokalisation und Intensität der histologisch nachweisbaren Einlagerungen abhängig?
8. Sind die ophthalmologischen Veränderungen nach dem Absetzen der Medikamente reversibel?
9. Sind die erzielten Ergebnisse mit denen in der Literatur vergleichbar?

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Vorausgegangene Arbeit

Im Rahmen des Projektes „Nebenwirkungen kationisch-amphiphiler Medikamente auf die Netzhaut der Maus“ wurden, in vorausgegangener Arbeit, durch die Elektroretinographie die funktionellen sowie durch die Funduskopie und stichprobenartige lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Histologie die morphologischen Untersuchungen der mit Chloroquin- und Amiodaron behandelten Mäuse durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt (16, 54, 55, 84, 85). Im Abschnitt 3.1.5 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen geschildert, die unsere aktuelle Forschungsarbeit erforderten.

##### 3.1.1 Vorstellung und Haltung der Tiere

Für das Experiment wurden weibliche pigmentierte Mäuse vom Stamm C57BL genommen.

Das Alter der Tiere betrug zum Beginn des Versuches 4 Wochen. Die Versuchsgruppen bestanden aus den mit Chloroquin (n=25) und mit Amiodaron (n=20) behandelten Tieren. Die Medikamentenapplikation dauerte 26 Wochen für die Chloroquingruppe und 37 Wochen für die Amiodarongruppe.

Die Kontrollgruppe bestand aus 10 Mäusen (kleine Kontrollgruppe), bei denen der Beginn des Experimentes identisch mit den Versuchsgruppen war und 9 anderen Kontrolltieren, bei denen die Beobachtungszeit 5 Wochen davor (n=6) bzw. 4 Wochen danach (n=3) begann. Bei allen Gruppen endete das Experiment gleichzeitig. Dem zufolge dauerte der Versuch 65 Wochen für die Versuchs- und kleine Kontrollgruppen bzw. 61 oder 70 Wochen für die weiteren Kontrolltiere. Die Dauer des Versuches und die Anzahl der Tiere werden mittels der Abb. 8 und Tab. 3 demonstriert.

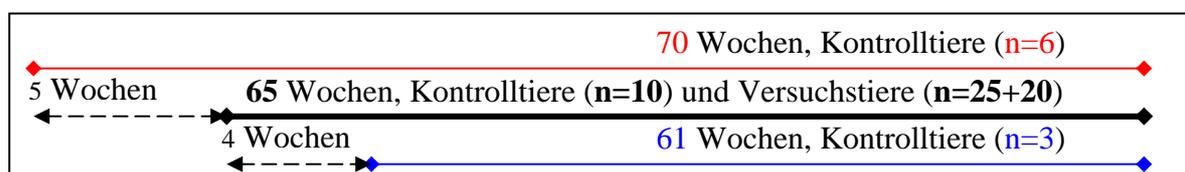


Abb. 8. Versuchsdauer für die Experimentgruppen

Die Mäuse wurden im Tierstall in standardisierten Käfigen zu je 5 oder 6 Tieren gehalten. Fütterung erfolgte mit dem gemahlten standardisierten Normalfutter Altromin-Lage aus speziellen Futtertrögen. Diese ermöglichten einen freien Zugang zum Futter und minimierten das Verspielen von Futter. Alle 2-3 Tage wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert, die

verbrauchte und verspielte durch Aussieben der Spreu vom Boden des Käfigs sowie die effektiv gefressene Futtermenge bestimmt.

Die applizierte Tagesdosis für Amiodaron- und Chloroquingruppe betrug 150-200 mg/kg KG. Da die Menge des verspielten und verbrauchten Futters (Normalfutter und Medikamentenzusatz) und das Körpergewicht der Mäuse variierten, war auch die tatsächliche Tagesdosis unterschiedlich. Tab. 4 zeigt die eingesetzte Tagesdosis und die Mittelwerte der Tagesdosis der Medikamente für jede Gruppe. Nach dem Absetzen des Medikamentes erhielten die Tiere wieder Normalfutter bis zum Ende des Versuches.

Die Kontrolltiere wurden die ganze Versuchszeit hindurch nur mit dem Normalfutter gefüttert. ERG-Untersuchungen wurden sowohl zum Versuchsbeginn (0 Wochen), als auch nach 4, 8, 12, 16, 22, 32, 37 Wochen und zum Ende des Versuches durchgeführt.

Die Funduskopie erfolgte unmittelbar nach der ERG-Untersuchung nach 8, 12, 32, 37 Wochen und zum Ende des Versuches. Für histologische Zwecke wurden Tiere nach 4, 8, 12, 16, 22, 37 Wochen und zum Ende des Versuches verwendet.

**Tab. 3. Anzahl und Versuchsdauer für die Tiere**

Versuchsdauer in Wochen	Chloroquin- gruppe	Amiodaron- gruppe	Kleine Kontrollgruppe	Große Kontrollgruppe
0	<b>25</b>	<b>20</b>	10	19
4	<b>25</b>	<b>19</b>	9	18
8	<b>22</b>	<b>18</b>	8	17
12	<b>18</b>	<b>14</b>	8	17
16	<b>15</b>	<b>13</b>	8	17
22	<b>12</b>	<b>11</b>	7	16
26	<b>10</b>	<b>9</b>	6	15
32	10	<b>9</b>	6	15
37	10	<b>8</b>	6	15
Ende des Versuches (61-70)	10	6	4	12

Die Anzahl der Tiere während des Medikamentenapplikationszeitraums ist fett gezeichnet

**Tab. 4. Medikamentendosis in Versuchsgruppen**

Dosis des Medikamentes	Chloroquingruppe	Amiodarongruppe
Eingesetzte Tagesdosis	150-200 mg/kg KG	150-200 mg/kg KG
Mittelwert der Tagesdosis für die gesamte Behandlungszeit	208,4 mg/kg KG	176,15 mg/kg KG

### **3.1.2 Elektroretinographische Untersuchung**

#### **a) Vorbereitung zum ERG**

Die Mäuse wurden 14 Stunden vor der Durchführung des ERG in einem dunklen Raum in lichtundurchlässigen Kästen über Nacht dunkeladaptiert.

Die unmittelbare Vorbereitung der Mäuse erfolgte immer am nächsten Tag unter dem Rotlicht: ca. 10 min vor der Ableitung wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Mischinjektion aus Ketavet (100 mg/kg KG) und Rompum (1,5 mg/kg KG) narkotisiert. Pupillendilatation wurde durch Applikation von Tropicamid (Mydrum® AT) erreicht. Die Augen wurden zusätzlich lokal mit Oxybuprocain 0,4% AT anästhesiert.

Der elektrische Kontakt zwischen den Hornhautoberflächen und den Ableitungselektroden wurde durch Applikation von 2%-Methocel-Gel (OmniVision GmbH, Puchheim, Deutschland) ermöglicht. Zwei ringförmige Ableitungselektroden aus Platindraht mit einem Durchmesser von 0,25 mm und einem Ringdurchmesser von 2,5 mm wurden auf den Hornhäuten platziert. Die nadelförmigen Referenzelektroden aus Stahldraht wurden subkutan über dem Nasenrücken eingestochen. Die Erdung erfolgte am Mäuseschwanz mittels Methocel-Gel über eine Metallplatte. Das zu untersuchende Tier wurde dann mit der Messplatte in die Ganzfeldstimulationskugel geschoben.

#### **b) Meßsystem**

##### **Stimulationsgerät**

Das Messsystem (Fa. Roland Consult) bestand aus einem Ganzfeldstimulationsgerät, einem ERG-Verstärker und einer Schiebemessplatte. Die Triggerung und Steuerung der Beleuchtungsstärke erfolgte über den PC.

Das Stimulationsgerät emittierte durch eine Xenonlampe Einzelblitze von 10 µs Dauer. Die Reizintensität war über mehrere Stufen einstellbar.

Der zweikanalige ERG-Verstärker hatte eine Bandbreite von 0,03-1000 Hz. Der Eingangswiderstand betrug 1 MOhm. Eine 100-,1000- oder 10000 Verstärkung war über den PC einstellbar.

Unmittelbar vor der Ableitung erfolgte eine Impedanzmessung der Cornea- und Referenzelektroden, die unter 10 kOhm liegen sollte.

## **Reizbedingungen**

Die Mausretina wurde mit verschiedener Lichtintensität gereizt: 1 mcds/m<sup>2</sup>, 10 mcds/m<sup>2</sup>, 30 mcds/m<sup>2</sup>, 100 mcds/m<sup>2</sup>, 300 mcds/m<sup>2</sup> (jeweils mit einer Frequenz von 0,5 Hz), dann mit 3000 mcds/m<sup>2</sup> (0,2 Hz) und 25000 mcds/m<sup>2</sup> (0,1 Hz).

Die verschiedenen Reizbedingungen wurden aufgrund der unterschiedlichen Rezeptorphysiologie ausgewählt.

Das Auswertungsprogramm ermittelte für jede Lichtintensität die Messergebnisse von 15 Einzelblitzen.

## **Computerauswertung**

Ein Pentium-PC mit dem Betriebssystem Win NT 4,0 und zwei Datenerfassungskarten (DAQ 516 im PCI MIO 16 XE 50 Format und DIO 24 im PCMCIA Format; National Instruments, Ennetbaden, Schweiz) wurde für das Einlesen der Messwerte verwendet. Die originalen ERG-Daten wurden als EXCEL-Dateien gespeichert. Die Bearbeitung der originalen ERG-Daten und die interaktive und manuelle Merkmalsextraktion erfolgten mittels grafischer Programmierung „LabView“. Da die oszillierenden Potentiale einen höheren Frequenzbereich gegenüber der b-Welle haben, wurde nachträglich ein Software-Niedrigpassfilter von 20 Hz benutzt, um die Potentiale selektiv darstellen zu können. Die Übergabe der ermittelten Parameter ins EXCEL-Format erfolgte mittels DDE (Dynamic Data Exchange, Lehnich et al. 1999 und 2000).

### **3.1.3 Funduskopische Untersuchung**

Die indirekte Funduskopie erfolgte mittels Volk Lupe 78 D und die Befunde wurden gleichzeitig als Videoformat (S-VHS) aufgenommen.

### **3.1.4 Histologische Untersuchung**

Nach erfolgter ERG-Messung wurde bei den Tieren in tiefer Narkose der Thorax und dann der linke Vorhof eröffnet.

Das Gefäßsystem wurde mit einer Fixierlösung (3%-iger Glutaraldehyd in 0,1-molarem Phosphatpuffer) perfundiert. Danach wurden beide Bulbi entnommen und in dieselbe Fixierlösung gelegt. Die Gewebe wurden danach in 0,1-molarem Phosphatpuffer gespült und

in 2%-iger ungepufferter Osmiumlösung zwei Stunden nachfixiert. Dann wurden die Gewebe in aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 100% für je 30 Minuten) und zwei Mal in Propylenoxyd für je 15 Minuten entwässert. Die Durchdringungsphase erfolgte über die Reihe von drei Mischungen aus Propylenoxyd mit Araldit für je eine Stunde und drei Mal von reinem Araldit für je zwei Stunden. Dann wurden die Gewebe-Proben in mit Araldit gefüllte Einbettformen eingebettet und polymerisiert.

Semidünnschnitte (0,5 µm) von vorbereiteten Proben wurden mittels Glasmesser am Ultramikrotom angefertigt und mit 0,1%-iger Toluidinblaulösung für die lichtmikroskopische Untersuchung gefärbt. Für die elektronenmikroskopische Histologie wurden die Gewebe weiter bearbeitet und vorbereitet (Beschreibung s. unten). Die lichtmikroskopischen bzw. elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Netzhaut wurden stichprobenartig (bei 5 Amiodarontieren, 2 Chloroquin- und 2 Kontrolltieren) im Rahmen des oben genannten Projektes durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt (16, 84, 85).

### **3.1.5 Ergebnisse der vorausgegangenen Forschungsarbeit**

1. In der Chloroquingruppe zeigten sich nicht-signifikante geringe Verzögerungen der Gipfelzeit der a- und b-Welle und signifikante Amplitudenabnahme (nicht publizierte Arbeit von P.Harm). In der Amiodarongruppe ergab sich bei Standardreizintensität kein Unterschied der a- und b-Welle zur Kontrollgruppe (84, 85).
2. Bei beiden untersuchten Chloroquinmäusen sind Lipidosezeichen in der Ganglienzellschicht, inneren Körnerschicht und im RPE gefunden worden. In der Amiodarongruppe zeigten sich Lipidosezeichen in den Außensegmenten der Photorezeptoren bei 3 von 5 untersuchten Tieren ausschließlich bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen (84, nicht publizierte Arbeit von P.Harm).

## **3.2 Die Arbeit im Rahmen der vorliegenden Studie**

### **3.2.1 Auswertungsparameter des ERG**

Für die Auswertung der funktionellen Daten verwendeten wir die Daten von den 10 Mäusen, bei denen der Beginn der Versuchszeit identisch mit dem Beginn der Versuchsgruppen war, um die möglichen technischen bzw. zeitlichen Einflüsse auf das Elektroretinogramm auszuschließen.

Die Auswertung der Parameter der oszillierenden Potentiale, d.h. der Frequenz, der Gipfelzeit und der Amplitude des II.OP erfolgte mittels grafischer Programmierung „LabView“. Das I. OP blieb unberücksichtigt, da dessen Kurvenart sich von den anderen OP deutlich unterscheidet und sehr variabel ist. Die III. bis V. OP sind nicht immer vorhanden bzw. registrierbar (4, 96).

### **3.2.2 Beurteilung der funduskopischen Untersuchung**

Für die morphologische Einschätzung der Retina beurteilten wir die gespeicherten funduskopischen Befunde und führten die elektronenmikroskopische Untersuchung durch. Dabei wurden u.a. die Tiere aus der gesamten Kontrollgruppe (n=19) einbezogen, da hierbei keine der oben genannten Einflüsse auf die Untersuchungsergebnisse zum Tragen kamen.

Aus dem Videoformat (S-VHS) wurden mit dem Programm FAST Capture digitalisierte Einzelbilder aufgenommen und dann mit dem Photoshop 7 weiterbearbeitet, systematisiert und beurteilt. Funduskopie-Aufnahmen waren von den 49 Tieren beurteilbar.

### **3.2.3 Histologische Untersuchung**

Wir führten lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen bei insgesamt 41 Laboratoriumstieren systematisch durch: bei 15 Amiodaron-, 17 Chloroquin- und 9 Kontrollmäusen. Bei jeweils zwei von den Amiodaron- und Chloroquintieren, die in der vorausgegangenen Arbeit untersucht worden waren, fehlten die Gewebeproben, allein die mikroskopischen Bilder waren vorhanden. Diese haben wir in die Datenanalyse einbezogen. Tab. 5 stellt die Anzahl der getöteten und histologisch untersuchten Tiere dar. Dabei entspricht die Anzahl der Tiere der Anzahl der untersuchten Augen.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte aus den eingebetteten Netzhaut-Geweben der Mäuse eine Herstellung der Ultradünnschnitte (50 nm dick) mittels eines Diamant-Messers am Ultramikrotom „Ultracut“ (Fa. Reichert-Jung, Optische Werke AG, Wien, Österreich). Dann wurden die Ultraschnitte in Uranylacetat-Gebrauchslösung und

Bleizitrat-Lösung doppelkontrastiert und mittels Trägernetze in spezielle Grid-Boxe eingelegt. Die Präparate wurden unter dem Elektronenmikroskop „EM 902 A“ (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht und fotografiert.

**Tab. 5. Anzahl der histologisch untersuchten Tiere**

Versuchsdauer in Wochen	4	8	12	16	22	37	61-70	Insgesamt	Durchschnitt
Chloroquingruppe (n=25)	3	4	2	2			8	19	17
Amiodarongruppe (n=20)		3	2	2	1	3	6	17	15
Gesamte Kontrollgruppe (n=19)		1		1			7	9	9
Gesamt (n=64)	2	8	4	5	1	3	22	45	41

### 3.2.4 Statistik

Für die statistische Bearbeitung der ERG-Werte wurde das Programm SPSS 12.0 verwendet. Mittels der explorativen Datenanalyse wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte, sowie auch Maximum und Minimum bestimmt. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Liliefors und Shapiro-Wilks-Test (für Stichproben mit  $n < 50$ ) wurden die Daten auf Normalverteilung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p > 0,2$  überprüft. Mit dem Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische unabhängige Gruppen wurden die Mittelwerte von den Versuchstieren mit denen der Kontrolltiere verglichen. Für die exakte Signifikanz der Irrtumswahrscheinlichkeit (bei  $n < 30$ ) wurde ein  $p < 0,05$  angenommen. Zur grafischen Darstellung wurden Fehlerbalkendiagramme mit einfachem Standardfehler benutzt. Die Analyse der Häufigkeitsdaten der funduskopischen und histologischen Befunde wurde statistisch mit Kreuztabellen und standardisierten Residuen durchgeführt (18). Dabei wurde Verhältnis zwischen standardisierten Residuen und Signifikanzniveau nach A.Bühl verwendet (Tab. 8 in der Anlage).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 ERG Ergebnisse

#### 4.1.1 Abhängigkeit der Messergebnisse von der Lichtintensität

Um die Reizintensität herauszufinden, bei der die Parameter der oszillierenden Potentiale am besten auswertbar sind (was von bestimmten biochemisch-molekularen Prozessen und Funktionen der Netzhautzellen abhängig ist), wurden die Parameter der oszillierenden Potentiale von ERG-Kurven zum Anfang des Experimentes (0 Wochen) für jede Tiergruppe getrennt gemessen.

In Abhängigkeit von der Lichtintensität konnte das Optimum der Auswertbarkeit der ERG-Parameter festgestellt werden: für die Amplitude - bei einer Intensität von 100 mcds/m<sup>2</sup>, für die Gipfelzeit - bei einer Intensität von 3000 mcds/m<sup>2</sup> und für die Frequenz - bei einer Intensität von 10 mcds/m<sup>2</sup> (Abb. 9 A-C).

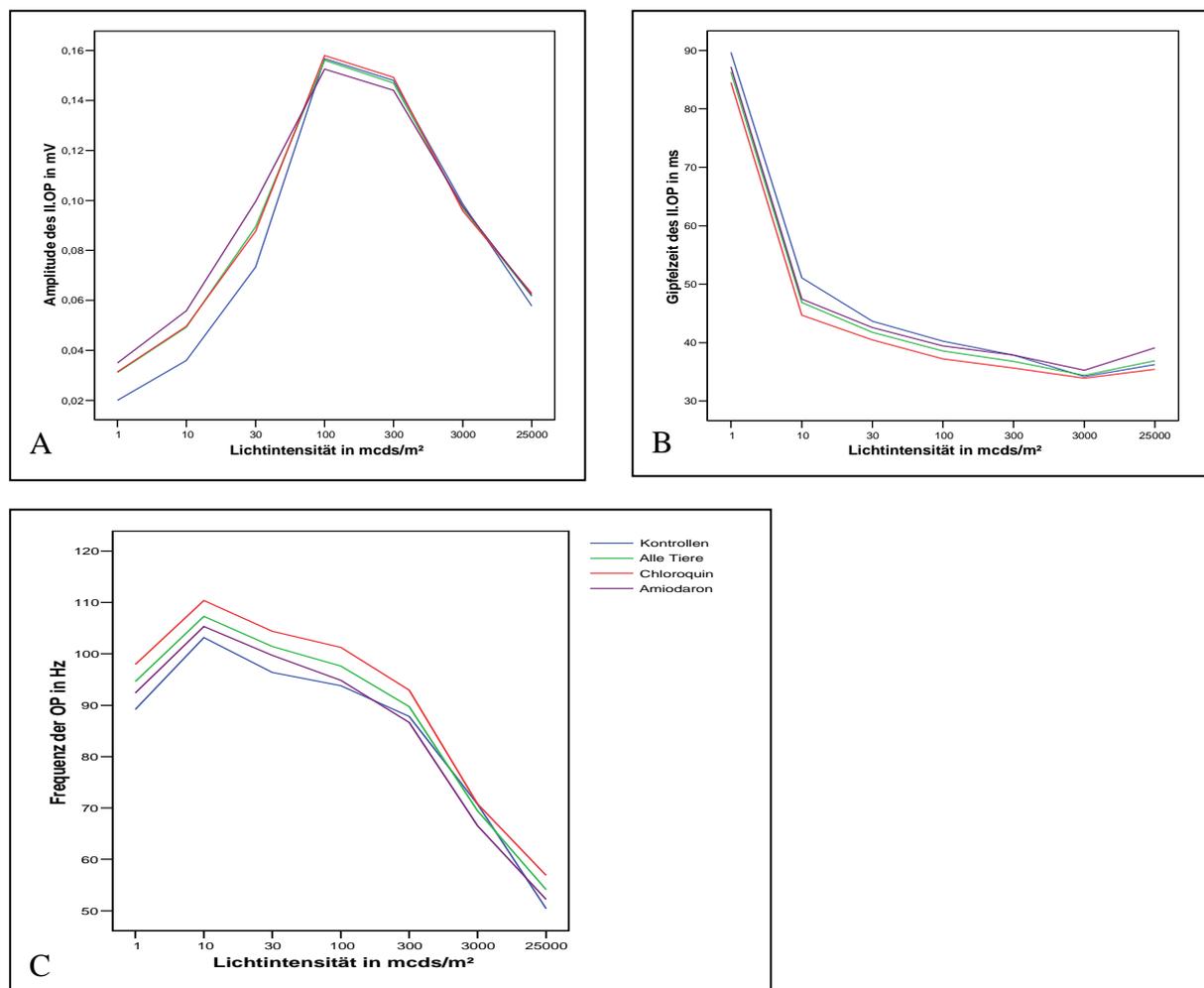


Abb. 9. Mittelwerte der Parameter der oszillierenden Potentiale zum Beginn des Versuches.

A – Frequenz der oszillierenden Potentiale.

B - Amplitude des II. oszillierenden Potentials zum Beginn des Versuches.

C - Gipfelzeit des II. oszillierenden Potentials zum Beginn des Versuches.

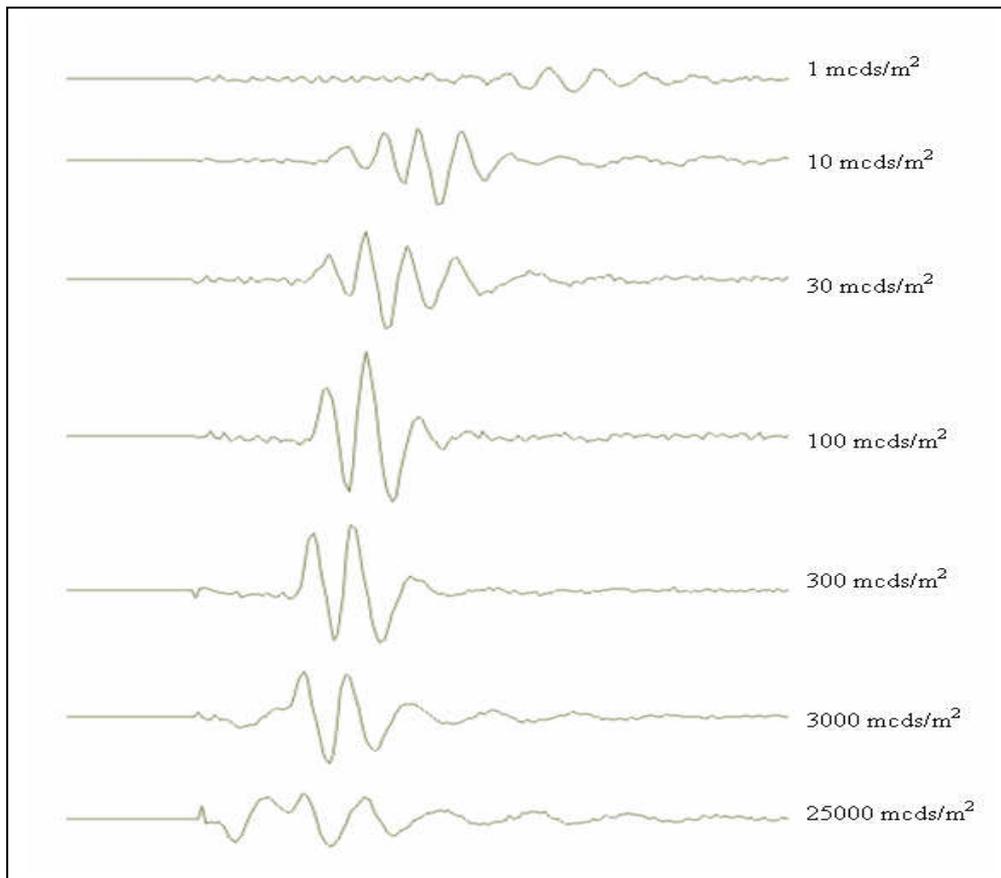


Abb. 10. Die oszillierenden Potentiale von Originalkurven einer Kontrollmaus zum Versuchsbeginn nach 20-Hz-Niedrigpassfiltrierung

Abb. 10 stellt die oszillierenden Potentiale der ERG-Originalkurven eines Kontrolltieres zum Beginn des Experimentes (0 Wochen) nach 20-Hz-Niedrigpassfiltrierung mit dem bereits oben beschriebenen Verhältnis zwischen den Parametern der oszillierenden Potentiale und den Reizintensitäten dar. Die Reizintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup> entspricht der ERG-Standardlichtintensität beim Menschen (9). Die weiteren Auswertungen der Parameter der oszillierenden Potentiale erfolgten bei der Standardlichtintensität und den oben genannten optimalen Lichtintensitäten. Um die funktionellen Veränderungen in den Versuchsgruppen feststellen zu können, wurden die Mittelwerte von der Frequenz, der Amplitude und der Gipfelzeit des II. oszillierenden Potentials mit den Mittelwerten von der Kontrollgruppe zu bestimmten Messzeitpunkten während des gesamten Versuches verglichen.

Die Normalverteilung der Werte wurde nicht für jeden Parameter der oszillierenden Potentiale festgestellt (Tab. 1 in der Anlage). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit mit p von 0,034 bis 0,200 nach Kolmogorov-Smirnov-Test und p von 0,012 bis 0,970 nach Shapiro-Wilks-Test (bei n<50) wurde zum Vergleich der Mittelwerte als Test für nicht-parametrische unabhängige Gruppen der Mann-Whitney-Test verwendet.

## 4.1.2 Vergleich der Frequenzen

### a) Standardlichtintensität (3000 mcDs/m<sup>2</sup>)

Es wurde kein signifikanter Unterschied der Frequenzen der oszillierenden Potentiale zur Kontrollgruppe gefunden, weder in der Chloroquingruppe noch in der Amiodarongruppe (p ab 0,166 bzw. ab 0,103, Tab. 2 in der Anlage, Abb. 11 A und B).

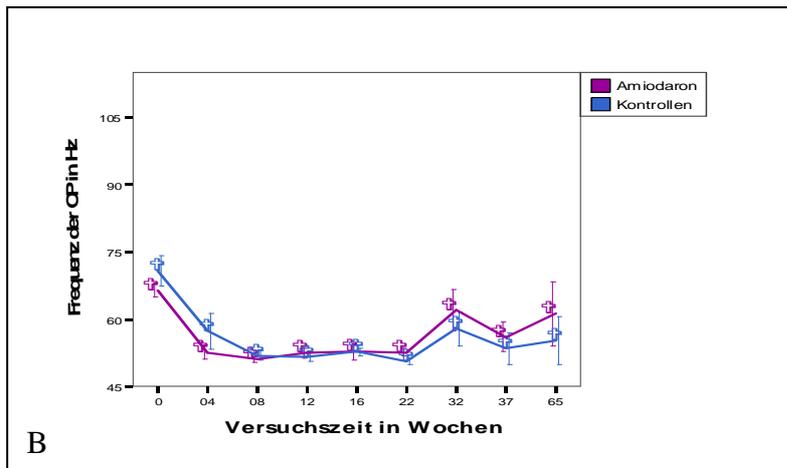
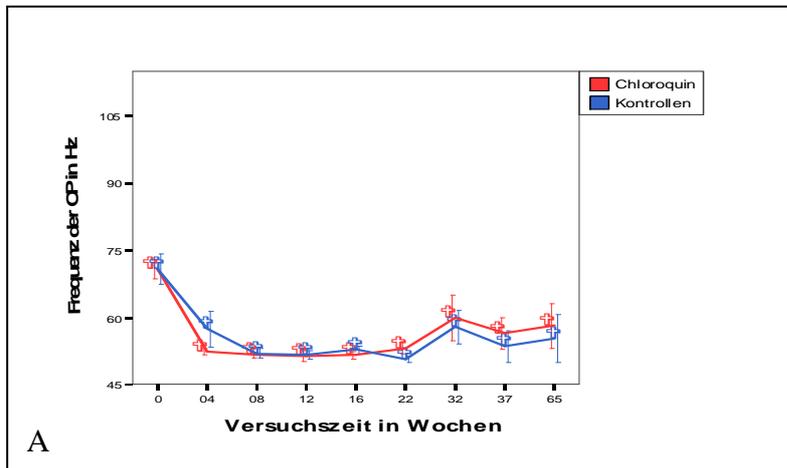


Abb. 11. Mittelwerte der Frequenz der OP bei der Lichtintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup>.

A - Die Kontrollen und die Chloroquingruppe.

B - Die Kontrollen und die Amiodarongruppe.

Linien zeigen den Mittelwert. Fehlerbalken zeigen den +/- 1,0 Standardfehler.

### b) Lichtintensität von 10 mcDs/m<sup>2</sup>

Die Frequenzwerte in der Chloroquingruppe verschlechterten sich irreversibel nicht-signifikant nach 4 Wochen, sowie signifikant nach 12 bis einschließlich 37 Wochen (p von <0,001 bis 0,032, Tab. 3 in der Anlage). Die Werte in der Versuchsgruppe lagen 22 bis 39% niedriger als bei den Kontrolltieren (Abb. 12 A).

Die Frequenzwerte in der Amiodarongruppe fielen nach 4 Wochen ab und blieben bis 37 Wochen niedriger als bei den Kontrollen, davon signifikant nach 16 Wochen um 13% gegenüber dem Mittelwert in der Kontrollgruppe ( $p=0,005$ , Tab. 3 in der Anlage, Abb. 12 B).

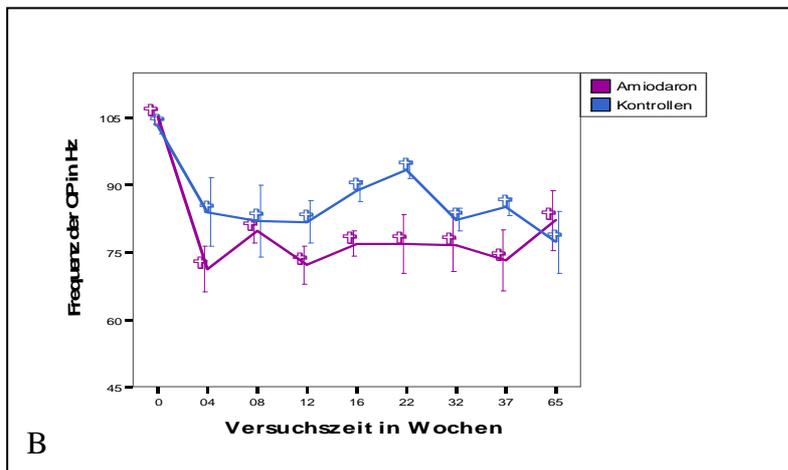
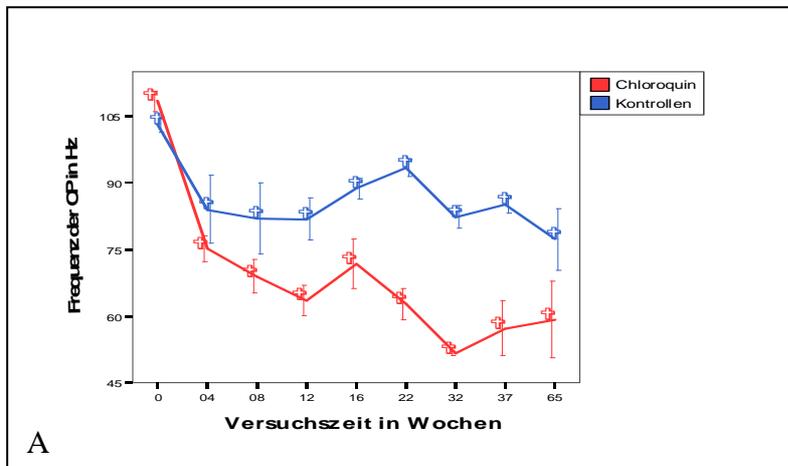


Abb. 12. Mittelwerte der Frequenz der OP bei der Lichtintensität von 10 mcDs/m<sup>2</sup>.  
 A - Die Kontrollen und die Chloroquingruppe.  
 B - Die Kontrollen und die Amiodarongruppe.  
 Linien zeigen den Mittelwert. Fehlerbalken zeigen den +/- 1,0 Standardfehler.

#### 4.1.3 Vergleich der Amplituden

##### a) Standardlichtintensität (3000 mcDs/m<sup>2</sup>)

Die Amplituden des II. oszillierenden Potentials zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen der Chloroquingruppe und den Kontrollen nach 16 und 22 Wochen um 40 und 60%, jedoch keinen in Amiodarongruppe ( $p<0,001$  bzw. ab 0,054, Tab. 4 in der Anlage, Abb. 13 A und B).

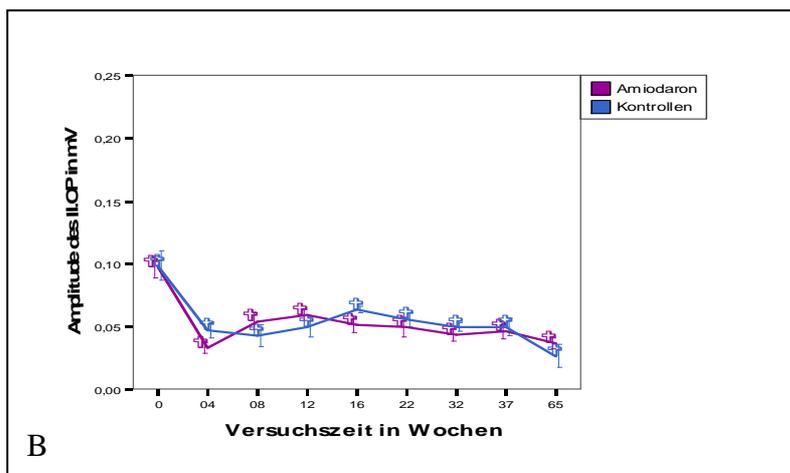
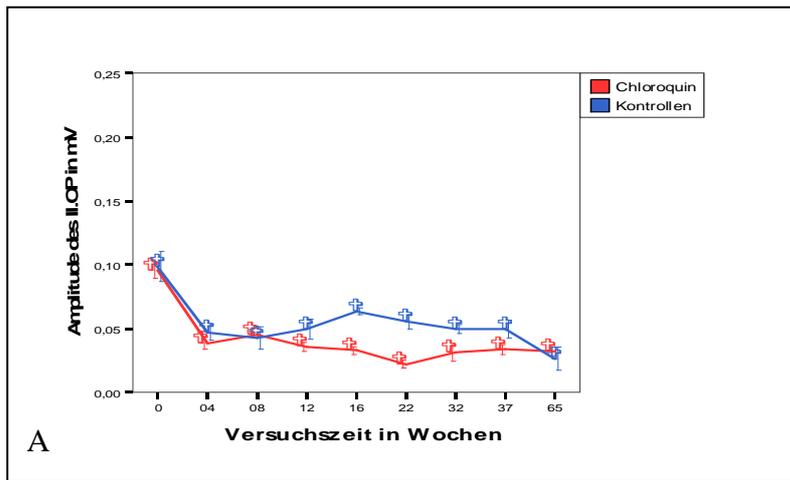


Abb. 13. Mittelwerte der Amplitude des II.OP bei der Lichtintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup>.

A - Die Kontrollen und die Chloroquingruppe.

B - Die Kontrollen und die Amiodarongruppe.

Linien zeigen den Mittelwert. Fehlerbalken zeigen den +/- 1,0 Standardfehler.

### b) Lichtintensität von 100 mcDs/m<sup>2</sup>

Eine deutliche Minderung der Werte in der Chloroquingruppe ergab sich nach 12 bis 37 Wochen um 52 bis 82% gegenüber den Mittelwerten in der Kontrollgruppe (p von <0,001 bis 0,030).

Die Amplitudenwerte in der Amiodarongruppe verringerten sich signifikant nach 16 und 22 Wochen um 29 und 46% gegenüber den Mittelwerten in der Kontrollgruppe (p von 0,002 und 0,024, Abb. 14 A und B, Tab. 5 in der Anlage).

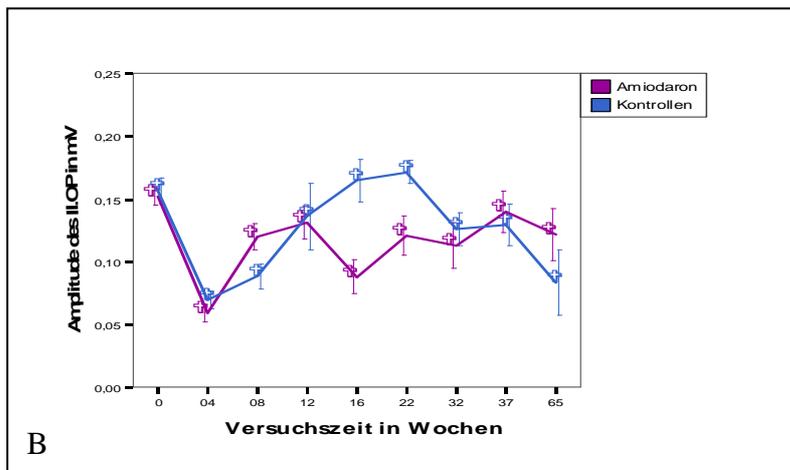
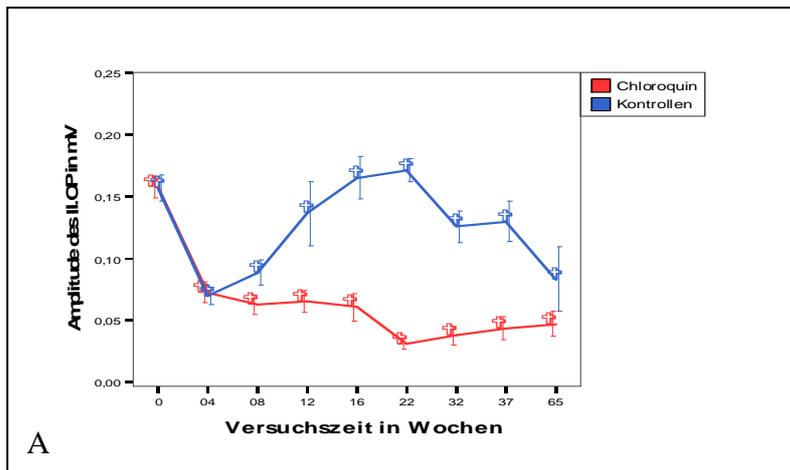


Abb. 14. Mittelwerte der Amplitude des II.OP bei der Lichtintensität von 100 mcDs/m<sup>2</sup>.  
 A - Die Kontrollen und die Chloroquingruppe.  
 B - Die Kontrollen und die Amiodarongruppe.  
 Linien zeigen den Mittelwert. Fehlerbalken zeigen den +/- 1,0 Standardfehler.

#### 4.1.4 Vergleich der Gipfelzeiten

Die Gipfelzeit des II. oszillierenden Potentials bei der Standardlichtintensität (3000 mcDs/m<sup>2</sup>) verzögerte sich in der Chloroquingruppe nach 12 bis 37 Wochen, davon im Mittelwert signifikant nach 16 und 22 Wochen um 24% und 32% gegenüber dem Mittelwert in der Kontrollgruppe (p von 0,001 und 0,002, Tab. 6 in der Anlage). Zum Ende des Versuches verlangsamten sich die Gipfelzeiten in beiden Gruppen (Abb. 15 A).

In der Amiodarongruppe zeigte der Gipfelzeitmittelwert des II. oszillierenden Potentials eine ausschließlich nach 16 Wochen signifikante Verzögerung um 22% gegenüber dem Mittelwert in der Kontrollgruppe (p=0,005), sowie eine nicht-signifikante nach 32 Wochen (Abb. 15 B). Nach 8 und 37 Wochen gab es eine transitäre, nicht-signifikante Erholung der Mittelwerte in

der Versuchsgruppe. Zum Ende des Tierversuches glichen sich die Gipfelzeitwerte in den beiden Gruppen an.

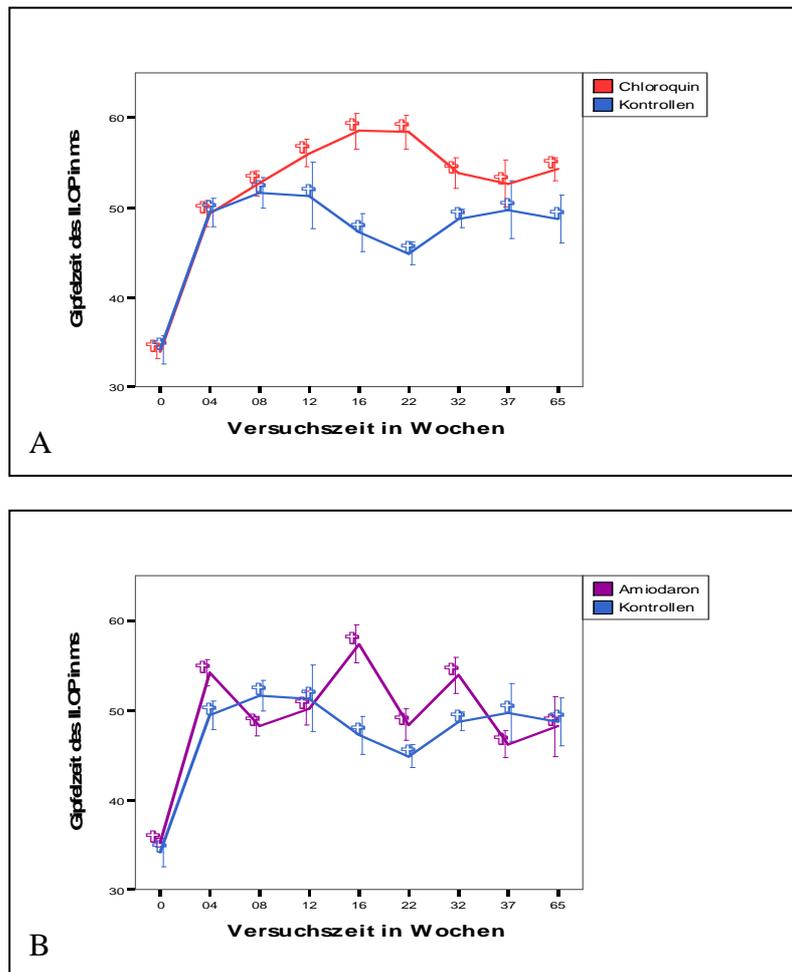


Abb. 15. Mittelwerte der Gipfelzeit des II.OP bei der Lichtintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup>.  
 A - Die Kontrollen und die Chloroquingruppe.  
 B - Die Kontrollen und die Amiodarongruppe.  
 Linien zeigen den Mittelwert. Fehlerbalken zeigen den +/- 1,0 Standardfehler.

#### 4.1.5 Zusammenfassung der ERG-Veränderungen

##### a) Chloroquingruppe

Die Parameter der oszillierenden Potentiale verschlechterten sich in der Chloroquingruppe gegenüber denen der Kontrolltiere bereits nach 8 bzw. 12 Wochen (Ausnahme - die Frequenz bei 3000 mcDs/m<sup>2</sup>), jedoch signifikant nur nach **16 und 22 Wochen** für die Amplitude und Gipfelzeit des II.OP bei der Standardlichtintensität bzw. nach **12 bis 37 Wochen** für die Frequenz bei der Lichtintensität von 10 mcDs/m<sup>2</sup> und für die Amplitude des II.OP bei der Lichtintensität von 100 mcDs/m<sup>2</sup>. Die pathologischen Werte in der Chloroquingruppe waren meistens irreversibel bzw. teilweise reversibel. Zum Ende des Versuches (65 Wochen) gab es

auch in der Kontrollgruppe eine Tendenz zur Abweichung der Werte, sodass sich die Amplituden- und Frequenzwerte bei Standardlichtintensität in beiden Gruppen angleichen.

#### **b) Amiodarongruppe**

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Amiodarongruppe und den Kontrollen ergab sich ausschließlich bei den für die OP-Parameter entsprechenden optimalen Lichtintensitäten nach **16 und 22 Wochen**.

### **4.2 Ergebnisse der funduskopischen Untersuchungen**

Zur Dokumentierung der retinalen morphologischen Veränderungen der behandelten Tiere wurden die Befunde der funduskopischen und histologischen Untersuchungen mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

#### **4.2.1 Kontrolltiere**

Die Netzhäute der meisten Kontrolltiere waren bis zum Ende des Versuches ohne pathologische Veränderungen und zeigten typische „Radspeichen-ähnliche“ Verteilung der Gefäße mit normalem Kaliber am hinteren Augenpol (Abb. 16 A) und einem bogenförmigen Verlauf der Gefäße in der Peripherie.

Zum Ende des Versuches ergaben sich jedoch bei zwei Mäusen begrenzte lokale, wie harte Exsudate aussehende Einlagerungen sowie verengte und vermehrt geschlängelte Gefäße (Abb. 16 B).

#### **4.2.2 Chloroquingruppe**

Bei allen mit Chloroquin behandelten Tieren beobachteten wir nach 12 Wochen weißfleckige generalisierte retinale Veränderungen (WFV Typ 1), die eher einem Gewebepplus-Effekt zuzuordnen und bei einigen Mäusen bereits nach acht Wochen schwach angedeutet waren. Diese Einlagerungen verblieben bis zum Ende des Versuches, allerdings nahm ihre Intensität ab. Auch die Gefäße waren bei einigen Mäusen mit vermehrten Wandreflexen, geschlängelt und verengt (Abb. 16 C und D). Der Zusammenhang zwischen der Chloroquin-Behandlung und den WFV Typ 1 war statistisch signifikant ( $p < 0,001$ , Tab. 7 und 8 in der Anlage).

### **4.2.3 Amiodarongruppe**

Die Netzhaut war bei acht von den fünfzehn untersuchten, mit Amiodaron behandelten Mäusen nach 8, 12 und 32 Wochen der Medikamentenapplikation verändert (Abb. 16 E). Bei den sechs Tieren waren die Veränderungen generalisiert, weißfleckig (WFV Typ 2), schlechter abgrenzbar, weniger ausgeprägt und scheinbar tiefer liegend als die WFV Typ 1 in der Chloroqingruppe. Es zeigten sich bei zwei von den Tieren mit WFV 2 und zwei weiteren Mäusen aus der Amiodarongruppe einzelne lokale Einlagerungen wie auch bei den einzelnen Kontrolltieren. Auch in dieser Gruppe waren die Gefäße bei einigen Mäusen mit vermehrten Wandreflexen, verengt und geschlängelt. Zum Ende des Versuches waren die weißfleckigen Veränderungen kaum bzw. nicht mehr zu erkennen.

Statistisch zeigte sich in der Amiodarongruppe eine signifikante Tendenz zu den weißfleckigen Veränderungen Typ 2 ( $p < 0,01$ , Tab. 7 in der Anlage).

### **4.2.4 Korrelation zwischen den ERG- und funduskopischen Befunden**

Die Tab. 10 in der Anlage stellt eine statistische Bearbeitung der gesamten funduskopischen Daten im Bezug auf die unmittelbar vor der Funduskopie durchgeführten ERG dar.

Es ließ sich eine gewisse, allerdings nicht-signifikante Verbindung zwischen den weißfleckigen Veränderungen Typ 1 in der Chloroqingruppe und den veränderten oszillierenden Potentialen feststellen ( $p > 0,05$ ). Die weißfleckigen Veränderungen Typ 2 in der Amiodarongruppe, sowie auch die lokalen Einlagerungen bei den einzelnen Tieren in der Kontroll- und der Amiodarongruppe gingen noch weniger mit den Veränderungen der oszillierenden Potentiale einher.

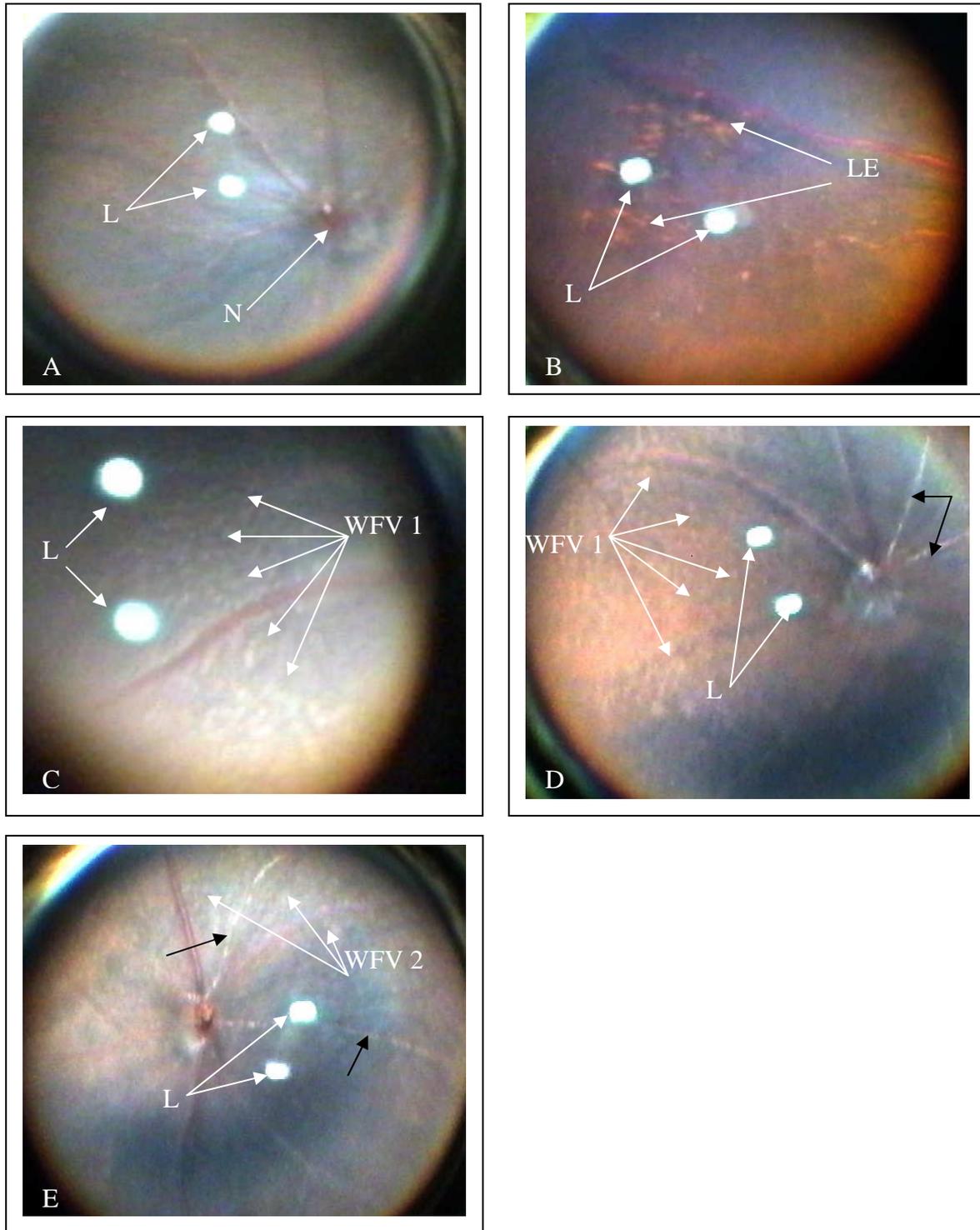


Abb. 16 A-E. Funduskopische Befunde.

A und B - Kontrollgruppe. A - 19 Versuchswochen. B - 70 Versuchswochen.

C und D - Chloroquingruppe. C - Nach 12 Wochen der Medikamentengabe.

D - 39 Wochen nach dem Absetzen der 26 Wochen dauernden Medikamentengabe.

E - Amiodarongruppe, nach 32 Wochen der Medikamentengabe.

LE - lokale Einlagerungen. L – Lichtreflexe. N – N.Optikus.

WFV 1 – weißfleckige Veränderungen Typ 1. WFV 2 – weißfleckige Veränderungen Typ 2.

Vermehrte Gefäßwandreflexe (schwarze Pfeile).

## **4.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen**

### **4.3.1 Kontrolltiere**

Die Netzhäute der Mäuse in der Kontrollgruppe zeigten keine pathologischen Veränderungen. Allerdings waren zum Ende des Versuches einige Vakuolen in der GZS und im RPE sowie geringe Auflockerungen im Außensegment der Photorezeptoren nachweisbar. Die ÄKS bestand im elektronenmikroskopischen Schnitt aus 16 bis 19 Perikarya. Die GZS stellte sich durch ein- bis dreilagige Zellen dar. Die Abb. 17 A, C und E sowie die Abb. 18. A und C zeigen die unterschiedlichen Schichten der Netzhaut der Kontrollmäuse im elektronenmikroskopischen Bild.

### **4.3.2 Chloroquingruppe**

In den Netzhäuten war eine geringe Vakuolisierung in dem RPE und der GZS nach 8 Wochen sowie Einschlusskörperchen schon nach 12 Wochen der Chloroquinbehandlung zu erkennen. Die Einschlusskörperchen stellten sich lamellär strukturiert dar, mit abgrenzender äußerer Membran, mit einer Größe von 0,4 bis 2,85  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise in der IPS und der GZS lokalisiert, etwas weniger und später im RPE und der IKS auftretend und noch weniger in der ÄPS, ÄKS und im IS der Photorezeptoren (Abb. 17 B, D, F und G). Im AS der Photorezeptoren wurden keine Einschlusskörperchen gefunden. Die lamellären Einlagerungen wurden bei 8 von den 19 untersuchten Tieren nachgewiesen und blieben bis zum Ende des Tierversuches erhalten.

Weitere Veränderungen:

Die Dicke der Netzhautschichten nahm im Vergleich zu den Kontrolltieren ab, vorwiegend in der ÄKS (12 bis 15 Perikarya anstatt 16 bis 19), IPS und GZS (ein- bis zweilagige Zellschichten anstatt bis dreilagige). Die Auflockerung im AS der Photorezeptoren schritt zum Ende des Versuches weiter fort.

Tab.9 in der Anlage stellt die statistische Bearbeitung des Vergleiches der histologischen Daten der Chloroquin- und Kontrollgruppen dar. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Chloroquinbehandlung und den lamellären Einschlusskörperchen ( $p < 0,05$ , Tab. 9 in der Anlage)

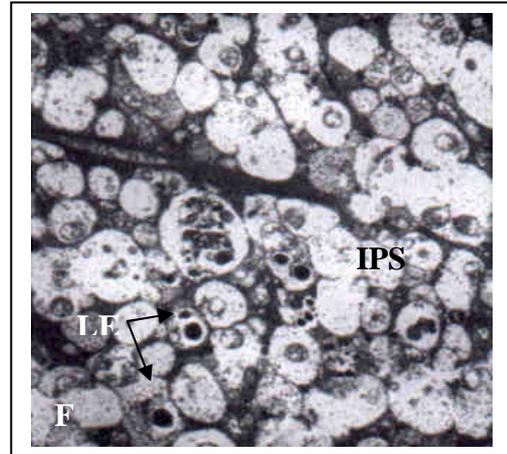
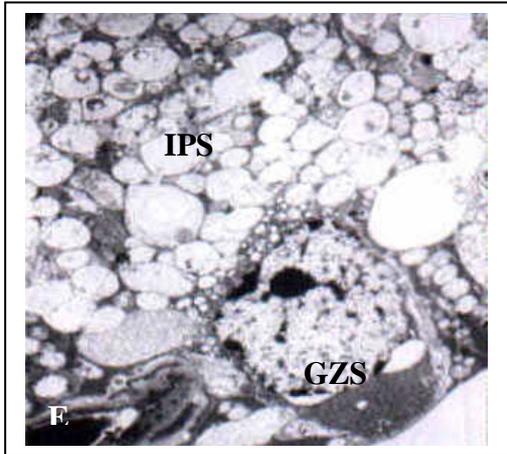
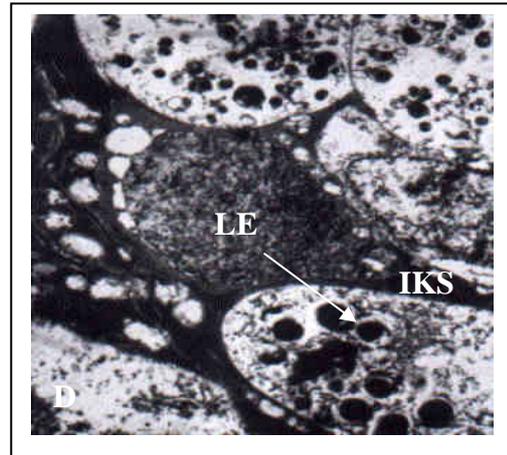
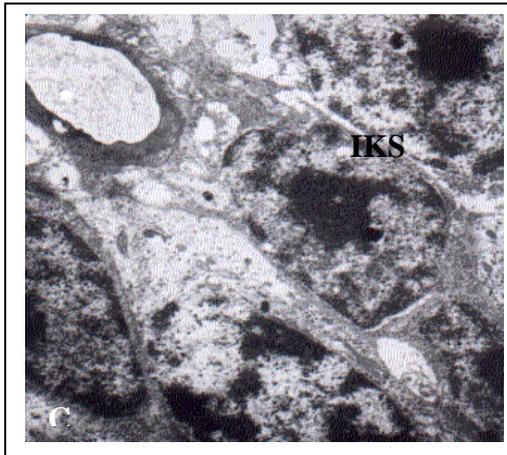
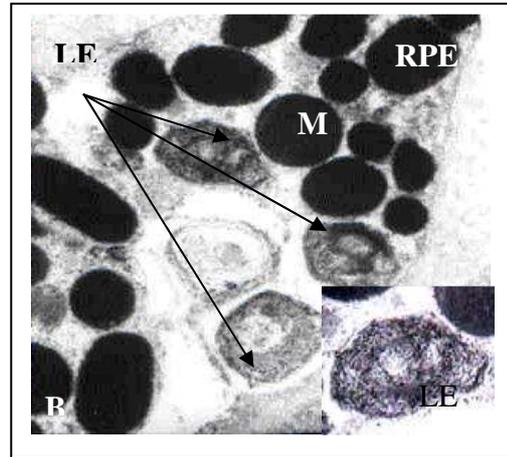
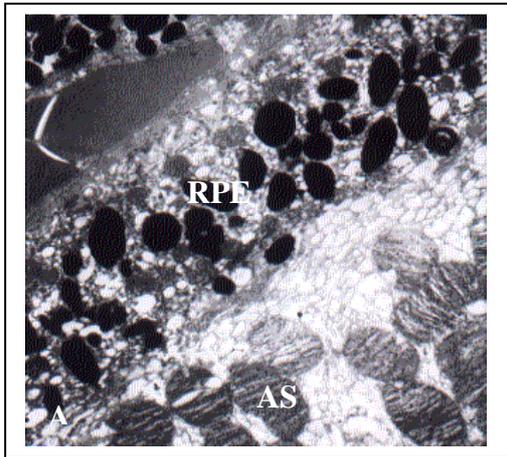
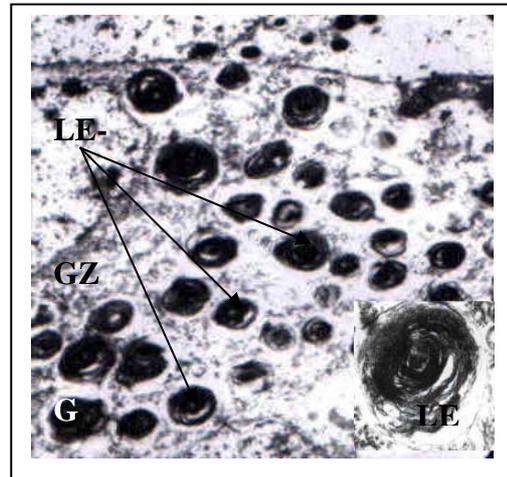


Abb.17. Histologische Befunde.  
Elektronenmikroskopie (Ultraschnitt).  
A, C, E – Kontrollgruppe.  
A – RPE und AS der Photorezeptoren, 45 W, x 7000. C - IKS und ÄPS, 45 W, x 7000.  
E - IPS und GZS, 45 W, x 4400.  
B, D, F, E – Chloroquingruppe.  
B - RPE, 12 W, x 20000 und 50000.  
D - IKS, 16 W, x 7000. F - IPS, 16 W, x 7000.  
G - GZS, 16 W, x 7000 und x 30000  
LE – Lamelläre Einschlusskörperchen (Pfeile),  
M – Melanosomen im RPE, GZ – Ganglienzelle,  
W – Versuchszeit in Wochen



### **4.3.3 Amiodarongruppe**

In der Netzhaut der Tiere dieser Gruppe waren ebenfalls eine geringe Anzahl von Vakuolen in der GZS und dem RPE, eine Auflockerung im Außensegment der Photorezeptoren und eine Reduzierung der ÄKS (14 bis 17 Perikarya) und IKS nachweisbar. Bei einigen Tieren wurden bereits nach 8 Wochen eine Verkleinerung und eine Reduzierung der Melanosomen im RPE beobachtet. Bei 5 von den untersuchten 17 Mäusen waren in der Retina granuläre Einschlusskörperchen zu finden, die mit ihrem dichten osmiumphilen feingranulären und teilweise feinlamellären Material strukturell den Melanosomen in III/IV Stadien ähnelten, allerdings mit ihrer Größe von 0,25 bis 0,95  $\mu\text{m}$  zwei- bis dreifach kleiner als die typischen Melanosomen des RPE waren. Die Einlagerungen lokalisierten sich überwiegend in der Photorezeptorenschicht, etwas weniger in der ÄKS, der ÄPS und in der IKS (Abb. 18 B, D und E). Die Einschlusskörperchen waren in der IPS vereinzelt sowie im RPE und in der GZS überhaupt nicht zu finden. Die Einlagerungen traten nach 22 bzw. nach 37 Wochen der Behandlung auf und waren zum Ende des Versuches (29 Wochen nach dem Absetzen des Amiodarons) bei den untersuchten Mäusen nicht nachweisbar.

Es ließ sich auch bei dieser kleinen Anzahl der Mäuse mit den granulären Einschlusskörperchen eine signifikante Verbindung mit der Amiodarongabe feststellen ( $p < 0,05$ , Tab. 9 in der Anlage).

### **4.3.4 Korrelation zwischen den ERG- und histologischen Befunden**

Tab. 11 in der Anlage stellt die statistische Bearbeitung der gesamten Daten der histologischen Untersuchungen in Bezug auf oszillierende Potentiale des unmittelbar vor dem Todeszeitpunkt durchgeführten ERG dar.

Es zeigte sich lediglich eine nicht-signifikante Verbindung zwischen den lamellären Einlagerungen und den Veränderungen der oszillierenden Potentiale ( $p > 0,05$ ). Die granulären Einschlusskörperchen hingen noch weniger mit den Veränderungen der oszillierenden Potentiale zusammen.

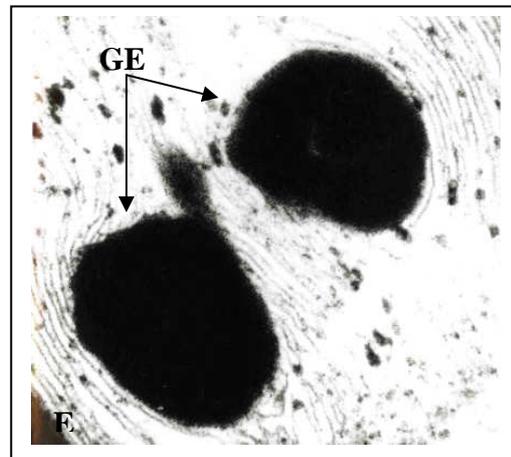
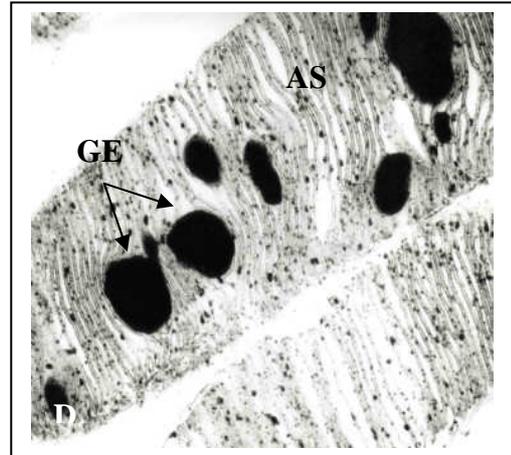
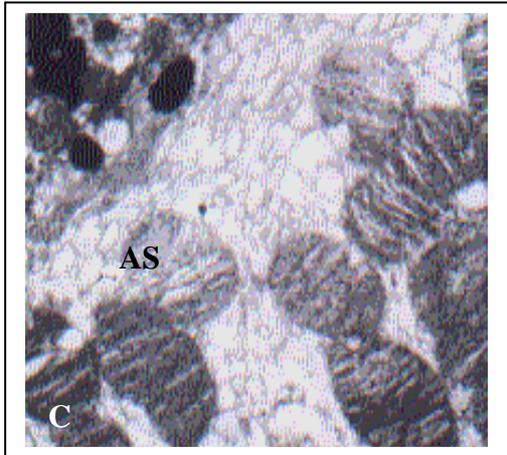
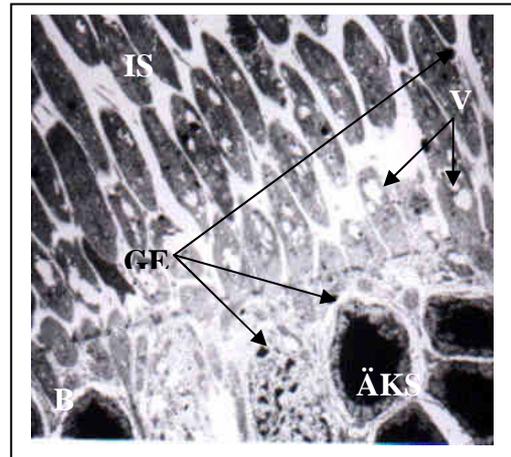
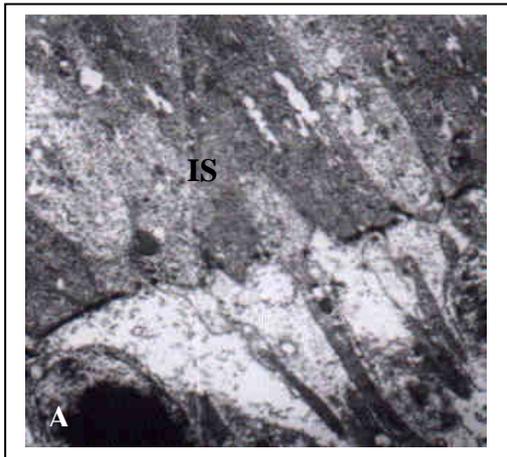


Abb. 18. Histologische Befunde.  
Elektronenmikroskopie (Ultraschnitt).  
A und C – Kontrollgruppe.  
A - IS der Photorezeptoren, 45 W, x 7000.  
C - AS der Photorezeptoren und RPE, 45 W, x 7000.  
B, D, E – Amiodarongruppe.  
B - IS der Photorezeptoren und ÄKS, 37 W, x 4400  
D - AS der Photorezeptoren, 37 W, x 20000.  
E - AS der Photorezeptoren, 37 W, x 85000.  
GE – Granuläre Einschlusskörperchen,  
V – Vakuolen.

#### 4.3.5 Lokalisation der Einlagerungen

Wie oben erwähnt, hatten die elektronenmikroskopisch gefundenen lamellären bzw. granulären Einschlusskörperchen eine bestimmte Lokalisation (Tab. 6).

**Tab. 6. Lokalisation der histologischen Veränderungen in Abhängigkeit vom Typ der Einschlusskörperchen**

Typ der Einschlusskörperchen	RPE	Photo-rezeptoren	ÄKS	ÄPS	IKS	IPS	GZS
Lamelläre (Chloroqingruppe)	4	2	1	2	5	8	7
	M	M/E	0	M	V/M/E	V	V
Granuläre (Amiodarongruppe)	0	4	2	4	4	1	0
	0	V/M	M/E	E/M	E	E	0
Gesamt	4	6	3	6	9	9	7

V – viele (>20 im Untersuchungsfeld bei einer Vergrößerung x7000) M – mehrere (4-20) E – einzelne (0-3)  
Zahlen entsprechen der Anzahl der Tier, bei denen diese Veränderungen gefunden wurden

Die in der Anlage in der Tab. 12 dargestellte statistische Analyse der gehäuften Ergebnisse der histologischen Untersuchungen beweist diese Verteilung der Einlagerungen in Bezug auf die betroffenen Netzhautschichten: Die lamellären Einschlusskörperchen zeigten eine gewisse, allerdings nicht-signifikante Neigung zur Lokalisation in der IPS, GZS und im RPE, sowie die granulären Einschlusskörperchen in der Photorezeptorenschicht, ÄKS und ÄPS (jeweils  $p > 0,05$ ).

#### 4.4 Korrelation zwischen den histologischen und funduskopischen Befunden

Die gleichzeitig verfügbaren und gut beurteilbaren histologischen und funduskopischen Befunde waren bei den 34 Tieren vorhanden.

Es ergab sich eine offensichtliche Verbindung zwischen den histologischen und funduskopischen Veränderungen wie folgt (s.Tab.13 in der Anlage):

- 1) die lamellären Einschlusskörperchen assoziieren mit den weißfleckigen Veränderungen Typ 1 in der Chloroqingruppe ( $p < 0,01$ );
- 2) die granulären Einschlusskörperchen treten signifikant häufig im Zusammenhang mit den weißfleckigen Veränderungen Typ 2 in der Amiodarongruppe auf ( $p < 0,001$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Abhängigkeiten der Parameter der oszillierenden Potentiale von der Lichtintensität

Beim Standard-ERG des Menschen werden üblicherweise die Amplitude und die Gipfelzeit des II. oszillierenden Potentials (OP) ausgewertet.

In unserer Studie wurde zusätzlich die Frequenz der oszillierenden Potentiale gemessen.

Die Amplitude der OP erhöht sich mit der Lichtintensität. Die lineare Korrelation zwischen der Lichtintensität und der Amplitude der oszillierenden Potentiale erstreckt sich bis zu einem Volladaptationsniveau der Netzhaut. Bei weiter steigender Lichtintensität sinkt die Amplitude wegen nicht möglicher weiterer Erregbarkeit der Retina infolge der erreichten maximalen retinalen Adaptation (3). Postsynaptische neuronale retinale Adaptationsprozesse hängen mit den rücklaufenden Bindungen zusammen, die die Sensitivitätsschwelle der Amakrinen- und Ganglienzellen regulieren (96).

Verhältnismäßig bessere Amplitude der OP bei schwächeren präadaptiven Beleuchtungen könnte u.a. durch Erregung sowohl des skotopischen als auch des photopischen retinalen Systems erklärt werden (25). Dies bestätigen auch unsere Ergebnisse. Die höchste Amplitude zeigte sich bei einer Reizintensität von  $100 \text{ mcDs/m}^2$ . Bei dieser Intensität erreichte die Amplitude das Volladaptationsniveau der Netzhaut. Diese relativ niedrige Sättigungslichtintensität im Vergleich zum Menschen-ERG ( $3000 \text{ mcDs/m}^2$ ) lässt sich durch den skotopischen Typ der Mäuseretina erklären. Die Netzhaut der Mäuse ist stärker stäbchendominant als beim Menschen. Da die Stäbchen mehr Sehpigmentmoleküle und eine stärkere Konvergenzfähigkeit hinsichtlich der Verknüpfung an die Bipolarzellen als die Zapfen besitzen, reagieren die im Vergleich zum Zapfensystem empfindlicher auf niedrigere Lichtintensitäten (95, 100).

Die kürzeste Gipfelzeit ergab sich bei einer Reizintensität von  $3000 \text{ mcDs/m}^2$ , was die erhaltene Aktivität der Zapfen zeigt. Die Stäbchen haben bei entsprechenden Lichtintensitäten eine längere Gipfelzeit der Potentiale als die Zapfen (4, 101). Desweiteren verkürzt sich die Gipfelzeit der OP generell mit ansteigender Lichtintensität und zunehmender -adaptation (4). Dies zeigt die Unabhängigkeit zwischen der Gipfelzeit und der Amplitude der OP (3).

Anfang der 70er Jahre wurde berichtet, dass auch die Frequenz der oszillierenden Potentiale mit steigender Lichtintensität und retinaler -adaptation sinkt (3). In unserer Studie sank die Frequenz der oszillierenden Potentiale schon ab einer Lichtintensität über  $10 \text{ mcDs/m}^2$ , was sich durch die rapide retinale Adaptation erklären lässt.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse in der Chloroquingruppe**

### **5.2.1 Funduskopie**

Die ophthalmoskopischen Veränderungen bei den Mäusen in unserer Studie unterschieden sich von der bekannten Chloroquin-Makulopathie beim Menschen. Aufgrund der anderen Photorezeptorverteilung der Mausretina (gleichmäßige Verteilung der Zapfen auf die ganze Netzhaut, keine Makula) kann sich die typische „Bull-Eye“-Makulopathie nicht ausbilden. Offensichtlich liegen den Chloroquin-Retinopathien bei Menschen und Tieren teilweise unterschiedliche Entwicklungsmechanismen zugrunde, da die Veränderungen bei den Mäusen auch den peripheren spätauf tretenden Pigmentstörungen der humanen Retina nicht identisch waren.

Bei Mäusen der Chloroquingruppe wurden in unserer Studie nach 8 Wochen der Behandlung schwache und nach 12 Wochen deutliche generalisierte weißfleckige, relativ gut abgegrenzte, wie Einlagerungen aussehende, auch nach dem Absetzen des Medikamentes persistierende retinale Veränderungen festgestellt.

Neben den Hauptveränderungen wurden in der vorliegenden Studie auch verengte und vermehrt geschlängelte Gefäße sowohl in der Chloroquin- als auch in der Kontrollgruppe gesehen.

Hingegen hängen vermutlich die Veränderungen der retinalen Gefäße beim Menschen mit der Chloroquin-Retinopathie zusammen. So wurden bei zwei Patientinnen nach 1,5- bzw. 6-jähriger Chloroquinbehandlung teilweise bis hin zur Obliteration verengte retinale Gefäße beschrieben (11, 48). Die Veränderungen der Gefäße werden eher als Folge des durch Chloroquin bedingten Netzhautschadens und nicht als Ursache betrachtet. Sie spielen bei dem Fortschreiten der Netzhautveränderungen eine unwesentliche Rolle (71).

### **5.2.2 Histologie**

Histologisch wurden ebenfalls Abweichungen zwischen der Retinopathie bei Menschen und Mäusen festgestellt.

Laut Wetterholm und Winter wird die Chloroquin-Retinopathie beim Menschen histologisch als „destruktiver Schaden der Stäbchen und Zapfen mit einer Akkumulation der pigmentierten Zellen in der ÄKS und ÄPS“ bezeichnet (64). Mitte der 60er Jahre wurde von einer Patientin berichtet, die 1,5 Jahre lang Chloroquin wegen eines Lupus erythematoses einnahm und an einer Bronchopneumonie verstorben war. Ihre Netzhaut erwies eine Destruktion der Stäbchen und Zapfen bis zum totalen Verlust der Außensegmente und der ÄKS und eine Migration des

Pigmentes vom RPE in Richtung Photorezeptoren und weiter bis in die IKS. An Ganglien- und Bipolarzellen zeigten sich keine Schäden (11).

An der Netzhaut der mit Chloroquin behandelten Tiere fanden sich in unserer Studie ebenfalls destruktive Veränderungen im Sinne einer Auflockerung im Außensegment der Photorezeptoren und Abnahme der Dicke der ÄKS, IPS und GZS. Die ersten Veränderungen wurden in den Geweben 8 Wochen nach dem Behandlungsanfang in Form leichter Vakuolisierung in der GZS und im RPE beobachtet. Möglicherweise handelte es sich dabei um die frühe Phase der intralysosomalen Einlagerungen (schwellende Lysosomen bzw. „leere Vakuolen“), die bei der kurzzeitigen Chloroquinbehandlung beobachtet wird (53). Im Einklang mit anderen Autoren (14, 28, 50, 58), fanden wir keine pigmentierten Granula in der Photorezeptorenschicht.

Es wird angenommen, dass eine Retinopathie beim Menschen durch Bindung des Chloroquins an Melanin verursacht wird (11, 75), was sich ophthalmoskopisch durch die Pigmentstörungen äußert. Jedoch ist ein lysosomaler Lipidspeicherungsprozess als Ursache einer Chloroquin-Retinopathie nicht auszuschließen. Dieser Eindruck wird noch dadurch verstärkt, dass in anderen Gewebeanteilen des Auges, z.B. in der Hornhaut und in den extraokulären Muskeln, die lamellären Einschlusskörperchen als morphologisches Substrat der Lipidose zu finden sind (58, 65).

Im Unterschied zu den Menschen stellen sich histologische Veränderungen in der Retina von Ratten durch lysosomale Einschlusskörperchen dar, die in der Regel lamellär strukturiert in der GZS und IKS bzw. kristalloid-strukturiert in kleiner Menge im RPE zu finden sind (14, 58). In einer anderen Arbeit wurden auch im RPE der Ratten nach 1,5 Monaten fünfmal wöchentlich intraperitonealer Injektion entstandene membranöse (lamelläre) Einschlusskörperchen beschrieben (50).

In unserer Studie lokalisierten sich die retinalen lamellären (membranösen) Einschlusskörperchen überwiegend in der IPS und der GZS, etwas weniger und später im RPE und der IKS, vereinzelt in der ÄPS und im Innensegment der Photorezeptoren, wobei die ÄKS und das Außensegment der Photorezeptoren unauffällig waren. Die nach 12 Behandlungswochen gefundenen Einlagerungen zeigten ihren irreversiblen Charakter bis zum Ende des Experimentes.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch aus einer Studie an Ratten (28). Die Lipidose-Einschlusskörperchen waren in der GZS, in den Müllerzellen, der IPS und in der IKS nach 8 und 12-wöchiger Behandlung mit Chloroquin (95 mg/kg KG) zu finden, aber nicht oder nur vereinzelt im RPE. 16 Wochen nach Chloroquinapplikationsabbruch war die Lipidose nicht

mehr nachweisbar. Dabei entwickelten die ERG-Parameter eine weitere Senkung der Amplituden der Hauptkomponenten, die höchstwahrscheinlich durch die degenerativen Veränderungen der Photorezeptorenschicht verursacht wurde. Die aufgetretene Deformation und Reduktion des Außen- und des Innensegmentes mit nachfolgendem Verlust der ganzen Photorezeptorzelle war vergleichbar mit der oben beschriebenen Degeneration der Photorezeptoren bei Menschen und ausgeprägter als bei Mäusen in unserer Studie. Ob die lysosomale Speicherung in der GZS bzw. im RPE und die Schädigung der Photorezeptoren miteinander verbunden sind oder ob sie völlig unabhängig von einander verlaufen, wird noch diskutiert (50).

Wahrscheinlich beeinflussen sich diese beiden Prozesse gegenseitig. Die Überladung der Zellen durch die abnormalen Lysosomen führt zur Funktionsstörung und kann später einen organischen Schaden der Zelle verursachen.

Beim Auftreten der Zellnekrose sind die Mechanismen der Zellenautoregulation wiederum gestört. Die vorhandenen Lipid-Medikament-Komplexe können nicht dissoziieren, durch den Mangel an entsprechenden Enzymen werden die Lipide nicht bearbeitet, sodass die Lipidose sich nicht auflöst. Dies behindert die Reversibilität der Lipidose (1, 28, 58). Eine ausgeprägte Zelldestruktion kann auch allein die Überladung der Lysosomen mit Abfallprodukten hervorrufen, die in eine lysosomale Speicherung mündet (81).

Es wird vermutet, dass während der medikamentösen Behandlung die Bildung von polaren Lipiden steigt, welche sich an das Medikament binden. Für das RPE wird diskutiert, dass Chloroquin kaum eine Neigung zur Bindung an RPE-lysosomale Lipide hat (58). Dies bestätigen auch die Ergebnisse von einer anderen Studie mit Chloroquinapplikation, bei der in der Neuroretina (Netzhaut von der Photorezeptorenschicht bis zur Nervenfaserschicht) eine Erhöhung aller Klassen der neuroretinalen Phospholipide außer Lysophosphatidylcholin festgestellt wurde. Im RPE gab es keine metabolischen oder morphologischen Störungen (42). Dies würde erklären, warum in unserer Studie die massiven Einlagerungen zunächst in den inneren retinalen Schichten gefunden wurden und später mit geringer Ausprägung im RPE. Da das morphologische Bild der Chloroquin-Retinopathie bei Mäusen histologisch deutliche Veränderungen zeigte, könnten die lamellären Einschlusskörperchen in der GZS und der IPS als morphologisches Substrat für die ophthalmoskopisch erkennbaren weißfleckigen Veränderungen Typ 1 angesehen werden. Dies bestätigt auch die signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Befunden.

### 5.2.3 ERG

Die Verschlechterung der Mittelwerte der oszillierenden Potentiale in der Chloroquingruppe im Vergleich zu den Werten in der Kontrollgruppe wurde bereits nach 8 bzw. 12 Wochen (Ausnahme - die Frequenz bei der Standardlichtintensität von 3000 mcds/m<sup>2</sup>) beobachtet. Sie waren signifikant nach 12 bis 37 bzw. nach 16 und 22 Wochen. Die Veränderungen der oszillierenden Potentiale in der Chloroquingruppe sind bei den oben genannten optimalen Lichtintensitäten nicht zurückgegangen (blieben irreversibel).

In einer anderen Studie mit Chloroquinapplikation bei Mäusen kam es auch zu einer Amplitudenreduktion der früheren (I-II) OP (5). In der vorausgegangenen Forschungsarbeit im Rahmen des oben genannten Projektes nahmen die Amplituden der Hauptkomponenten des ERG (a- und b-Wellen) signifikant auf 56% bzw. 50% des Ausgangswertes ab, wobei die Gipfelzeit sich nicht-signifikant um 10% bzw. um 15% verzögerte (nicht publizierte Arbeit von P.Harm). Die Studien mit Chloroquinapplikation bei Ratten zeigten eine vergleichbare Senkung der Amplitude der Hauptkomponente des ERG. In einer Studie verschlechterten sich die Amplituden der a- und b-Wellen um 25% bzw. 35% im Vergleich zu den Kontrolltieren nach neun Monaten täglicher intraperitonealer Injektion des Medikamentes (50). In einer anderen Arbeit nahmen die Amplituden der a- und b-Wellen bei 12 Wochen mit Chloroquin gefütterten Ratten bis auf 26% bzw. 16% vom Ausgangswert ab und die Gipfelzeit der a-Welle verzögerte sich um 30% (14, 28).

Die Beurteilung aller drei Untersuchungen zeigte in unserer Arbeit bei den mit Chloroquin behandelten Mäusen nach 12 Behandlungswochen deutliche funduskopische-, histologische- und signifikante funktionelle Veränderungen.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse in der Amiodarongruppe**

### **5.3.1 Funduskopie**

Die medikamenteninduzierten Retinopathien sind in der Regel generalisiert und bilateral, mit überwiegendem Schaden des Außensegmentes der Photorezeptoren. Bei pigmentierten Mäusen zeigen sich funduskopisch unregelmäßige Pigmentverteilungen, verengte Gefäße, Exsudate oder Hämorrhagien (10).

In der vorliegenden Arbeit wurden bei einigen mit Amiodaron behandelten Mäusen generalisierte weißfleckige, schlecht abgegrenzte, im weiteren Verlauf reversible, retinale Veränderungen nach 8, 12 und 32 Wochen beobachtet. Offensichtlich handelte es sich hierbei um Pigmentstörungen des RPE im Sinne von hypopigmentierten Arealen. Es ließen sich noch lokale, wie harte Exsudate aussehende Einlagerungen, sowie auch verengte und geschlängelte Gefäße finden.

### **Vergleich zwischen den beiden Gruppen**

In den beiden Versuchsgruppen (bei allen Chloroquinmäusen und bei einem Drittel der Amiodaronmäusen) traten generalisierte weißfleckige funduskopische Veränderungen auf, die sich allerdings durch ihre Reversibilität sowie Farbintensität und Abgrenzbarkeit unterschieden. Dies kann auf ihre unterschiedliche Lokalisation in den Netzhautschichten hindeuten.

### **5.3.2 Histologie**

Mikroskopisch äußern sich die medikamentenbedingten Retinopathien durch den Verlust der Außensegmente der Photorezeptoren, Migration der RPE-Zellen nach innen und Durchdringen der choroidalen Gefäße in die RPE-Schicht (10).

In unserer Studie wurde in der Netzhaut vom Endzeitpunkt des Tierexperimentes bei den meisten mit Amiodaron behandelten Mäusen eine Vakuolisierung in der GZS und im RPE gesehen, die auch in den beiden anderen Gruppen zu finden war. Außerdem wurde bei einigen Tieren der Amiodarongruppe bereits nach 8 Behandlungswochen eine Verkleinerung und Reduzierung der Melanosomen im RPE beobachtet, die eine Pigmentverschiebung verursacht haben könnten. Erst nach 22 und 37 Behandlungswochen waren bei einigen Mäusen in der Photorezeptorschicht und etwas weiter nach innen ausgeprägte, nach dem Absetzen des Medikamentes aber kaum nachweisbare, dunkle granulär-kristalloide, teilweise feinlamelläre Einschlusskörperchen zu finden (vgl. „Migration der RPE-Zellen nach innen“ bei toxischen Retinopathien). Das RPE und die GZS waren frei von den Einlagerungen.

Die histologischen Befunde in anderen Studien betreffen hingegen meistens das RPE und die GZS. So zeigten sich bei der Untersuchung der Augen von mit Amiodaron (160-200 mg/kg) behandelten Albinoratten unter dem Lichtmikroskop mehrere dunkle zytoplasmatische kristalloide Einschlusskörperchen im RPE nach drei Wochen sowie kristalloide und lamelläre Inklusionen in Ganglien- und Müllerzellen nach sechs Wochen. Andere Netzhautzellen, u.a. Photorezeptorzellen, waren intakt (13).

In einer anderen tierexperimentellen Arbeit wurden bei Albinomäusen nach drei Monaten und bei Ratten bereits nach einem Monat chronischer Amiodarongabe (200 mg/kg bzw. 400 mg/kg) zahlreiche lysosomale kristalloide Einschlusskörperchen im RPE elektronenmikroskopisch nachgewiesen (23).

Bei einer Untersuchung der Augen einer verstorbenen, lange Zeit mit Amiodaron behandelten Patientin waren die Lipidosezeichen lichtmikroskopisch nur in der Hornhaut und Bindehaut zu finden. Elektronenmikroskopisch waren die intrazytoplasmatischen, membrangebundenen lamellären Granula in der Retina nur im RPE und einzelne in den Ganglienzellen nachweisbar (39).

Medikamenteninduzierte Lipidose betrifft meistens die Organzellen, die unter normalen Bedingungen auch große Lipidmengen metabolisieren müssen. Am Auge sind es, wie es auch die experimentellen Versuche an Ratten bestätigen, das RPE und die retinalen Ganglienzellen (58). Somit wäre die Lokalisation der gefundenen Einschlusskörperchen bei mit Amiodaron behandelten Mäusen unserer Studie nicht typisch für den medikamenteninduzierten Speicherungsprozess.

Deshalb sind folgende Ursachen der Granula zu diskutieren:

- 1) Melanosomen
- 2) Altersbedingte Lipofuszingranula
- 3) Speicherkrankheitsbedingtes Material mit den Amiodaron-Lipid-Komplexen als Substrat
- 4) Phagolysosomales Lipidose-Material anderer Genese durch toxische Wirkung des Medikamentes (z.B. Induzierung der Produktion von freien Radikalen, die eine zellschädigende Wirkung haben, s. unten)

Tab.7 fasst die Argumente und Gegenargumente für diese Aussagen zusammen.

**Tab.7. Zusammenfassung der Argumente für und gegen der bestimmten Genese der histologischen Veränderungen in der Amiodarongruppe**

<b>Genese der Granula</b>	<b>Argumente</b>	<b>Gegenargumente</b>
Melanosomen	<p>1) Vergleichbarkeit der feingranulären und teilweise feinlamellären Struktur der gefundenen Einschlusskörperchen mit den Melanosomen in III/IV Stadien (38).</p> <p>2) Bei einigen Tieren wurden Hypomelanismen im RPE beobachtet: Reduktion der Menge und der Größe der Melanosomen.</p> <p>3) Weißfleckeriger Fundus bei einigen Mäusen könnte auf die Pigmentblattstörung hinweisen.</p> <p>4) Bei medikamentenbedingten Retinopathien zeigt sich meistens eine Pigmentverschiebung im RPE sowie die "Migration der RPE-Zellen nach innen" (10).</p> <p>5) Melanin reduziert freie Radikale und Melanosomen beteiligen sich möglicherweise am Abbau der Disken des Außensegmentes (72).</p> <p>6) Bekannterweise verursacht Amiodaron eine Pigmentstörung in der Haut.</p> <p>7) Beim Menschen zeigt sich eine Retinopathie nach Amiodarontherapie meistens durch RPE-Störung.</p>	<p>1) Die Einschlusskörperchen waren zwei- bis dreifach kleiner, als die typischen Melanosomen im RPE.</p> <p>2) Die Einschlusskörperchen lokalisierten sich nicht nur in der Photorezeptorenschicht, sondern auch in der ÄKS, ÄPS, IKS und IPS.</p>
Altersbedingte Lipofuszingranula	<p>1) Die Lipofuszingranula können manchmal den oben beschriebenen Granula vergleichbar aussehen.</p> <p>2) Lipofuszin ist ein Produkt der Lipidperoxidation. Angeblich induziert Amiodaron diesen Prozess (93).</p>	<p>1) Die Lipofuszingranula haben eine unregelmäßige Struktur mit erhaltenen Lipidtropfen.</p> <p>2) Oben beschriebene Granula wurden in der Netzhaut bereits nach 22 Versuchswochen beobachtet.</p> <p>3) Abwesenheit der Granula in der Netzhaut der Kontrolltiere.</p>

<p>Durch Amiodaron-Lipid-Komplexe bedingtes Speicherungs-material</p>	<p>Die Granula sahen untypisch für Lipofuszingranula und kleiner als Melanosomen aus.</p>	<p>1) Die Einschlusskörperchen wurden lediglich bei fünf Amiodarontieren gefunden. 2) Für den Speicherkrankheitsprozess untypische Lokalisation der Granula.</p>
<p>Phagolysosomales Material anderer Genese (z.B. durch verstärkte Zelldestruktion verursachter Lipofuszinose-ähnlicher Prozess)</p>	<p>1) Die Einschlusskörperchen sahen untypisch für Lipofuszingranula und kleiner als Melanosomen aus. 2) Für den Speicherkrankheitsprozess untypische Lokalisation der Granula. 3) Mit Lipofuszinose vergleichbare Überladung der Lysosomen in Folge der ausgeprägten Zelldestruktion u.a. durch induzierende Wirkung des Amiodaron auf die Produktion freier Radikale (93). 4) Netzhaut-Lipofuszinose äußert sich klinisch durch Irregularität der Pigmentation. Ein weißfleckiger Fundus bei einigen Mäusen kann auf die sekundäre Pigmentverschiebung im RPE hinweisen.</p>	<p>Die Einschlusskörperchen wurden lediglich bei fünf Amiodarontieren beobachtet.</p>

Über den im letzten Punkt der Tabelle erwähnten möglichen Mechanismus der retinalen Veränderungen nach der Amiodaronbehandlung gibt es nach unserem Kenntnisstand keine Berichte. Es wird bei Amiodaron nur durch wenige Autoren neben der kationisch-amphiphilen Eigenschaft *ein durch Induktion freier Radikale zellschädigender Effekt* postuliert, der sich in vitro und in einer tierexperimentellen Arbeit an Ratten als Lipidose manifestierte (93).

Durch die ausgeprägte Zeldestruktion könnte ein mit der Lipofuszinose vergleichbarer lysosomaler Speicherungsprozess induziert werden. Es ist bekannt, dass Melanin bei dem oxidativen Stress der Zelle vermehrt verbraucht wird, denn Melanin dient als Radikalfänger und schützt die Zelle vor Lipidperoxidation. *Mit reduzierter Aktivität der Melanosomen steigt die Lipofuszinakkumulation an*, die sich bei der Lipofuszinose im Auge *klinisch als unregelmäßige Netzhaut-Pigmentverteilung* manifestiert (30, 72). Bei einigen mit Amiodaron behandelten Mäusen wurde in unserer Studie eine Reduzierung der Menge und der Größe der Melanosomen im RPE festgestellt. Möglicherweise basieren auch die weißfleckigen funduskopischen Veränderungen der Netzhaut einiger Mäuse der Amiodarongruppe in unserer Studie auf die Pigmentverschiebung im RPE, die mit einem Lipofuszinose-ähnlichen lysosomalen Speicherungsprozess zusammen hängen.

Die „Migration der RPE-Zellen nach innen“ stellte offensichtlich auch in früheren Studien dieses osmiumphile lysosomale Material dar. Ebenfalls wurden bei der Lipofuszinose mikroskopisch gefundene osmiumphile lysosomale Einlagerungen lange Zeit als Melanin bzw. Melanin-ähnliches Pigment bezeichnet (10, 26).

Das Fehlen von Einschlusskörperchen im RPE und der GZS bei den mit Amiodaron behandelten Tieren in unserer Studie könnte durch die *niedrige Permeabilität der inneren und äußeren Blut-Retina-Schranken für Amiodaronmoleküle* erklärt werden. Es wurde über die fehlende Durchlässigkeit für Amiodaronmoleküle durch die Blut-Hirn-Schranke berichtet (23). Da die endotheliale Blut-Hirn-Schranke und die endotheliale innere Blut-Retina-Schranke aus dem Mesenchym stammen und dadurch strukturell identisch sind, haben sie auch eine ähnliche Permeabilität (87). Darüber hinaus wurde bei Mäusen funktionelle Ähnlichkeit der inneren und äußeren Blut-Retina-Schranken im in-vivo Modell festgestellt (87).

Ein anderer Faktor, der auch einen Einfluss auf das Eintreten und die Reversibilität bzw. das Fehlen der histologischen Veränderungen in der Netzhaut haben könnte, darf nicht

ausgeschlossen werden - die ausreichende Selbstreinigungskapazität der Zellen in den Schichten, aus denen das abnormale Material der Lysosomen mittels eines Mikrozirkulationssystems entfernt werden kann (in der Netzhaut sind das die inneren Schichten und das RPE). Möglicherweise spielte dies auch eine Rolle für die Akkumulation der Einschlusskörperchen in unserer Amiodarongruppe vorwiegend in den dazwischen liegenden Schichten der Netzhaut.

Der Selbstreinigungsprozess wurde ausführlich in der Einleitung beschrieben (S.9).

Dies alles lässt vermuten, dass die histologischen Veränderungen in der Photorezeptorenschicht, ÄKS, ÄPS und IKS der mit Amiodaron behandelten Mäuse  *eher Ausdruck des, durch verstärkte Zellschädigung bedingten, Lipofuszinose-ähnlichen Prozesses* und weniger Ausdruck der mit kationisch-amphiphiler Eigenschaft zusammenhängenden Speicherung der Medikament-Lipid-Komplexe sind.

Die Ergebnisse der klinischen Studien von mit Amiodaron behandelten Patienten sind nicht ganz eindeutig.

Die Berichte über fehlende Nebenwirkungen des Amiodarons auf die Netzhaut beziehen sich auf die Untersuchungen mit Visometrie, Biomikroskopie, Ophthalmoskopie in den Gruppen von 8 bis 140 Patienten nach dreimonatiger bis zehnjähriger Amiodarontherapie mit einer Tagesdosis von 100 bis 1200 mg/d (24, 43, 49, 69).

Das Fehlen der retinalen Veränderungen von Amiodaron in diesen Studien könnte mit der langsamen Akkumulation der Amiodaron-Lipid-Komplexe zusammenhängen, was dazu führen könnte, dass die okulären Symptome so lange fehlen, bis eine bestimmte Konzentration im Gewebe erreicht ist, die die Funktion des Organs beeinträchtigen kann. Außerdem spielt der individuelle Zustand des Metabolismus, des Kreislaufs und der Funktion von Leber und Nieren der Patienten eine Rolle sowie die nicht identische Gestaltung der Studien.

Nach unserem Wissensstand wurden 16 Retinopathiefälle bei den mit Amiodaron behandelten Patienten beschrieben: diabetische Retinopathie bei einem Patient und 15 Fälle mit Makulaveränderungen, davon eine ausgeprägte Makulopathie bei zwei Personen (8, 22, 74, 90). Bei der einen Patientin trat die feuchte Makuladegeneration nach 3 Monaten der Amiodarontherapie mit kumulativer Dosis von 34 g auf (90). Bei dem anderen Patienten waren nach 17 Monaten der Medikamentengabe sowohl klinische, als auch funktionelle Veränderungen wie parazentrale Skotome, Störung des Farbsinns, Arden Quotient-Reduktion

bei dem EOG, ERG-Veränderungen und eine Verlängerung der Latenz der P100 bei den VECP nachweisbar. Allerdings hatte der Patient in der Vorgeschichte eine Chloroquintherapie, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnte (22).

Bis auf die 5 Personen gab es bei den weiteren Patienten keine akzeptablen EOG, ERG, VEP und Gesichtsfeld-Störungen (8, 22).

Da Amiodaron meistens älteren Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen verordnet wird, ist es nicht leicht, die Amiodaron-induzierten Nebenwirkungen auf die Netzhaut von einer sonstigen unspezifischen retinalen alters- oder gesundheitsbedingten Pathologie zu differenzieren.

### **Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen**

Die in den beiden Versuchsgruppen auftretende Vakuolisierung des RPE und der GZS in den Anfangswochen und eine Auflockerung der Photorezeptorenschicht sowie eine Reduzierung der Dichte der ÄKS im späteren Verlauf des Experimentes waren bei den mit Chloroquin behandelten Mäusen ausgeprägter als bei den mit Amiodaron behandelten. Darüber hinaus unterschieden sich die histologischen Befunde in der Amiodarongruppe durch Pigmentverschiebung im RPE und in der Charakteristik der Einschlusskörperchen (späterer Eintrittszeitpunkt, Reversibilität, Struktur und für kationisch-amphiphile Substanzen untypische Lokalisation).

### **Typen der histologischen Einlagerungen und ihre Lokalisation**

Wir fanden in unserer Studie einen Zusammenhang zwischen den Einlagerungstypen und ihrer Lokalisation. Diese Verteilung der Inklusionen hängt sowohl mit den in den Schichten vorhandenen Lipidarten und mit dem Medikamentenmetabolismus bzw. mit der Arzneimitteldurchdringungskapazität durch die Blut-Retina-Schranke, als auch mit ihrer Zellreinigungskapazität bzw. Blutversorgung der entsprechenden Schichten zusammen.

Die *lamellären Inklusionen* (Chloroquingruppe) lagerten sich vorwiegend in den Schichten ab, in denen die Blutzirkulation vorhanden (die GZS, IPS, IKS) bzw. dazu nahliegend war (RPE). Es ist nachgewiesen, dass durch die äußere Blut-Retina-Schranke penetriertes Chloroquin eine bis zu 1000-fach höhere Konzentration im RPE gegenüber der Plasmakonzentration erreichen kann (34, 65, 75, 79). Die höhere Medikamentenkonzentration begünstigt die Bildung und die Sammlung der Medikament-Lipid-Komplexe in den oben genannten Schichten.

Bei Autophagie kommt es in den Ganglienzellen, die im Vergleich zu den anderen Zellen

langlebiger sind, in der Regel zur graduellen Akkumulation des Speichermaterials, die fast ausschließlich in Form von lamellären und deutlich weniger kristalloiden Granula auftritt (58). Im RPE sammeln sich aber in der Regel diffuse kristalloide Einschlusskörperchen, vermutlich wegen des vorhandenen im Pigmentblatt Phosphatidylethanolamins sowie des Phosphatidylcholins (58). Andererseits sind diese Lipide nahezu die einzigen, an die sich Chloroquin im RPE bindet (58). Möglicherweise neigen diese Lipidarten bei ausschließlicher Anwesenheit von *Chloroquin* zur Bildung von *lamellären Strukturen*, da beim Chloroquin die Bildung der Medikament-Lipid-Komplexe eher einen anderen Mechanismus hat als bei den übrigen kationisch-amphiphilen Substanzen (58, 77). Das Medikament führt auch bei Ratten in der Regel zur Akkumulation von lamellären und extrem selten von kristalloiden Einschlusskörperchen (58).

Die *kristalloiden Inklusionen* (Amiodarongruppe) lokalisierten sich in unserer Studie überwiegend in der Photorezeptorenschicht, etwas weniger in der ÄKS, ÄPS und IKS. Die Einlagerung der Inklusionen in den Photorezeptoren könnte damit zusammen hängen, dass die Diskusmembranen der Außensegmente der Photorezeptoren eine große Menge der Phosphatidylethanolamine beinhalten, die mit den kationisch-amphiphilen Substanzen generell zur Bildung der kristalloiden Granula neigen (58).

Darüber hinaus führt die verstärkte Zellestruktion, die durch Amiodaron-bedingte Vermehrung freier Radikale zustande kommt, in den oben genannten, von dem Mikrozirkulationssystem fern liegenden Schichten mit verminderter Zellreinigungskapazität zur Überladung der Lysosomen und bei Dauerapplikation weiterhin zur Sammlung lysosomaler Einschlusskörperchen.

### 5.3.3 ERG

Über elektrophysiologische Untersuchungen von mit Amiodaron behandelten Patienten gibt es nur wenige Berichte (8, 22, 49). Anfang der 80er Jahre wurden bei sechs mit Amiodaron behandelten Patienten die EOG-, Ganzfeld-ERG- und Muster-ERG-Untersuchungen durchgeführt. Bei drei Patienten waren die ERG-Werte außerhalb des Normbereiches. Dabei hatte ein Patient eine diabetische Retinopathie und ein anderer eine Katarakt. Diese beiden Pathologien könnten die elektrophysiologischen Ergebnisse beeinflusst haben (49).

In unserer Studie zeigten die Werte der oszillierenden Potentiale in der Amiodarongruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 16 und 22 Wochen eine signifikante reversible Reduktion der Frequenz bei der Lichtintensität von  $10 \text{ mcds/m}^2$  und der Amplitude bei der

Lichtintensität von  $100 \text{ mcds/m}^2$ , sowie eine Verlängerung der Gipfelzeit bei der Standardlichtintensität von  $3000 \text{ mcds/m}^2$ . Die reduzierten Werte der oszillierenden Potentiale können bei der, nur bei den wenigen Tieren morphologisch gefundenen, retinalen Pathologie eine prognostische Bedeutung haben und das Ausmaß der Schädigung verdeutlichen.

Im Gegensatz dazu waren die a- und b- Wellen in Amplituden und Gipfelzeiten gegenüber der Kontrollgruppe nicht verändert (84, 85), somit scheint die Sensitivität der oszillierenden Potentiale für die funktionelle Widerspiegelung der toxischen Einflüsse des Amiodaron auf die Mausretina von größerer Bedeutung. Dies wird auch durch die Aussagen anderer Autoren gestützt (96).

Insgesamt deuten die Daten der funktionellen und morphologischen Befunde der Mausretina in der Amiodarongruppe auf einen retinotoxischen Effekt des Medikamentes hin.

Ob es sich hierbei im Wesentlichen um eine durch die kationisch-amphiphile Eigenschaft bedingte, medikamenteninduzierende Speicherung der Medikament-Lipid-Komplexe oder eher um einen toxischen Effekt anderer Genese handelt, z.B. um den oben dargestellten möglichen Lipofuszinose-ähnlichen Prozess mit reinen Lipideinlagerungen, könnte durch immunhistochemische Untersuchungen in weiteren Studien genauer erforscht werden.

### **Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen**

Somit zeigten die oszillierenden Potentiale in den beiden Versuchsgruppen einige Veränderungen. Im Unterschied zu den mit Chloroquin behandelten Tieren traten sie in der Amiodarongruppe später auf, waren weniger ausgeprägt und reversibel.

Gleichzeitig ergaben sich Schwankungen der Werte der oszillierenden Potentiale auch in der Kontrollgruppe, die durch verschiedenen Faktoren verursacht sein könnten. Dabei ist der Biorhythmus der Tiere, vor allem der Tagesrhythmus, zu bedenken (46). Außerdem brauchte die ERG-Prozedur zu jedem Messungszeitpunkt jeweils 2-3 Tage bis alle Tiere untersucht worden waren. Das Experiment dauerte insgesamt 70 Wochen. Damit kann der Einfluß der möglichen saisonalen und Tagesschwankungen für die Aktivität der Mausretina nicht ganz ausgeschlossen werden.

### **5.4 Korrelation zwischen den histologischen- und funduskopischen Befunden**

In unserer Studie zeigte sich eine signifikante Korrelation sowohl zwischen den lamellären histologischen Einlagerungen, die überwiegend in der IPS und GZS lokalisiert waren, und den weißfleckigen funduskopischen Veränderungen Typ 1 (Chloroquingruppe), wie auch

zwischen den, überwiegend in der Photorezeptorenschicht gelegenen, kristalloiden Einlagerungen und den weißfleckigen funduskopischen Veränderungen Typ 2 (Amiodarongruppe). Unseres Wissens nach wurde dieser Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen histologischen- und funduskopischen Befunden bisher nicht untersucht.

## **5.5 Korrelation zwischen den funktionellen- und morphologischen Befunden**

Eine gewisse, allerdings nicht-signifikante Korrelation ergab sich zwischen den elektronenmikroskopisch gefundenen lamellären Granula und den pathologischen oszillierenden Potentialen bei mit Chloroquin behandelten Tieren. Dabei lokalisierten sich die Einlagerungen überwiegend in der GZS und IPS und weniger in der IKS und im RPE. Da die oszillierenden Potentiale überwiegend die Funktion der IPS, in der sich die Fortsätze der Bipolar- und Amakrinenzellen und die Dendriten der Ganglienzellen befinden, widerspiegeln, können die Veränderungen in der Chloroquingruppe entsprechend erklärt werden (4, 96).

Bei den mit Amiodaron behandelten Mäusen mit histologisch gefundenen kristalloiden Granula, die sich überwiegend in den Photorezeptoren, in der ÄKS, ÄPS, weniger in der IKS und kaum in der IPS befanden, waren die oszillierenden Potentiale nur teilweise verändert.

Dabei ist auch ein möglicher Einfluß der mit dem Tagesrhythmus zusammen hängenden retinalen, funktionellen und organischen Schwankungen, wegen des zeitlichen Abstandes der funktionellen und morphologischen Untersuchungen, nicht auszuschließen. Die Abbau- und Aufbauprozesse in der Netzhaut, z.B. das „disc shedding“ mit danach folgender lysosomaler Autophagie und der Erneuerung der Photorezeptorenssegmente, haben einen Tagesrhythmus. Bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus 12 h:12 h hat der Prozess „disc shedding“ ein Maximum zwischen 08.00 und 09.00 mit 2-3-stündiger Verzögerung des Maximums der Autophagie. Dabei prävaliert zum Tagesbeginn das „disc shedding“ der Stäbchen und zum Nachtbeginn jenes der Zapfen. Diese Tagesrhythmen und medikamentenverbundenen Prozesse können sich gegenseitig beeinflussen (46).

Die lysosomale Autophagie der Stäbchensegmente im RPE läuft bei Licht aktiver als in der Dunkelheit ab (46). Damit könnte das Fehlen der mikroskopischen, lysosomalen Einlagerungen in der Retina bei manchen Tieren erklärt werden, denn zum Zeitpunkt der Schlachtung der Tiere zum histologischen Zweck war der Höhepunkt der Aufarbeitung des lysosomalen Materials bereits erfolgt.

## 5.6 Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen

Die Chloroquin-Retinopathie beim Menschen unterscheidet sich von dem Bild der Retinopathie bei Mäusen in unserer Studie sowie bei Ratten in anderen Studien: bei Menschen sind das RPE und die äußeren Netzhautschichten betroffen, was sich durch Pigmentstörungen und degenerative Veränderungen äußert. Bei Mäusen und Ratten lagerten sich die Einschlusskörperchen in den inneren Schichten ein (14, 28, 50). Degenerationen der äußeren Schichten traten bei Ratten und Mäusen sekundär auf (14, 28).

Mögliche Unterschiede in der Struktur und Permeabilität der beiden Blut-Retina-Schranken für Chloroquin zwischen Menschen und Mäusen könnten dafür verantwortlich sein.

Bei den Medikamenten- und Nebenwirkungen spielen die Biotransformation und die Ausscheidungsabweichungen eine große Rolle. Menschen und Tiere unterscheiden sich bei der Medikamentengabe durch die Pharmakinetik und die gesamte Wirksamkeit des Medikamentes, sowie durch die rhythmischen Tagesschwankungen der Empfindlichkeit auf ein bestimmtes Medikament. Diese Differenzen sowie metabolisch-enzymatische Besonderheiten schränken die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Tierexperimenten auf Menschen ein (46).

In der Regel ist die verwendete gewichtsadaptierte Dosis für die Tierexperimente viel höher als bei der Behandlung von Menschen – bis zu 18-fach höher für Chloroquin, bis zu 70-fach höher für Amiodaron, und bis zu 40-fach höher für andere Medikamente (23, 58). Bei kleinen Laboratoriumstieren läuft der Medikamentenmetabolismus im Gegensatz zum Menschen sehr viel schneller ab und daher ist eine höhere Dosis des Medikamentes bei Mäusen für einen vergleichbaren therapeutischen Effekt erforderlich. Beispielsweise beträgt die Plasma-Eliminations-Halbwertszeit nach einer Dosis von Amiodaron beim Menschen 20 bis 120 Tage und bei Ratten 8,5 Stunden (23). Entsprechend ist die minimale Dosis, die eine Lipidose induziert, beim Menschen viel niedriger als bei Tieren (58).

Darüberhinaus ist davon auszugehen, dass eine längere Verweildauer des Medikamentes im Menschen mehr Nebenwirkungen induziert. Der Prozess der Reversibilität der Lipidose kann analog betrachtet werden – beim Menschen bilden sich diese innerhalb von Monaten, bei den Versuchstieren innerhalb von Wochen zurück. Dieser generelle Unterschied des Medikamentenmetabolismus zwischen dem Menschen und der Maus bzw. der Ratte lässt sich am ehesten durch die spezifische Enzymbesonderheiten erklären (58).

Es sind hier auch die unterschiedlichen Verhältnisse des Körpergewichts zur Körperoberfläche zu berücksichtigen (46).

Unsere Studienergebnisse der nachgewiesenen retinotoxischen Wirkung der Chloroquin- und Amiodaronbehandlung auf die Netzhaut der Maus sind zwar nicht direkt auf den Menschen übertragbar, aber sie ermöglichen eine Risikoabwägung zwischen den Nebenwirkungen des Medikamentes einerseits und seiner Effektivität andererseits.

Bei dem in unserer Studie unter Amiodarongabe beobachteten, höchst-wahrscheinlich radikalbedingten Netzhaut-Schaden sollte die Empfehlung einiger Autoren berücksichtigt werden, bei der Amiodaronbehandlung des Menschen eine vorläufige Antioxidantientherapie durchzuführen (93).

Da bei Menschen nur Gipfelzeit und Amplitude des II. oszillierenden Potentials bei der Beurteilung der oszillierenden Potentiale ausgewertet werden, ist es sinnvoll zur Sicherheit auch die Frequenz der Potentiale zu messen und auszuwerten, um Netzhaut-Veränderungen rechtzeitig feststellen zu können.

Die Bestimmung der sensitivsten Reizlichtintensität für die Frequenz beim humanen ERG sowie der histochemischen Struktur der histologischen Veränderungen durch Amiodarongabe bleibt weitergehenden Untersuchungen vorbehalten.

## 6 Zusammenfassung

Die Aufgabe der vorliegenden Dissertation bestand darin, funktionelle und morphologische Veränderungen der Mausretina nach der Behandlung mit den kationisch-amphiphilen Medikamenten Chloroquin und Amiodaron einzuschätzen und zu vergleichen.

Im Rahmen des Projektes „Nebenwirkungen kationisch-amphiphiler Medikamente auf die Netzhaut der Maus“ wurden in einer vorausgegangenen 70-wöchigen Forschungsarbeit Funduskopie, Elektretinographie bei verschiedenen Reizintensitäten und stichprobenartig lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen der über 26 Wochen mit Chloroquin (n=25), über 37 Wochen mit Amiodaron (n=20) behandelten Mäuse sowie der Kontrollmäuse (n=19) durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Bei den unauffälligen Amplituden und Gipfelzeiten der a- und b-Welle in der Amiodarongruppe sowie der Gipfelzeit beider Hauptkomponente des ERG in der Chloroquingruppe (Standardreizintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup>) sollten in der aktuellen Studie die Nebenkomponten des ERG (oszillierende Potentiale) bezüglich ihrer Amplitude, Gipfelzeit und Frequenz bei mehreren Reizintensitäten ausgewertet werden. Zusätzlich erfolgte systematisch die Beurteilung der funduskopischen Befunde und die elektronenmikroskopische, histologische Untersuchung nahezu aller Versuchstiere, da bei der stichprobenartigen, histologischen Mikroskopie in der vorausgegangenen Arbeit einige Lipidosezeichen in beiden Versuchsgruppen gefunden wurden.

Bei der Auswertung der oszillierenden Potentiale aller Tiere vom Versuchsbeginn stellte sich heraus, dass die Amplituden der oszillierenden Potentiale ihr Optimum der Auswertbarkeit bei einer Reizintensität von 100 mcDs/m<sup>2</sup> zeigten, sowie auch die Gipfelzeit bei 3000 mcDs/m<sup>2</sup> und die Frequenz bei 10 mcDs/m<sup>2</sup>. Daher wurden die Parameter der oszillierenden Potentiale weiterhin bei der Standard- sowie bei den optimalen Reizintensitäten ausgewertet.

Bei den oben erwähnten Reizintensitäten konnten signifikante Unterschiede der oszillierenden Potentiale zwischen der Chloroquingruppe und der Kontrollgruppe nach 12 bis 37 Versuchswochen ermittelt werden. Elektronenmikroskopisch ließen sich nach 12 Wochen in den inneren Netzhautschichten und im RPE lamelläre Einschlusskörperchen, sowie funduskopisch generalisierte, weißfleckige, gut abgegrenzte, wie Einlagerungen aussehende, deutliche Veränderungen finden. Der Zusammenhang beider morphologischer Befunde miteinander sowie jeweils mit der Chloroquinbehandlung war signifikant. Die Veränderungen bei all diesen Untersuchungen waren irreversibel.

In der Amiodarongruppe ließen die Werte der oszillierenden Potentiale ausschließlich bei den oben erwähnten optimalen Reizintensitäten nach 16 und 22 Wochen signifikante reversible Veränderungen feststellen. Nach 22 und 37 Behandlungswochen wurden bei einem Drittel der mit Amiodaron behandelten Mäuse elektronenmikroskopisch vorwiegend in den Photorezeptoren gelagerte, kristalloide Granula nachgewiesen, die zum Ende des Experimentes (29 Wochen nach dem Absetzen) kaum bzw. nicht mehr zu finden waren.

Funduskopisch wurden bei einigen Tieren während der Behandlung generalisierte, weißfleckige, schlecht abgegrenzte, im Verlauf reversible Veränderungen der Netzhaut nach 8 Behandlungswochen beobachtet. Diese hingen offensichtlich mit einer Pigmentblattstörung zusammen, denn auch mikroskopisch wurde bereits zu diesem Zeitpunkt bei noch fehlenden Einschlusskörperchen eine Reduzierung der Melanosomenmenge und -größe im retinalen Pigmentepithel nachgewiesen. Die morphologischen Befunde zeigten eine signifikante Korrelation miteinander wie auch mit der Amiodaronbehandlung. Die mikroskopisch gefundenen kristalloiden Granula sind vermutlich in Anbetracht einer verstärkten Zellschädigung durch die bekannte radikalinduzierende Wirkung des Amiodarons eher Ausdruck des dadurch bedingten Lipofuszinose-ähnlichen Prozesses und weniger der durch kationisch-amphiphile Eigenschaft bedingte Speicherung der Medikament-Lipid-Komplexe.

Im Rahmen dieser Studie konnte anhand der funktionellen und morphologischen Befunde der Mausretina eine retinotoxische Wirkung sowohl des Chloroquins als auch des Amiodarons nachgewiesen werden. Dabei traten die durch Amiodaron verursachten Veränderungen später und mit weniger Ausprägung auf, waren reversibel und vermutlich anderer Genese als die durch Chloroquin.

Die oszillierenden Potentiale haben in unserer Studie bessere Sensitivität auf die retinale Medikamentennebenwirkung gezeigt als die a- und b-Wellen in der vorausgegangenen Arbeit.

Obwohl die Übertragung der Ergebnisse von Tierexperimenten auf den Menschen nur begrenzt möglich ist, hilft sie eine Risikoabwägung zwischen den Nebenwirkungen des Medikamentes einerseits und der Wirkung des Medikamentes andererseits darzustellen.

Von großer Bedeutung sind regelmäßige und engmaschige ophthalmologische Untersuchungen der Patienten sowohl bei einer Chloroquin- als auch bei einer Amiodaronbehandlung.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Abraham R, Hendy R: Effects of chronic chloroquine treatment on lysosomes of rat liver cells. *Exp Mol Pathol* 12 (1970) 148-159
2. Aktories K, Förstermann, Hofmann F, Starke K: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6. Aufl. Urban & Fischer, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 1992
3. Algvere P, Wachtmeister L, Westbeck S: On the oscillatory potentials of the human electroretinogram in light and dark adaptation. *Acta Ophthalmol* 50 (1972) 737-757
4. Altenmüller E et al.: Visuell evozierte Potentiale (VEP) und Elektroretinogramm (ERG). In: Stöhr M, Dichangs J, Buettner U, Hess C, Altenmüller E (Hrsg): Evozierte Potentiale. 3.Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1996, S.364-391
5. Amabeoki G: Involvement of GABAergic mechanisms in chloroquine-induced seizures in mice. *Gen Pharmacol* 23 (1992) 225-229
6. Arden G, Kolb H: Antimalarial therapy and early retinal changes in patients with rheumatoid arthritis. *Br Med J* 29 (1966) 270-273
7. Axenfeld Th, Pau H: Lehrbuch und Atlas der Augenheilkunde. 12. neu bearbeitete Aufl. Fischer Verlag, Stuttgart, 1980
8. Babel J, Stangos N: Iatrogenic ocular lesions; action of a new medicament against angina pectoris. *Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol* 30 (1970) 197-208
9. Bach M, Kellner U: Elektrophysiologische Diagnostik in der Ophthalmologie. *Ophthalmologie* 12 (2000) 898-920
10. Bellhorn R: Laboratory Animal Ophthalmoscopy. In: Gelatt K (Ed): Textbook of Veterinary Ophthalmology. Lea & Febiger, Philadelphia, 1981, S.649-671
11. Bernstein H: The pathology of chloroquin retinopathy. *Arch Ophthalmol* 71 (1964) 238-245
12. Bernstein H: Ophthalmologic considerations and testing in patients receiving long term antimalarial therapy. *Am J Med* 75 (1983) 25-34
13. Bockhardt H, Drenckhahn D, Luellmann-Rauch R: Amiodarone-induced lipodosis-like alterations in ocular tissue of rats. *Graefes Arch.Clin Exp Ophthalmol* 207 (1978) 91-96
14. Bredehorn T, Duncker G: Chloroquin und Chlorphentermin induzierte Lipidose der Rattenretina. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 214 (1999) 178-182
15. Bredehorn T, Duncker G: Tiloron induzierte funktionelle Veränderungen der Rattenretina. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 216 (2000) 219-222
16. Bredehorn T, Harm P, Simon E, Holzhausen H.-J, Duncker G. I. W: Amiodaron-induzierte Lipidose: ultrastruktureller Nachweis und funktionelle Untersuchungen der Retina der Maus. *Der Ophthalmologe Suppl* 1 (2002) 226
17. Browning D: Hydroxychloroquine and chloroquine retinopathie: screening for drug toxicity. *Am J Ophthalmol* 133 (2002) 649- 655
18. Bühl A, Zöfel P: SPSS: Version 8, Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. 5. Aufl. Addison-Wesley, Bonn, Menlo Park, New York (usw.), 1998
19. Carr R, Henkind P, Rothfield N, Siegel I: Ocular toxicity of antimalarial drugs. *Am J Ophthalmol* 66 (1968) 738-744
20. Carter-Dawson L, Lavail M: Rods and cones in the mouse retina, structural analysis using light electron microscopy. *J Comp Neurol* 188 (1979) 245-262
21. Cheville N: Ultrastructural Pathology: an Introduction to Interpretation. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1994
22. Clemett R, MacKintosh H: Drug induced ocular lipodosis. *Trans Ophthalmol Soc NZ* 34 (1982) 52-58
23. Costa-Jussa F, Jacobs J: The Pathology of Amiodarone Neurotoxicity. *Brain* 108 (1985) 735-752
24. D'Amico D, Kenyon K, Ruskin J: Amiodarone keratopathy. Drug-induced lipid storage disease. *Arch. Ophthalmol* 99 (1981) 257-261
25. Denden A: Über den Einfluß des Adaptationsniveaus auf die oszillierenden ERG-Potentiale. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 205 (1978) 279-288

26. Dickersin G: Diagnostic Electron Microscopy. 2. Aufl. Springer, Igaku-Shoin, New York, 1988
27. Drenckhahn D, Lullmann-Rauch R: Lens opacities associated with lipidosis-like ultrastructural alterations in rats treated with chloroquine, chlorphentermine, or iprindole. *Exp Eye Res* 24 (1977) 621-632
28. Duncker G, Bredehorn T: Chloroquine-induced lipidosis in the rat retina: functional and morphological changes after withdrawal of the drug. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234 (1996) 378-381
29. Duncker G I W, Bredehorn T: Chlorphentermine-induced lipidosis in the rat retina: a functional and morphological study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232 (1994) 368-372
30. Dustin P: Storage diseases. In: Papadimitriou J, Henderson D, Spagnolo D (Eds): Diagnostic ultrastructure of non-plastic diseases. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Madrid (usw.), 1992, S.110-123
31. Easterbrook M: Dose relationships in patients with early chloroquine retinopathy. *J Rheumatol* 14 (1987) 472-475
32. Easterbrook M: screening for antimalarial toxicity: current concepts. *Can J Ophthalmol* 37 (2002) 325-328
33. Ellenhorn M, Barceloux D: Medical Toxicology – Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1988.
34. Estler C: Pharmakologie und Toxikologie. 5.Aufl. Schattauer, Stuttgart, New York, 2000
35. Feiner L, Younge B, Kazmier F, Stricker B, Fraunfelder F: Optic neuropathy and amiodarone Therapy. *Mayo Clin Proc* 62 (1987) 702-717
36. Francois J, Maudgal M: Experimental chloroquine keratopathy. *Am J Ophthalmol* 60 (1965) 459-464
37. Francois J: Cornea verticillata. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 150 (1968) 656-670
38. Ghadially FN: Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix. 4.Aufl. Butterworth-Heinemann, Boston, Oxford, Johannesburg (usw.), 1997, S. 619-867
39. Ghosh M, McCulloch C: Amiodarone-induced ultrastructural changes in human eyes. *Can J Ophthalmol* 19 (1984) 178-186
40. Gibson J, Fielder A, Garner A, Millac P: Severe ocular side effects of perhexilene maleate: case report. *Br J Ophthalmol* 68 (1984) 553-560
41. Gittinger J, Asdourian G: Papillopathy caused by amiodarone. *Arch Ophthalmol* 105 (1987) 349-351
42. Hallberg A, Naeser P, Andersson A: Effects of long-term chloroquine exposure on the phospholipid metabolism in retina and pigment epithelium of the mouse. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 68 (1990) 125-130
43. Harris L, McKenna W, Rowland E, Krikler D: Side effects and possible contraindications of amiodarone use. *Am Heart J* 106 (1983) 916-922
44. Heckenlively J, Winston J, Roderick T: Screening for mouse retinal degenerations. *Doc Ophthalmol* 71 (1989) 229-239
45. Heger J, Prystowsky E, Zipes D: Relationships between amiodarone dosage, drug concentrations, and adverse side effects. *Am Heart J* 106 (1983) 931-935
46. Herde J: Die peristatische Entwicklung von Rosetten der Netzhaut im chronobiologischen Modell. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr.med.habil., Halle, 1990
47. Hobbs H, Sorsby A, Freedman A: Retinopathy following chloroquine therapy. *Lancet* 3 (1959) 478-480
48. Hobbs H, Eadie S, Somerville F: Ocular lesions after treatment with chloroquine. *Brit J Ophthalmol* 45 (1961) 284-297
49. Ingram D, Jaggarao N, Chamberline D: Ocular changes resulting from therapy with amiodarone. *Br J Ophthalmol* 66 (1982) 676-679
50. Ivanina T, Zueva M, Lebedeva M, Bogoslovsky A, Bunin A: Ultrastructural alteration in rat and cat retina and pigment epithelium induced by chloroquine. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 220 (1983) 32-38
51. Kanski JJ, Menon J: Klinische Ophthalmologie. 5.Aufl. Urban & Fischer, München, Jena, 2004

52. Kaplan L, Cappaert W: Amiodarone keratopathy. Correlation to dosage and duration. *Arch Ophthalmol* 100 (1982) 601-602
53. Kerin N, Aragon E, Fattel K, Frumin H, Rubenfire M: Long-term efficacy and toxicity of high- and low-dose amiodarone regimens. *J Clin Pharmacol* 29 (1989) 418-423
54. Klaua J, Bredehorn T, Holzhausen H.-J, Duncker G.I.W: Tamoxifen: Funktionelle Veränderungen der Mäuseretina nach chronischer Gabe von Tamoxifen. *Der Ophthalmologe* 97 Suppl 1 (2000) 21
55. Klaua J: Funktionelle und morphologische Veränderungen der Retina von Mäusen nach chronischer Gabe von Tamoxifen. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr.med., Halle, 2004
56. Klein C, Klingmüller M, Schellinski C, Landmann S, Hauschild S, Heber D, Mohr K, Hopfinger A: Synthesis, pharmacological and biophysical characterization, and membrane-interaction QSAR analysis of cationic amphiphilic model compounds. *J Med Chem* 42 (1999) 3874-3888
57. Latini R, Tognoni G, Kates R: Clinical Pharmacokinetics of Amiodaron. *Clin Pharmacokinet* 9 (1984) 136-156
58. Lüllmann-Rauch R: Drug induced lysosomal storage disorders. In: Dingle J, Jacques P, Shaw I (Hrsg): *Lysosomes in applied biology and therapeutics*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 1979, S. 49-123
59. Lüllmann H, Lüllmann-Rauch R: Tamoxifen-induced generalized lipidosis in rats subchronically treated with high doses. *Toxicology and applied Pharmacology* 61 (1981) 138-146
60. Mackenzie A: Dose refinements in long-term therapy of rheumatoid arthritis with antimalarials. *Am J Med* 75 (1983) 40-45
61. Mantyjarvi M, Tuppurainen K, Ikaheimo K: Ocular side effects of amiodarone. *Surv Ophthalmol* 42 (1998) 360-366
62. Marks J: Chloroquine retinopathy: is there a safe daily dose? *Ann Rheum Dis* 41 (1982) 52-58
63. Marmor M, Carr R, Easterbrook M, Farjo A, Mieler W: Recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy. A Report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 109 (2002) 1377-1382
64. McChesney E, Banks W, Sullivan D: Metabolism of chloroquine and hydroxychloroquine in albino and pigmented rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 7 (1965) 627-636
65. McEvoy G (ed): *American Hospital Formulary Service – Drug Information 93*. American Society of Hospital Pharmacists Inc., Bethesda, 1993
66. McEvoy G (ed): *American Hospital Formulary Service – Drug Information 2003*. American Society of Hospital Pharmacists Inc., Bethesda, 2003
67. Menner E: Zapfen in der Retina der Maus. *Cell Tissue Res* 11 (1930) 53-62
68. Naumann G.O.H(Hrsg.): *Pathologie des Auges I*. 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
69. Nielsen C, Andersen F, Bjerregaard P: Amiodarone induced cornea verticillata. *Acta ophthalmol* 61 (1983) 474-480
70. Nylander U: Ocular damage in chloroquine therapy. *Acta Ophthalmol* 44 (1966) 335-348
71. Percival S, Meanock I: Chloroquine: ophthalmological safety, and clinical assessment in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 3 (1968) 579-584
72. Peters S, Schraermeyer U: Charakteristika und Funktionen des Melanins im retinalen Pigmentepithel. *Ophthalmologe* 98 (2001) 1181-1185
73. Puavilai S, Kunavisarut S, Vatanasuk M, Timpatanapong P, Sriwong S et al. : Ocular toxicity of chloroquine among Thai patients. *Int J Dermatol* 38 (1999) 934-937
74. Raeder E, Podrid P, Lown B: Side effects and complications of amiodarone therapy. *Am Heart J* 109 (1985) 975-983
75. Raines M, Bhargava S, Rosen E: The blood-retinal barrier in chloroquine retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 (1989) 1726-1731
76. Rang H, Dale M, Ritter J: *Pharmacology*. 3. Aufl. Churchill Livingstone Inc., New York, 1995

77. Reasor MJ, Kasew S: Minireview. Drug-induced Phospholipidosis: are there functional consequences? *Exper Biology and Medicin* 226 (2001) 825-830
78. Reme C: Die Sinneszellen der Wirbeltiernetzhaute. Erneuerung, Rhythmen und Licht. *Naturwissenschaften* 73 (1986) 117-124
79. Rietbrock N, Staib A, Loew D: *Klinische Pharmakologie*. 3. Aufl. Steinkopff, Darmstadt, 1996
80. Riva E, Gerna M, Neyroz P, Urso R, Bartosek I et al.: Pharmacokinetics of amiodarone in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 4 (1982) 270-275
81. Sandritter W: *Allgemeine Pathologie*. 2. Aufl. Schattauer, Stuttgart, New York, 1981, S.202-215
82. Schlote T, Freudenthaler S, Stübiger N, Zierhut M: *Medikamentöse Nebenwirkungen am Auge*. Thieme Georg Verlag, Stuttgart, 2001
83. Sidman R: Histochemical studies on photoreceptor cells. *Ann N Y Acad Sci* 74 (1959) 182-195
84. Simon E: Morphologische und funktionelle Veränderungen der Retina von Mäusen nach chronischer Gabe von Amiodaron. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr.med., Halle, 2004
85. Simon E, Duncker G, Bredehorn T: Amiodaron: funktionelle und morphologische Untersuchungen der Retina der Maus. *Der Ophthalmologe Suppl* 1 (2001) 166
86. Späth G: Amiodaron: Antiarrhythmikum für therapieresistente Rhythmusstörungen. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1984
87. Steuer H, Jaworski A, Elger B, Kausmann M, Keldenich J et al.: Functional characterisation and comparison of the outer blood-retina barrier and the blood-brain barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 (2005) 1047-1053
88. Szel A, Röhlich P, Caffè A, Juliusson B, Aguirre G et al.: Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *J Comp Neurol* 325 (1992) 327-342
89. Thylefors B, Rolland A: The risk of optic atrophy following suramin treatment of ocular onchocerciasis. *Bull WHO* 57 (1979) 479-480
90. Thystrup J, Fledelius H: Retinal maculopathy possibly associated with amiodarone medication. *Acta Ophthalmol* 72 (1994) 639-641
91. Turdumambetova G, Bredehorn T, Duncker G: Okuläre Nebenwirkungen der Amiodaron-Therapie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 222 (2005) 485-492
92. Vaegan, Millar T: Effect of kainic acid and NMDA on the pattern electroretinogram, the scotopic threshold response, the oscillatory potentials and the electroretinogram in the urethane anaesthetized cat. *Vision Res* 34 (1994) 1111-1125
93. Vereckei A, Blazovics A, Gyorgy I, Feher E, Toth M: The role of free radicals in the pathogenesis of amiodarone toxicity. *J cardiovasc electrophysiol* 4 (1993) 161-177
94. Vrobel T, Miller P, Mostow N, Rakita L: A general over-view of amiodarone toxicity: its prevention, detection, and management. *Prog Cardiovasc Dis* 31 (1989) 393-426
95. Wachtmeister L: Luminosity functions of the oscillatory potentials of the human electroretinogram. *Acta Ophthalmol* 52 (1974) 353-365
96. Wachtmeister L: Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal? *Prog Retin Eye Res* 17 (1998) 485-521
97. Wilson J, Podrid P: Side effects from amiodarone. *Am Heart J* 121 (1991) 158-171
98. Wit W: *Bau des humanen Sehsystems*. Astroprint, Odessa, 2003
99. <http://www.augeninfo.de/leit/leit18.htm> vom 06.09.06
100. <http://www.med.uni-magdeburg.de/fme/kauge/Retina.pdf> vom 02.11.05
101. [http://www.neurop.ruhr-uni-bochum.de/~maxim/Downloads/MaxSehen02\\_Retina.pdf](http://www.neurop.ruhr-uni-bochum.de/~maxim/Downloads/MaxSehen02_Retina.pdf) vom 04.11.05
102. <http://www.opt.pacificu.edu/ce/catalog/11466-PH/WangDrugs.html> vom 13.10.06

## 8 Anlage

### Statistische Bearbeitung

**Tab.1 Liliefors-Test auf Normalverteilung**

Irrtumswahrscheinlichkeit, p		F 10	F 3000	A 100	A 3000	GZ 3000
Chloroquin	Kolmogorov-Smirnov-Test <sup>a</sup>	0,156	0,200	0,200	0,034	0,039
	Shapiro-Wilks-Test	0,046	0,385	0,745	0,066	0,002
Amiodaron	Kolmogorov-Smirnov-Test <sup>a</sup>	0,177	0,200	0,200	0,050	0,200
	Shapiro-Wilks-Test	0,012	0,381	0,642	0,041	0,081
Kontrollen	Kolmogorov-Smirnov-Test <sup>a</sup>	0,200	0,035	0,147	0,066	0,036
	Shapiro-Wilks-Test	0,970	0,026	0,448	0,062	0,022

a – Signifikanzkorrektur nach Liliefors

F10 – Frequenz der OP bei der Lichtintensität von 10 mcDs/m<sup>2</sup>

F3000 - Frequenz der OP bei der Lichtintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup>

A 100 – Amplitude des II.OP bei der Lichtintensität von 100 mcDs/m<sup>2</sup>

A 3000 – Amplitude des II.OP bei der Lichtintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup>

GZ 3000 - Gipfelzeit des II.OP bei der Lichtintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup>

### Deskriptive Statistik mit Irrtumswahrscheinlichkeit nach Mann-Whitney-U-Test

**Tab.2 Frequenz der OP bei der Lichtintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup>**

Gruppe	t	n	Min	Max	Mw	StDev	p
Chloroquin	0	25	51	90	70,80	10,966	0,977
Amiodaron	0	16	58	79	66,56	6,099	0,268
Kontrollen	0	9	55	80	70,78	10,232	
Chloroquin	4	22	50	65	52,41	3,788	0,345
Amiodaron	4	17	50	75	52,71	6,650	0,183
Kontrollen	4	7	50	75	57,43	10,518	
Chloroquin	8	18	50	59	51,56	2,572	0,570
Amiodaron	8	16	50	57	51,06	2,205	0,221
Kontrollen	8	7	50	56	52,00	2,769	
Chloroquin	12	12	50	65	51,42	4,316	0,227
Amiodaron	12	12	50	62	52,50	3,802	1,000
Kontrollen	12	8	50	57	51,63	2,560	
Chloroquin	16	14	50	59	51,57	3,081	0,200
Amiodaron	16	11	50	66	52,82	6,047	0,249
Kontrollen	16	8	50	56	52,75	2,659	
Chloroquin	22	12	50	65	53,17	4,821	0,166
Amiodaron	22	9	50	55	52,71	2,360	0,103
Kontrollen	22	7	50	55	50,71	1,890	
Chloroquin	32	9	50	88	59,89	15,366	0,636
Amiodaron	32	9	50	81	62,00	13,838	0,745
Kontrollen	32	6	50	73	57,92	9,151	
Chloroquin	37	10	50	80	56,40	10,956	0,452
Amiodaron	37	8	50	73	56,12	9,078	0,212
Kontrollen	37	6	50	71	53,50	8,573	
Chloroquin	65	9	50	85	58,11	14,743	0,809
Amiodaron	65	6	50	85	61,33	17,569	0,821
Kontrollen	65	3	50	66	55,33	9,238	

t – Versuchszeit in Wochen

n – Zahl der Tier mit auswertbaren ERG-Kurven

Min – minimaler Wert

Max – maximaler Wert

Mw – Mittelwert

StDev – Standardabweichung

p – Exakte Signifikanz (2-seitig) bei n<30

**Tab.3 Frequenz der OP bei der Lichtintensität 10 mcds/m<sup>2</sup>**

Gruppe	t	n	Min	Max	Mw	StDev	p
Chloroquin	0	20	81	121	108,45	10,149	0,060
Amiodaron	0	19	83	115	105,32	7,024	0,231
Kontrollen	0	8	96	111	103,13	4,883	
Chloroquin	4	20	50	97	75,30	13,147	0,127
Amiodaron	4	13	50	96	71,31	18,328	0,250
Kontrollen	4	6	50	104	84,00	18,676	
Chloroquin	8	17	50	99	68,94	15,449	0,075
Amiodaron	8	15	51	91	79,73	9,816	0,349
Kontrollen	8	6	51	105	82,00	19,698	
Chloroquin	12	11	50	79	63,55	11,639	0,019
Amiodaron	12	10	52	94	72,20	13,620	0,326
Kontrollen	12	7	65	99	81,86	12,681	
Chloroquin	16	6	50	88	71,83	13,920	0,019
Amiodaron	16	7	66	86	77,00	7,211	0,005
Kontrollen	16	8	77	98	88,75	6,606	
Chloroquin	22	11	50	79	62,73	11,507	<0,001
Amiodaron	22	9	51	99	76,89	19,477	0,066
Kontrollen	22	7	86	103	93,43	5,318	
Chloroquin	32	7	50	54	51,63	1,302	0,001
Amiodaron	32	7	50	97	76,71	15,766	0,346
Kontrollen	32	6	74	92	82,33	6,330	
Chloroquin	37	6	50	88	57,33	15,214	0,032
Amiodaron	37	8	50	94	73,25	19,367	0,553
Kontrollen	37	6	79	93	85,17	4,708	
Chloroquin	65	4	50	85	59,25	17,173	0,171
Amiodaron	65	6	53	100	82,17	16,461	0,548
Kontrollen	65	3	65	89	77,33	12,014	

**Tab. 4 Amplitude des II.OP bei der Lichtintensität 3000 mcds/m<sup>2</sup>**

Gruppe	t	n	Min	Max	Mw	StDev	p
Chloroquin	0	25	0,06	0,14	0,0957	0,02694	0,885
Amiodaron	0	16	0,06	0,19	0,0975	0,03624	0,713
Kontrollen	0	9	0,07	0,16	0,0986	0,03132	
Chloroquin	4	22	0,01	0,10	0,0386	0,02210	0,161
Amiodaron	4	17	0,01	0,08	0,0331	0,01621	0,054
Kontrollen	4	7	0,02	0,07	0,0471	0,01704	
Chloroquin	8	18	0,03	0,06	0,0450	0,01043	0,874
Amiodaron	8	16	0,02	0,11	0,0544	0,02658	0,475
Kontrollen	8	7	0,02	0,07	0,0429	0,02289	
Chloroquin	12	12	0,02	0,05	0,0358	0,01165	0,153
Amiodaron	12	12	0,03	0,08	0,0591	0,01375	0,088
Kontrollen	12	8	0,03	0,10	0,0500	0,02204	
Chloroquin	16	14	0,02	0,05	0,0329	0,01069	<0,001
Amiodaron	16	11	0,02	0,09	0,0518	0,02040	0,125
Kontrollen	16	8	0,05	0,07	0,0638	0,00744	
Chloroquin	22	12	0,01	0,04	0,0223	0,01092	<0,001
Amiodaron	22	9	0,02	0,09	0,0500	0,02291	0,506
Kontrollen	22	7	0,04	0,08	0,0557	0,01512	
Chloroquin	32	9	0,01	0,06	0,0311	0,01900	0,058
Amiodaron	32	9	0,02	0,07	0,0433	0,01500	0,313
Kontrollen	32	6	0,04	0,06	0,0500	0,00894	
Chloroquin	37	10	0,02	0,06	0,0340	0,01265	0,085

Amiodaron	37	8	0,02	0,07	0,0463	0,01685	0,720
Kontrollen	37	6	0,03	0,07	0,0500	0,01673	
Chloroquin	65	9	0,02	0,05	0,0322	0,00972	0,736
Amiodaron	65	6	0,02	0,05	0,0367	0,01033	0,405
Kontrollen	65	3	0,01	0,04	0,0267	0,01528	

**Tab.5 Amplitude des II.OP bei der Lichtintensität 100 mcads/m<sup>2</sup>**

Gruppe	t	n	Min	Max	Mw	StDev	p
Chloroquin	0	25	0,08	0,24	0,1580	0,04359	0,949
Amiodaron	0	16	0,09	0,20	0,1525	0,03000	0,768
Kontrollen	0	6	0,13	0,20	0,1567	0,02582	
Chloroquin	4	22	0,01	0,16	0,0727	0,03966	0,790
Amiodaron	4	17	0,03	0,12	0,0594	0,02794	0,265
Kontrollen	4	8	0,03	0,09	0,0700	0,02000	
Chloroquin	8	20	0,01	0,12	0,0630	0,03614	0,097
Amiodaron	8	16	0,07	0,20	0,1200	0,04050	0,103
Kontrollen	8	7	0,04	0,11	0,0886	0,02610	
Chloroquin	12	16	0,01	0,12	0,0650	0,03521	0,030
Amiodaron	12	13	0,04	0,20	0,1315	0,04634	0,901
Kontrollen	12	8	0,05	0,25	0,1362	0,07444	
Chloroquin	16	15	0,01	0,13	0,0607	0,04250	<0,001
Amiodaron	16	11	0,02	0,17	0,0882	0,04513	0,002
Kontrollen	16	8	0,10	0,24	0,1650	0,04840	
Chloroquin	22	13	0,01	0,05	0,0308	0,01553	<0,001
Amiodaron	22	10	0,03	0,18	0,1210	0,04977	0,024
Kontrollen	22	7	0,13	0,20	0,1714	0,02410	
Chloroquin	32	9	0,01	0,08	0,0378	0,02279	<0,001
Amiodaron	32	9	0,03	0,18	0,1133	0,05454	0,709
Kontrollen	32	6	0,09	0,18	0,1258	0,03185	
Chloroquin	37	8	0,01	0,08	0,0438	0,02722	0,001
Amiodaron	37	8	0,03	0,18	0,1400	0,04690	0,510
Kontrollen	37	6	0,09	0,19	0,1300	0,04050	
Chloroquin	65	7	0,02	0,09	0,0471	0,02690	0,208
Amiodaron	65	6	0,07	0,21	0,1217	0,05076	0,381
Kontrollen	65	3	0,04	0,13	0,0833	0,04509	

**Tab.6 Gipfelzeit des II.OP bei der Lichtintensität 3000 mcads/m<sup>2</sup>**

Gruppe	t	n	Min	Max	Mw	StDev	p
Chloroquin	0	25	29,72	44,69	33,9352	3,48230	0,242
Amiodaron	0	16	32,65	37,53	35,2694	1,80053	0,900
Kontrollen	0	9	26,14	39,48	34,2022	4,79837	
Chloroquin	4	22	38,83	63,56	49,3455	6,97453	0,662
Amiodaron	4	17	46,31	64,53	54,2171	6,04532	0,162
Kontrollen	4	7	41,76	54,77	49,4886	4,29823	
Chloroquin	8	18	42,41	63,56	52,7489	5,95464	0,965
Amiodaron	8	16	37,53	52,82	48,2438	4,44638	0,106
Kontrollen	8	7	45,01	57,58	51,6386	4,48734	
Chloroquin	12	12	48,59	65,84	56,1008	5,17854	0,188
Amiodaron	12	12	42,08	64,86	50,2167	6,51769	0,895
Kontrollen	12	8	40,46	67,14	51,3150	10,47133	
Chloroquin	16	14	44,69	72,99	58,5829	7,55415	0,002
Amiodaron	16	11	48,26	70,39	57,4327	7,21871	0,005
Kontrollen	16	8	40,13	59,65	47,2463	5,97221	
Chloroquin	22	12	46,31	67,14	58,4269	6,94120	<0,001

Amiodaron	22	9	42,08	61,61	48,4227	5,91611	0,236
Kontrollen	22	7	40,13	49,89	44,9171	3,31612	
Chloroquin	32	9	45,01	59,98	53,8322	5,17477	0,066
Amiodaron	32	9	43,38	61,61	53,9256	6,05634	0,071
Kontrollen	32	6	45,96	52,05	48,8050	2,50621	
Chloroquin	37	10	42,41	68,11	52,6910	8,18570	0,545
Amiodaron	37	8	41,43	55,75	46,2300	4,35822	0,360
Kontrollen	37	6	39,15	60,63	49,7800	7,78924	
Chloroquin	65	9	47,29	60,95	54,3022	3,94709	0,145
Amiodaron	65	6	36,23	58,35	48,2100	8,19135	1,000
Kontrollen	65	3	45,66	54,12	48,8067	4,62750	

**Tab. 7 Korrelation zwischen der Medikamentenart und den funduskopischen Veränderungen**

Kreuztabelle		funduskopischer Befund				
	Zahl der Tiere (n)	WFV 1	WFV 2	LE	Unauffällig	Gesamt
<b>Chloroquin- gruppe</b>	Anzahl	20	0	0	0	20
	Erwartete Anzahl	7,8	2,4	2,4	7,5	20,0
	Standartisierte Residuen	<b>4,3</b>	-1,5	-1,5	-2,7	
<b>Amiodaron- gruppe</b>	Anzahl	0	6	4	7	17
	Erwartete Anzahl	6,7	2,0	2,0	6,3	17,0
	Standartisierte Residuen	-2,6	<b>2,8</b>	1,4	,3	
<b>Kontroll- gruppe</b>	Anzahl	0	0	2	12	14
	Erwartete Anzahl	5,5	1,6	1,6	5,2	14,0
	Standartisierte Residuen	-2,3	-1,3	,3	<b>3,0</b>	
<b>Gesamt</b>	Anzahl	20	6	6	19	51
	Erwartete Anzahl	20,0	6,0	6,0	19,0	51,0

WFV 1 und 2 - weißfleckige Veränderungen Typ 1 und 2

LE – lokale Einlagerungen

**Tab. 8 Verhältnis zwischen standartisierten Residuen und Signifikanzniveau (A.Bühl, 1998)**

standartisiertes Residuum	Signifikanzniveau
$\geq 2,0$	$p < 0,05$ (*)
$\geq 2,6$	$p < 0,01$ (**)
$\geq 3,3$	$p < 0,001$ (***)

**Tab. 9 Korrelation zwischen der Medikamentenart und den histologischen Veränderungen**

Kreuztabelle		histologischer Befund			
	Zahl der Tiere (n)	LG	KG	Unauffällig	Gesamt
<b>Chloroquin- gruppe</b>	Anzahl	8	0	11	19
	Erwartete Anzahl	3,4	2,1	13,5	19,0
	Standartisierte Residuen	<b>2,5</b>	-1,5	-,7	
<b>Amiodaron- gruppe</b>	Anzahl	0	5	12	17
	Erwartete Anzahl	3,0	1,9	12,1	17,0
	Standartisierte Residuen	-1,7	<b>2,3</b>	,0	
<b>Kontroll- gruppe</b>	Anzahl	0	0	9	9
	Erwartete Anzahl	1,6	1,0	6,4	9,0
	Standartisierte Residuen	-1,3	-1,0	<b>1,0</b>	
<b>Gesamt</b>	Anzahl	8	5	32	45
	Erwartete Anzahl	8,0	5,0	32,0	45,0

LG - lamelläre Granula

KG - kristalloide Granula

**Tab. 10 Korrelation zwischen den Veränderungen der OP und dem funduskopischen Befund**

Kreuztabelle		funduskopischer Befund				
Oszillierende Potentiale	Zahl der Tiere (n)	WFV 1	WFV 2	LE	Unauffällig	Gesamt
unauffällig	Anzahl	1	1	3	10	15
	Erwartete Anzahl	6,0	1,7	1,3	6,0	15,0
	Standartisierte Residuen	-2,0	-,5	<b>1,4</b>	<b>1,6</b>	
verändert	Anzahl	17	4	1	8	30
	Erwartete Anzahl	12,0	3,3	2,7	12,0	30,0
	Standartisierte Residuen	<b>1,4</b>	<b>,4</b>	-1,0	-1,2	
Gesamt	Anzahl	18	5	4	18	45
	Erwartete Anzahl	18,0	5,0	4,0	18,0	45,0

WFV 1 und 2 - weißfleckige Veränderungen Typ 1 und 2

LE – lokale Einlagerungen

**Tab. 11 Korrelation zwischen den Veränderungen der OP und dem histologischen Befund**

Kreuztabelle		histologischer Befund			
Oszillierende Potentiale	Zahl der Tiere (n)	LG	KG	Unauffällig	Gesamt
unauffällig	Anzahl	0	1	8	9
	Erwartete Anzahl	2,3	1,5	5,2	9,0
	Standartisierte Residuen	-1,5	-,4	<b>1,2</b>	
verändert	Anzahl	8	4	10	22
	Erwartete Anzahl	5,7	3,5	12,8	22,0
	Standartisierte Residuen	<b>1,0</b>	<b>,2</b>	-,8	
Gesamt	Anzahl	8	5	18	31
	Erwartete Anzahl	8,0	5,0	18,0	31,0

LG - lamelläre Granula

KG - kristalloide Granula

**Tab. 12 Abhängigkeit der Lokalisation der histologischen Veränderungen von der Art der Einlagerungen**

Kreuztabelle		Netzhautschichten							Gesamt
Granula	Zahl der Tiere (n)	RPE	Photo-rez-n	ÄKS	ÄPS	IKS	IPS	GZS	
lamelläre (insgesamt bei n=8)	Anzahl	4	2	1	2	5	8	7	29
	Erwartete Anzahl	2,6	4,0	2,0	4,0	5,9	5,9	4,6	29,0
	Standartisierte Residuen	<b>,8</b>	-1,0	-,7	-1,0	-,4	<b>,8</b>	<b>1,1</b>	
kristalloide (insgesamt bei n=5)	Anzahl	0	4	2	4	4	1	0	15
	Erwartete Anzahl	1,4	2,0	1,0	2,0	3,1	3,1	2,4	15,0
	Standartisierte Residuen	-1,2	<b>1,4</b>	<b>1,0</b>	<b>1,4</b>	,5	-1,2	-1,5	
Gesamt	Anzahl	4	6	3	6	9	9	7	44
	Erwartete Anzahl	4,0	6,0	3,0	6,0	9,0	9,0	7,0	44,0

**Tab. 13 Korrelation zwischen den histologischen- und funduskopischen Veränderungen**

Kreuztabelle		funduskopischer Befund				
histologischer Befund	Zahl der Tiere (n)	WFV 1	WFV 2	LE	Unauffällig	Gesamt
unauffällig	Anzahl	6	2	2	11	21
	Erwartete Anzahl	8,6	3,7	1,9	6,8	21,0
	Standartisierte Residuen	-,9	-,9	,1	<b>1,6</b>	
lamelläre Granula	Anzahl	8	0	0	0	8
	Erwartete Anzahl	3,3	1,4	,7	2,6	8,0
	Standartisierte Residuen	<b>2,6</b>	-1,2	-,8	-1,6	
kristalloide Granula	Anzahl	0	4	1	0	5
	Erwartete Anzahl	2,1	,9	,4	1,6	5,0
	Standartisierte Residuen	-1,4	<b>3,3</b>	,8	-1,3	
Gesamt	Anzahl	14	6	3	11	34
	Erwartete Anzahl	14,0	6,0	3,0	11,0	34,0

WFV 1 und 2 - weißfleckige Veränderungen Typ 1 und 2

LE – lokale Einlagerungen

## Thesen

1. Chloroquin, ein Antimalariamittel und Antirheumatikum, und Amiodaron, ein sehr effektives Antiarrhythmikum, zählen zu den kationisch-amphiphilen Medikamenten. Diese können zu generalisierter Lipidose in verschiedenen Organen führen.
2. Die schwerwiegendste okuläre Nebenwirkung der Chloroquinbehandlung ist eine „bull-eye“ Retinopathie mit einer Inzidenz beim Menschen bis zu 13%. Bei der Chloroquin-Retinopathie zeigen sich in tierexperimentellen Studien histologisch eine lysosomale Speicherung in der Ganglienzellschicht und im retinalen Pigmentepithel sowie destruktive Schädigung der Photorezeptoren.
3. Der Zusammenhang zwischen der Amiodaronbehandlung und einer Retinopathie wird kontrovers diskutiert.
4. Im Rahmen des Projektes „Nebenwirkungen kationisch-amphiphiler Medikamente auf die Netzhaut der Maus“ wurden in einer vorausgegangenen 70-wöchigen Forschungsarbeit Funduskopie, Elektroretinographie bei verschiedenen Reizintensitäten und stichprobenartig licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der über 26 Wochen mit Chloroquin (n=25) und über 37 Wochen mit Amiodaron (n=20) behandelten Mäuse sowie der Kontrollmäuse (n=19) vom Stamm C57BL durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt.
5. Da die Amplituden und Gipfelzeiten der a- und b-Welle in der Amiodarongruppe sowie die Gipfelzeiten beider Hauptkomponenten des ERG in der Chloroquingruppe bei der Standardreizintensität von  $3000 \text{ mcds/m}^2$  unauffällig waren, bestand die Zielstellung dieser aktuellen Studie in der Untersuchung der Nebenkomponente des ERG (oszillierende Potentiale) bezüglich ihrer Amplituden, Gipfelzeiten und Frequenzen bei mehreren Reizintensitäten. Zusätzlich erfolgte systematisch die Beurteilung der funduskopischen Befunde und die elektronenmikroskopische Begutachtung nahezu aller Versuchstiere, denn bei stichprobenartiger histologischer Untersuchung waren einige Lipidosezeichen in beiden Versuchsgruppen nachweisbar.
6. Bei der Auswertung der oszillierenden Potentiale zum Versuchsbeginn stellte sich bei allen Tiergruppen heraus, dass die Amplituden der oszillierenden Potentiale ihr Optimum der Auswertbarkeit bei einer Reizintensität von  $100 \text{ mcds/m}^2$  zeigten, sowie auch die Gipfelzeit bei  $3000 \text{ mcds/m}^2$  und die Frequenz bei  $10 \text{ mcds/m}^2$ . Daher wurden die Parameter der oszillierenden Potentiale weiterhin bei der Standard- sowie bei den optimalen Reizintensitäten ausgewertet.

7. Bei den oben genannten Reizintensitäten zeigten die oszillierenden Potentiale des ERG in der Chloroquingruppe gegenüber den Kontrolltieren nach 12 bis 37 Wochen eine signifikante irreversible Verschlechterung.
8. Bereits nach 12-wöchiger Chloroquinbehandlung waren funduskopisch in der Mausretina generalisierte, weißfleckige, abgrenzbare Veränderungen sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch mittels Elektronenmikroskops lamelläre Einschlusskörperchen in den inneren Netzhautschichten und im retinalen Pigmentepithel gefunden. Die morphologischen Veränderungen blieben bis zum Ende des Versuches bestehen.
9. In der Amiodarongruppe konnten bei den optimalen Reizintensitäten signifikante Veränderungen der oszillierenden Potentiale des ERG gegenüber der Kontrollgruppe nach 16- und 22-wöchiger Medikamentengabe ermittelt werden. Nach dem Absetzen des Medikamentes normalisierten sich die oszillierenden Potentiale wieder.
10. Funduskopisch wurden bei einigen mit Amiodaron behandelten Tieren während der Behandlung generalisierte, weißfleckige, schlecht abgrenzbare, reversible Veränderungen der Netzhaut nach 8, 12 und 32 Behandlungswochen beobachtet. Diese hingen offensichtlich mit einer Pigmentblattstörung zusammen, denn auch histologisch wurde bereits zu diesem Zeitpunkt eine Reduzierung der Melanosomenmenge und -größe im retinalen Pigmentepithel nachgewiesen.
11. Nach 22 und 37 Behandlungswochen wurden bei einigen Tieren aus der Amiodarongruppe elektronenmikroskopisch, sich überwiegend in der Photorezeptorenschicht lokalisierte, granuläre Einschlusskörperchen nachgewiesen, die zum Ende des Experimentes (29 Wochen nach dem Absetzen) kaum bzw. nicht mehr zu finden waren.
12. Seit über 10 Jahren besteht die Meinung, dass Amiodaron einen freie Radikale induzierenden Effekt hat. Freie Radikale führen zu Zellschäden und zur damit verbundenen lysosomalen Überladung wie bei Lipofuszinose bzw. Lipidose. Es wird diskutiert, dass die in der vorliegenden Studie gefundenen histologischen retinalen Veränderungen bei den mit Amiodaron behandelten Mäusen eher Ausdruck eines Lipofuszinose-ähnlichen Prozesses mit reinen Lipidablagerungen und weniger Ausdruck der durch kationisch-amphiphilen Eigenschaft bedingten Speicherung der Medikament-Lipid-Komplexe sein müssten.

13. Die vorgestellten Ergebnisse erhärten bekannte Ansicht über die retinotoxische Wirkung des Chloroquins und weisen auf die des Amiodarons hin. Die durch Amiodaronbehandlung verursachten Lipidose-Veränderungen treten später und in geringerer Ausprägung auf, sind reversibel und basieren vermutlich auf einem anderen Pathomechanismus als die durch Chloroquingabe.
14. Die oszillierenden Potentiale haben in unserer Studie eine bessere Sensitivität zur frühzeitigen Erfassung retinaler Medikamentennebenwirkung gezeigt als die a- und b-Wellen in der vorausgegangenen Arbeit.
15. Da bei Menschen ausschließlich Gipfelzeit und Amplitude des II. oszillierenden Potentials ausgewertet werden, ist es empfehlenswert, zur Optimierung der funktionellen Diagnostik mit dem ERG, zusätzlich die Frequenz der Potentiale zu messen. Um die Netzhautveränderungen frühzeitig feststellen zu können, sollte auch die optimale Reizintensität für alle drei Parameter der oszillierenden Potentiale herausgefunden werden.
16. Obwohl die Ergebnisse von Tierexperimenten auf den Menschen nicht direkt übertragbar sind, ermöglichen sie eine Risikoabwägung zwischen den Nebenwirkungen des Medikamentes einerseits und der gewünschten Wirkung des Medikamentes andererseits.
17. So wie es bei der Chloroquingabe üblich ist, ist es erforderlich, auch die mit Amiodaron behandelten Patienten ophthalmologisch regelmäßig und engmaschig mit den Schwerpunkten nicht nur auf die Hornhaut und den Sehnerv, sondern auch auf die Retina zu untersuchen.

## LEBENS LAUF

<b>Persönliche Daten</b>	
<b>Name</b>	Turdumambetova Gulay
<b>Geburtsdatum</b>	10.06.1975
<b>Geburtsort</b>	Bischkek, Kirgisistan
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Staatsangehörigkeit</b>	Kirgisistan
<b>Familie</b>	Vater: Dipl.-Med. Turdumambetov Aaly, FA für Chirurgie Mutter: Dipl.-Ing. Schygaewa Aina Schwester: Turdumambetova Gulnara, FÄ für Innere Medizin Bruder: Turdumambetov Timur, Student
<b>Schulbildung</b>	
<b>1982-1987</b>	Mittelschule Nr 74 bei der Süd-Truppen-Gruppe, Hajmasker, Ungarn
<b>1987-1992</b>	Mittelschule beim Truppenteil 91111, Nachitschevan, Aserbeidschan
<b>Hochschulbildung</b>	
<b>1992-1998</b>	Kirgisische staatliche Medizinakademie, Behandlungsfakultät, Fachrichtung „Heilkunde“
<b>06/1998</b>	Staatsexamen für „Heilkunde“

<b>Postdiplomausbildung</b>	
<b>Ordinatur</b>	Hospital „Augenmikrochirurgie“, Fachgebiet „Augenheilkunde“, 1998 – 2000, Bischkek, Kirgisistan
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	
<i>In Kirgisistan</i>	
10/2000-10/2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Augenheilkunde, Hospital „Augenmikrochirurgie“, Bischkek
<i>An der Universitätsklinik und Poliklinik für Augenheilkunde der MLU Halle-Wittenberg</i>	
10/2002-09/2003	DAAD-Stipendiatin Forschung über die visuelle Rehabilitation von Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration Hospitation
10/2003-11/2008	Doktorandin Thema: Vergleichende funktionelle und morphologische Beurteilung der Nebenwirkung von Chloroquin und Amiodaron auf die Mausretina nach chronischer Gabe per os
01/2005-07/2007	ärztliche Mitarbeiterin Projekt „Evaluation und Unterstützung der Gewebespende“
seit 12/2006	Ärztin in Weiterbildung Fachrichtung „Augenheilkunde“

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit

„Vergleichende funktionelle und morphologische Beurteilung der Nebenwirkung von Chloroquin und Amiodaron auf die Netzhaut der Maus nach chronischer Gabe per os“

als einen weiteren Schritt nach der Promotionsarbeit von E. Simon „Morphologische und funktionelle Veränderungen der Retina von Mäusen nach chronischer Gabe von Amiodaron“ (2004) im Rahmen des Projektes und der Arbeitsgruppe „Nebenwirkungen kationisch-amphiphiler Medikamente auf die Netzhaut der Maus“ selbstständig angefertigt habe. Bei den Untersuchungen in der vorliegenden Studie konnte ich auf folgende in der Arbeitsgruppe, aber nicht von mir persönlich erarbeiteten Materialien zurückgreifen:

- 1) Für die Bearbeitung und funduskopische Beurteilung der Netzhaut der Versuchstiere wurden Videoaufnahmen als Rohmaterial verwendet. Die Aufnahmen waren von Frau Dr. Clauß durchgeführt worden.
- 2) Für die histologische elektronenmikroskopische Beurteilung wurden angefertigte Gewebeproben der Netzhaut von Chloroquin- und Amiodaron-behandelten Mäusen verwendet (Anfertigung durch Frau Dr. Simon, Frau Harm, Frau Buchholz). Außerdem habe ich nach freundlicher Erlaubnis von Frau P.Harm auf Bilder elektronenmikroskopischer Netzhautbefunde von jeweils 2 Tieren aus der Chloroquin- und Amiodarongruppe zurückgegriffen, denn bei diesen Tieren fehlten die Gewebeproben.
- 3) Für die Auswertung der oszillierenden Potentiale wurde auf den Datenbestand vorausgegangener ERG-Untersuchungen zurückgegriffen, die von Frau Dr. Clauß abgeleitet worden waren.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Des Weiteren erkläre ich, dass dies mein erster Promotionsversuch ist.

Halle, den 13.01.2008

## **Hinweis auf Publikationen von Ergebnissen der Arbeit**

1. G Turdumambetova, GIW Duncker, T Bredehorn. Nebenwirkung von Amiodaron und Chloroquin auf die Retina der Maus. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2006; 223
2. Turdumambetova G., Bredehorn T., Claus J., Simon E., Duncker G.I.W. Amiodaron: Retinotoxizität bei Mäusen. Poster 72, 105. DOG-Kongress, 2007

## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas und die vielseitige Unterstützung bei dieser Arbeit sowie für die konstruktiven Gespräche und Ratschläge danke ich Herrn Prof. Dr. med. G. I. W. Duncker. Herr Professor, Ihnen habe ich für die Offenheit, Freundlichkeit und Mühe in vielerlei Hinsicht zu danken, so dass ich als ausländische Doktorandin promovieren konnte. Ihre Betreuung tat mir sehr gut und führte mich in wissenschaftlichen Bereichen weiter.

Herrn Dr. med. T. Bredehorn möchte ich für die Ermutigung und die Inspiration danken. Herr Bredehorn, ich danke Ihnen für Ihren Glauben an mich, für den Rat, die Kritik und Lenkung bei der Bearbeitung der Ergebnisse und für die moralische Unterstützung.

Herrn Professor Dr. med. H.-J. Holzhausen im Institut für Pathologie an der MLU Halle-Wittenberg möchte ich für seine Hilfe und Expertise bei der Licht- und Elektronenmikroskopie sowie für die überaus kompetenten Hinweise bei der Befundung der histologischen Präparate danken. Sie standen für mich auch jederzeit zur Verfügung, Herr Professor, ich danke Ihnen dafür.

Den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe Frau Dr. Clauß, Frau Buchholz, Frau Dr. Simon, Frau Harm und Herrn Schöne möchte ich für die Vorarbeit (Tierbehandlung und Haltung, ERG-Messung, Funduskopie, Aufbereitung der Augengewebe für die Histologie) danken, auf die ich während meiner Arbeit zurückgreifen konnte. Frau Dr. Clauß und Herrn Schöne haben mir die nötigen Protokolle zur Verfügung gestellt bzw. die Auswertung der ERG-Kurven durch das Programm „LabView“ beigebracht.

Danke Frau Voigtländer und Frau Fischer für die sehr angenehme Mitarbeit im Elektronenmikroskopielabor, für das Erlernen der Bearbeitungsmethoden der Gewebeproben und Histomaterialien und für die Herstellung der Ultradünnschnitte.

Den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie möchte ich auch für die Bilder der histologischen Präparate danken.

Herr Haugk, haben Sie meinen vielen Dank für die zeitraubende Bearbeitung der Fundus- und histologischen Bilder ins digitale Format sowie deren qualitative Verbesserung.

Herrn Lehnich danke ich für die ausführlichen Antworten an meine Fragen über die Auswertung der ERG-Kurven.

Für die Beratung bezüglich der statistischen Datenanalyse danke ich sehr Herrn Prof. Dr. Johannes Haerting (Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik) und Herrn Dr.med. S.Sel aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Augenheilkunde.

Für die sprachliche und inhaltliche Korrektur meiner Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Professor G.I.W. Duncker, Frau Professor J. Herde, Frau Dr. med. habil. C. Grünauer-Kloevekorn, Herrn Dr. T. Bredehorn, Frau Lenz, Frau Vetter und bei vielen meiner Freunde.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch für die freundliche Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre bei allen nicht namentlich erwähnten Kollegen der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bedanken.

Nicht zu vergessen sind meine Familie und Freunde. Sie schenken mir ihre herzliche Ermutigung, ihre Beständigkeit und vor allem ihre Liebe, die mich stets mit Dankbarkeit erfüllt.