

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Augenheilkunde
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Kommissarische Direktorin: Dr. med. U. Stuhlträger)**

**Veränderungen am Hornhautendothel nach Injektion von antiangiogenen Substanzen in die
Vorderkammer
— rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Schweineaugen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anke Wilhelm

geboren am 05.11.1983 in Greifswald

Betreuer: PD Dr. med. habil. Th. Hammer

Gutachter: PD Dr. med. habil. Th. Hammer

Prof. Dr. med. J.M. Rohrbach

PD Dr. med. A. Viestenz

Eröffnungsdatum: 01.07.14

Verteidigungsdatum: 24.04.15

Für meine Familie

Referat und bibliographische Beschreibung

Fragestellung:

Die Behandlung von Gefäßneubildungen beim Neovaskularisationsglaukom kann schwierig sein. Daher stellen die Injektionen von antiangiogenen Substanzen wie Ranibizumab (Lucentis®) und Bevacizumab (Avastin®) in die Vorderkammer eine sinnvolle Alternative zur Senkung des intraokularen Drucks dar. Jedoch stehen die antiangiogenen Substanzen nach der Eingabe in direktem Kontakt zu dem empfindlichen Endothel der Hornhaut. Die Darstellung des Einflusses von Ranibizumab und Bevacizumab auf diese Zellschicht bei intrakameraler Injektion war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Methoden:

Es wurden Ranibizumab (Lucentis®), Bevacizumab (Avastin®) und als Vergleichsserie Triamcinolon in die Vorderkammer von Schweineaugen gegeben. Anschließend wurden die Hornhäute präpariert, fixiert und rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Bewertung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder erfolgte nach einem festgelegten Score. Es wurden die Kriterien Mikrovilli, Zellgrenzen, Zelloberfläche und Zellmuster beurteilt. Diese wurden mit den Befunden unbehandelter Corneae und nach Gabe von Balanced Salt Solution verglichen.

Ergebnisse:

Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und der statistischen Auswertung konnten bei den antiangiogenen Substanzen nur geringe Veränderungen am Hornhautendothel festgestellt werden und es wurden meist ähnlich hohe Punktzahlen wie bei der Nullserie und den mit Balanced Salt Solution konfrontierten Hornhäuten vergeben. Im Vergleich dazu zeigten sich signifikante Unterschiede bei den mit Triamcinolon belasteten Hornhautproben. Hier traten meist irreversible Zellschäden auf, welche in dieser Ausprägung bei keiner anderen Medikamentengruppe gefunden wurden.

Zusammenfassung:

Lucentis® und Avastin® haben beim Einsatz in der Vorderkammer keine schädigende Wirkung auf das Hornhautendothel und können zur Behandlung des rubeotischen Sekundärglaukoms intrakameral injiziert werden. Triamcinolon hingegen ruft bei direktem Kontakt schwere Schäden an den Endothelzellen der Hornhaut hervor.

Wilhelm, Anke: Veränderungen am Hornhautendothel nach Injektion von antiangiogenen Substanzen in die Vorderkammer – rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Schweineaugen. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2013

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ANCHOR	Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration
ANOVA	Analysis of Variance
Anti-VEGF	Anti-Vascular Endothelial Growth Factor
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
BSS	Balanced Salt Solution
CNV	Choroidale Neovaskularisation
FAG	Fluoreszenzangiographie
MLI	Membrana limitans interna
MARINA	Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration
ME-Medien	Minimum essential Medium
MMPs	Metalloproteinasen
NVG	Neovaskularisationsglaukom
PDR	Proliferative Diabetische Retinopathie
PDT	Photodynamische Therapie
POHS	Presumed-Ocular-Histoplasmosis-Syndrom
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
RPE	Retinales Pigmentepithel
Tab.	Tabelle
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1	Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor-1
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor-2
VISION	VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Pathologische Gefäßneubildungen der Iris und Neovaskularisationsglaukom	1
1.1.1	Retinale Neovaskularisationen	1
1.1.2	Rubeosis iridis und Neovaskularisationsglaukom	3
1.2	Anatomie und Physiologie der Hornhaut unter besonderer Berücksichtigung des Hornhautendothels	4
1.3	Antiangiogene Substanzen in der Augenheilkunde	7
1.3.1	Die verschiedenen antiangiogenen Substanzen	7
1.3.2	Einsatz antiangiogener Substanzen bei AMD	13
1.3.3	Anwendung bei Erkrankungen des Augenvorderabschnitts	16
1.3.4	Einsatz beim Neovaskularisationsglaukom	17
1.4	Problemstellung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Untersuchungsmodell Schweineauge	20
2.2	Versuchsregime	20
2.3	Versuchsdurchführung	21
2.3.1	Injektion in die Vorderkammer	21
2.3.2	Präparation der Hornhäute	22
2.3.3	Fixierung der Hornhäute	23
2.4	Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop	24
2.5	Beurteilung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen	25
2.6	Statistische Methoden	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Darstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen	31
3.1.1	Befunde der unbeeinflussten Hornhäute	31
3.1.2	Befunde nach Injektion von Balanced Salt Solution in die Vorderkammer	32
3.1.3	Befunde nach Injektion von Triamcinolon in die Vorderkammer	32
3.1.4	Befunde nach Injektion von antiangiogenen Substanzen in die Vorderkammer	33
3.1.5	Atypische Befunde der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen	35
3.2	Vergleich der einzelnen Kriterien	36
3.2.1	Mikrovilli	36
3.2.2	Zellgrenzen	37
3.2.3	Zelloberfläche	38
3.2.4	Zellmuster	39
3.3	Statistische Vergleiche der Resultate für die einzelnen Kriterien	40
3.3.1	Mikrovilli	40
3.3.2	Zellgrenzen	41
3.3.3	Zelloberfläche	42
3.3.4	Zellmuster	43
3.3.5	Synopsis der Einzelkriterien	44
3.3.6	Einwirkdauer der Medikamente	45

4	Diskussion	46
4.1	Methodenkritische Bewertung	46
4.1.1	Eignung des Schweineauges als Versuchsmodell	46
4.1.2	Bewertung des Versuchsaufbaus	47
4.2	Interpretation der rasterelektronenmikroskopischen Befunde	48
4.3	Wertung der Ergebnisse	50
4.4	Kritische Einschätzung der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Verfahren	52
4.4.1	Kritische Einschätzung der Ergebnisse	52
4.4.2	Vergleich mit anderen Verfahren	53
4.5	Einsatz der intrakameralen Injektion von antiangiogenen Substanzen	55
4.6	Schlussfolgerungen und Ausblicke	56
5	Zusammenfassung	57
	Literaturverzeichnis	59
	Anlagen	68
	Thesen	70
	Eidesstattliche Erklärung	72
	Lebenslauf	73
	Zusammenstellung eigener Vorträge und Veröffentlichungen zur Thematik	Fehler! Textmarke n
	Danksagung	74

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Pathologische Gefäßneubildungen der Iris und Neovaskularisationsglaukom

1.1.1 Retinale Neovaskularisationen

Die Entwicklung von pathologischen Gefäßen an der Retina kann verschiedene Ursachen haben. Am häufigsten werden Neovaskularisationen durch Ischämie und Hypoxie der inneren Netzhautschichten hervorgerufen, welche bei Krankheiten wie diabetischer Retinopathie, Venenverschlüssen, altersbedingter Makuladegeneration, Frühgeborenen-Retinopathie oder Sichelzellanämie auftreten [82]. Seltener können sie auch Folge von Entzündungen des hinteren Augensegments sein, wobei hier ihre Bildung über Entzündungsmediatoren oder krankhafte Veränderungen des Gefäßnetzes ausgelöst wird [39]. Derartige entzündliche Prozesse spielen beispielsweise bei Sarkoidose, Morbus Behcet, Morbus Eales, Malaria, Retinitis pigmentosa oder Toxoplasmose eine Rolle [82].

Die aufgeführten Erkrankungen haben die Induktion der pathologischen Angiogenese zur Folge, bei der nicht völlig neue Gefäße aus Vorläuferzellen gebildet werden, sondern aus bestehenden Gefäßen neue Äste aussprossen, welche den endothelialen Stoffwechsel verändern [41]. Die Angiogenese ist ein Prozess, bei dem die Bildung neuer Blutgefäße durch die Verzweigung und Verlängerung vorhandener Gefäße auch physiologisch große Bedeutung hat. Bis zur Geburt erfolgt die Vaskularisierung der Netzhaut zum Teil auch als Angiogenese. Auch nach der Geburt tritt bei der Wundheilung und bei hypoxischen Schäden die Angiogenese auf. Jedoch kann diese Form der Gefäßneubildung auch durch die oben genannten Erkrankungen induziert sein und zu einer pathologischen Neovaskularisation führen. Hier ist das Gleichgewicht der regulierenden Stimuli und Inhibitoren für die Angiogenese gestört, wobei ein Überschuss der anregenden Faktoren vorliegt. Der am besten untersuchte Reiz für okuläre Neovaskularisationen ist der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF). Er gilt als Botenstoff für die Entstehung von retinalen und iridalen Neovaskularisationen [1, 8] und ist ein wichtiger Bestandteil für die Steuerung der Vaskulogenese und Angiogenese [41]. Vor allem durch Hypoxie, aber auch durch andere Noxen wie ultraviolette Strahlung, Wasserstoffperoxid oder sogenannte Ras-Onkogene, wird seine Expression gesteigert [41]. Daher ist der Gehalt an VEGF im Glaskörper bei proliferativen Netzhauterkrankungen signifikant erhöht [5]. Beim gesunden Auge ist dieser Faktor in

physiologischer Konzentration im retinalen Kapillarnetz und in den Neuronen der inneren Netzhaut zu finden [60]. Seine Synthese erfolgt überwiegend durch die Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) mit anschließender basaler Sekretion in Richtung der Choriokapillaris, welche zwei bis sieben mal stärker als die apikale Sekretion ausgeprägt ist [2, 17]. Die RPE-Zellen versorgen sowohl parakrin die Choriokapillaris und die neurosensorische Netzhaut mit VEGF als auch autokrin die eigenen Zellen [42]. Der endotheliale Wachstumsfaktor umfasst sechs Homologe: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und VEGF-F, wobei VEGF-A am besten untersucht ist [3] und im Gegensatz zu den anderen Vertretern hauptsächlich durch Ischämie stimuliert wird [37]. Der VEGF-A hat vier Haupt-Isoformen, welche durch alternatives Spleißen der m-RNA des Faktors entstehen und sich durch die Anzahl an Aminosäuren und ihre Löslichkeit unterscheiden (VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉, VEGF-A₂₀₆) [41, 51]. Diese Isoformen haben eine hohe Affinität zu den membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 auf der Endothelzelloberfläche. Der VEGF-Rezeptor-1 hat das stärkste Bindungspotential. Jedoch wird durch die Bindung mit ihm nicht die biologische Aktivität von VEGF-A induziert, sondern der Wachstumsfaktor in seiner Wirkung gehemmt und inaktiviert. Nur durch die Bindung mit dem VEGFR-2, welcher das zweitstärkste Bindungspotential hat, werden die mitogenen, angiogenen und permeabilitätssteigernden Effekte des VEGF-A vermittelt [41].

Durch oxidativen Stress wird in den RPE-Zellen die Expression von VEGF-A und anderen angiogenen Faktoren gesteigert. VEGF-A bindet dann an den VEGFR-2 und induziert dadurch eine Dimerisierung zu zwei Rezeptormolekülen [3], welche sich durch gegenseitige Phosphorylierung (Tyrosinkinase) aktivieren. Durch die Bindung an den Rezeptor exprimiert aktives Endothel verschiedene Zytokine, welche weitere Signalwege stimulieren [58]. Zum einen wird durch sezernierte Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) der Abbau der Basalmembran induziert. Dadurch kommt es zu einer Dilatation und Destabilisierung der Membran, wodurch sich die Permeabilität der Gefäße erhöht und den Endothelzellen die Migration in die extrazelluläre Matrix ermöglicht wird [41]. Zum anderen wird durch die Bindung an den VEGFR-2 die endotheliale Zellproliferation stimuliert und die „tight junctions“, welche die Verbindungen zwischen den Endothelzellen darstellen, werden verändert [5]. Infolge der Gefäßerweiterung und der Erhöhung der Gefäßpermeabilität können die Endothelzellen in das umliegende Gewebe einwandern und dort vaskuläre Knospen ausbilden. Aus den erweiterten Knospen bilden sich Tuben, welche das spätere Kapillarlumen darstellen.

Als Abschluss der Neovaskularisation lagern sich an der Außenseite der Gefäße Perizyten an, die das Gefäßnetz stabilisieren [58].

Die neu gebildeten Gefäße unterscheiden sich von den Normalen erheblich [82]. Sie proliferieren entlang vorbestehender Strukturen, wie dem Glaskörper oder der Irisvorderfläche und haben einen anderen Wandaufbau. Durch die verdünnten Wände und die fenestrierten Endothelien in der Frühphase besteht eine höhere Permeabilität für Serumbestandteile und Fluorescein sowie eine erhöhte Blutungsneigung. Diese Gefäße werden durch Bindegewebe begleitet, welches Traktionen auf das umliegende Gewebe ausüben kann.

1.1.2 Rubeosis iridis und Neovaskularisationsglaukom

Über die neu entstandenen Gefäße auf der Retina kann infolge ihrer erhöhten Permeabilität der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF-A durch den Glaskörperraum in die Vorderkammer gelangen und dort die Bildung einer Rubeosis iridis induzieren (siehe Abb. 3). Die sich auf der Irisoberfläche ausbreitenden Gefäße unterscheiden sich von einer Irishyperämie durch starke Verzweigungen und die gestörte Blut-Kammerwasser-Schranke [70]. Zu den häufigsten Ursachen für die Entstehung einer Rubeosis zählen vaskuläre ischämische Zustände bei der proliferativen diabetischen Retinopathie und beim retinalen Venenverschluss. Aber auch Ischämien durch Netzhautablösung, neoplastische Prozesse (Aderhautmelanome, Metastasen) nach Strahlentherapie, Entzündungen, wie Uveitis oder Fuchs'sche Heterochromiezyklitis und die Bulbusischämie durch eine Carotisstenose können eine VEGF-vermittelte Neovaskularisation der Iris auslösen [70]. Die Proliferationen entspringen meist am Pupillarsaum und breiten sich dann in Richtung des Kammerwinkels aus. Neovaskularisationen können auch direkt im Kammerwinkel oder, in selteneren Fällen, auf dem Irisstroma ihren Ursprung haben. Die Irisrückfläche ist kaum beteiligt. Anhand der Lokalisation der Rubeosis kann die Ausdehnung der Gefäßneubildung beurteilt werden [119].

Die Rubeosis iridis ist im fortgeschrittenen Stadium einer angioproliferativen Retinopathie meist mit der Ausbildung eines vaskulären Sekundärglaukoms verbunden. Durch VEGF-A aus den retinalen Neovaskularisationen werden die Endothelzellen der Irisgefäße zur Zellteilung angeregt. Die perivaskulären Zellen bilden Bindegewebe auf der Irisvorderfläche aus und überdecken mit ihrem zirkulären Wachstum die Pupille und das Trabeculum corneosclerale [3, 81]. Durch die in den fibrovaskulären Membranen enthaltenen Myofibroblasten können sich

die Gefäße kontrahieren und führen dadurch zur Schrumpfung des umliegenden Gewebes. Es wird Zug auf den Pupillarsaum ausgeübt, wodurch das Pigmentepithel der Iris auf die Vorderfläche umgeschlagen wird und ein Ektropium uveae entsteht [70]. Ebenfalls durch die Gewebsschrumpfung bedingt, kommt es zum Verschluss des Kammerwinkels. Durch das Verwachsen der Iriswurzel mit dem Trabekelwerk zieht sich der Kammerwinkel reiverschlussartig zu und es bildet sich ein spitzwinkliger Pseudokammerwinkel [81]. Infolge der Verlagerung des Kammerwinkels ist der Abflusswiderstand in der Vorderkammer erhöht und das Kammerwasser kann nur noch unzureichend abfließen. Hinzu kommt, dass bei fehlender Blut-Kammerwasser-Schranke der Neovaskularisationen Plasmaproteine aus den neuen Gefäßen austreten, in die Vorderkammer gelangen und an der Spaltlampe als positives Tyndall-Phänomen (Pseudouveitis) nachweisbar sind. Weiterhin treten aus den insuffizienten Gefäßen häufig Blutungen auf. Der Kammerwinkel wird mit Erythrozyten verstopft. Diese beiden Faktoren führen zusätzlich zu einem weiteren Anstieg des intraokularen Druckes. Wenn die Druckwerte 50 mmHg berschreiten, wird zusätzlich die Hornhaut in Mitleidenschaft gezogen. Im Hornhautstroma und in den basalen Zellschichten des Epithels kommt es zu demem, aus denen sich epitheliale Zysten bis hin zu einer bullösen Keratopathie ausbilden können [3]. Dies führt zusammen mit der Linsentrübung zu einer erhöhten Blendungsempfindlichkeit bei reduziertem Sehvermögen. Da die Rubeosis iridis mit intraokularem Druckanstieg durch die Optikusschdigung zur Erblindung führen kann, müssen Neovaskularisationen im vorderen Augenabschnitt frühzeitig therapiert werden.

1.2 Anatomie und Physiologie der Hornhaut unter besonderer Berücksichtigung des Hornhautendothels

Die Hornhaut ist Bestandteil des dioptrischen Apparates des Auges und hat durch ihre uhrglasartige Form die Funktion einer Sammellinse. Mit einer Gesamtbrechkraft von ca. 43 Dioptrien macht sie den größten Anteil des brechenden Systems aus. Weiterhin bietet sie dem vorderen Augenabschnitt mechanischen Schutz. Makroskopisch hat die Kornea die Form eines quer gestellten Ovals mit einem horizontalen Durchmesser von ungefähr 11,5 mm und einer vertikalen Ausdehnung von etwa 10,5 mm [110]. Die Dicke der Hornhaut beträgt peripher ca. 1 mm und nimmt zum Zentrum hin auf 0,5 mm ab. Am Übergang zur Sklera befindet sich zirkulär der Limbus corneae. Diese Region ist grau gefärbt und verbindet die kornealen Strukturen mit der Lederhaut und dem darunter liegendem Trabekelwerk. Da die Kornea

gefäßfrei ist, erfolgt die Nutrition mit Aminosäuren und Glukose zum Teil über einen Stoff- und Ionenaustausch mit dem Tränenfilm und in den peripheren Bereichen über die Diffusion aus dem Randschlingennetz. Größtenteils gelangen die Nährstoffe jedoch über das Kammerwasser in das Hornhautendothel und ermöglichen somit die Versorgung. Die transparente Hornhaut ist aus fünf Schichten aufgebaut (vgl. Abb. 1) [103].

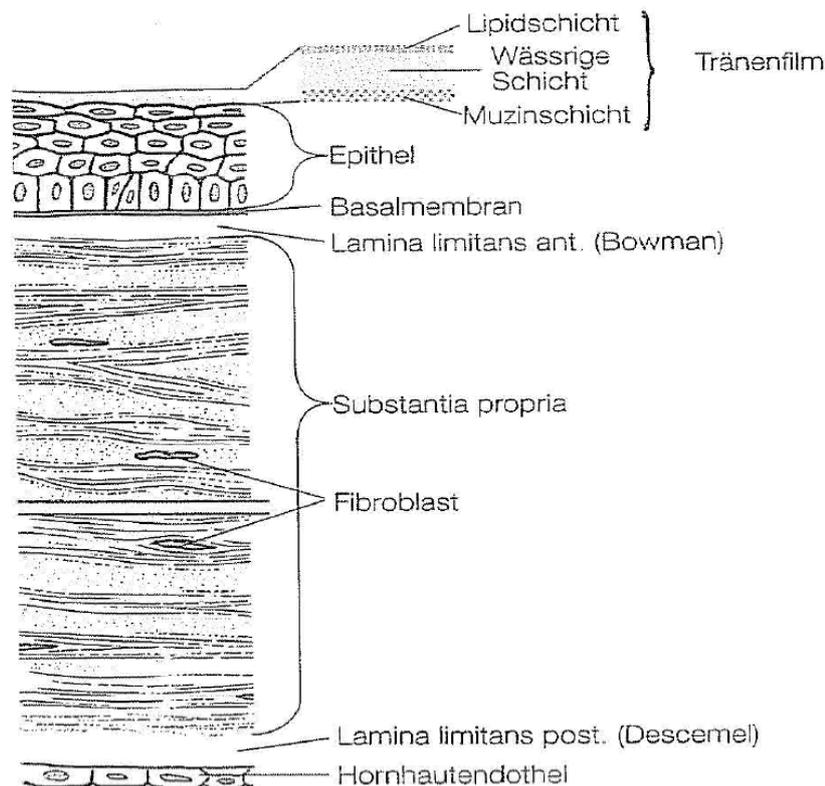


Abb. 1: Histologischer Aufbau der Hornhaut aus Schiebler et al. [103]

Die äußere vordere Begrenzung des Auges stellt das Hornhautepithel dar. Es handelt sich hierbei um ein 40 µm starkes mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel, welches sich am Anulus conjunctivae in das Epithel der Konjunktiva fortsetzt. Es wird im zweiten Embryonalmonat zusammen mit der Sklera aus dem Ektoderm gebildet [105]. Die weiteren Zellschichten entwickeln sich aus dem Mesoderm der Umgebung des Augenbeckers. Zwischen dem Hornhautepithel und der darunter liegenden Bowman'schen Lamelle liegt die Basalmembran, welche beide Zellschichten miteinander verbindet. Die 4-8 µm dicke Bowman-Lamelle (Lamina limitans anterior) bildet die vordere Grenzschicht und leitet sich von der darunter liegenden Substantia propria ab. Diese Zelllage unterscheidet die menschliche Kornea von den Hornhäuten anderer Säugetiere. Im Gegensatz zu anderen Schichten der

menschlichen Hornhaut, fehlt die Bowman-Lamelle bei Kaninchen, Hunden, Katzen und Schweinen [48] und ist lichtmikroskopisch nicht darstellbar [92]. Die daran angrenzende Schicht ist das Hornhautstroma (Substantia propria) mit einer Stärke von 450 μm . Sie besteht aus regelmäßig angeordneten parallel verlaufenden Kollagenfaserlamellen, welche in ihren Spalträumen Fibrozyten enthalten. Der Wassergehalt innerhalb des Stromas beträgt durch die pumpende Wirkung des Hornhautendothels kontinuierlich 78 % und gewährleistet somit die Transparenz der Kornea. Daran schließt sich die 5-10 μm starke Descemet-Membran (Lamina limitans posterior) an. Diese enthält zarte Kollagenfibrillen und wird bei Verlust von den Endothelzellen neu gebildet. Die Hinterwand der Kornea, das 4-6 μm dicke Hornhautendothel, stellt die vordere Begrenzung der Vorderkammer dar. Das einschichtige Plattenepithel, welches sich vermutlich vom Neuroektoderm ableitet [84], ist die stoffwechselaktivste, aber durch ihre geringe Regenerationsfähigkeit auch die empfindlichste Schicht der Hornhaut [126]. Es besteht aus flachen hexagonalen Zellen. Beim Neugeborenen zählt man 5000-6000 Endothelzellen/ mm^2 und beim Erwachsenen 1400-2500 Endothelzellen/ mm^2 [85]. Mit zunehmenden Alter nimmt die Zellzahl kontinuierlich ab und es treten vermehrt Polymorphien (Varianten in der Zellform) und Anisozytosen (unterschiedliche Zellgrößen) auf [106]. Das Endothel der Hornhaut hat mehrere Funktionen. Zum einen wird durch seine Ionenpumpe (Na^+K^+ -ATPase) das Wasser aktiv und konstant aus der Hornhaut in die Vorderkammer gepumpt, wodurch der Wassereinstrom in das Stroma kompensiert wird und die Transparenz der Kornea erhalten bleibt. Zum anderen bildet das Endothel eine Barriere und reguliert den Einstrom von Flüssigkeit und gelösten Stoffen ins Kammerwasser. Weiterhin ernährt es durch den Stoff- und Ionenaustausch die einzelnen Hornhautschichten. Eine ausreichende Endothelzelldichte ist für diese Funktionen notwendig. Nicht nur durch Alterungsprozesse, sondern auch infolge von Erkrankungen und Traumen können sich die Zellzahlen verringern. Bei Zellverlusten durch Verletzungen kommt es vermutlich durch den proliferationsstimulierenden Effekt der Prostaglandine auf das Hornhautendothel [94] zu einer Initiierung von Mitosen [128]. Aufgrund der geringen Regenerationsfähigkeit werden die Defekte nicht durch Teilung, sondern Zellvergrößerung ausgeglichen [25, 30]. Dies führt wie im fortschreitenden Lebensalter zu einer Zunahme von Polymorphien und Anisozytose [93]. Wird die Zellzahl von 300-400 Endothelzellen/ mm^2 unterschritten, bricht die Pump- und Barrierefunktion des Endothels zusammen. Die Folge ist eine Hornhautschwellung und -trübung [76, 85].

1.3 Antiangiogene Substanzen in der Augenheilkunde

1.3.1 Die verschiedenen antiangiogenen Substanzen

Ranibizumab (Lucentis®)

Ranibizumab ist ein humanisiertes monoklonales Antikörperfragment, welches alle aktiven Isoformen von VEGF-A bindet und dadurch ihre Wirkung inhibiert. Es wurde aus einem monoklonalen Antikörper der Maus entwickelt, aus dem der Genabschnitt, welcher das VEGF-A-bindende Molekül codiert, entfernt wurde. Diese Sequenz wurde anschließend in einen Bakterien-Vektor (*E. coli*) eingesetzt, um das Fc-Fragment des Mausantikörpers aus dem Wirkstoff zu entfernen [114] und somit komplementvermittelte oder zellabhängige Immunreaktionen zu reduzieren. Hinzu kommt, dass Ranibizumab als Fragment eine geringere Größe bei kleinerem Molekulargewicht (48 kDa) hat [77, 111] und seine Wirkung dadurch 5- bis 20fach größer ist als die des Antikörpers in voller Länge. Das Fab-Fragment, welches die Bindungsdomäne für den Wachstumsfaktor darstellt, wurde zusätzlich modifiziert, um die Bindungsaffinität für VEGF-A zu erhöhen [114]. Die systemischen Belastungen sind bedeutend geringer, da das Antikörperfragment 100 mal schneller aus dem Körper entfernt wird als sein Vorläufer. Es wird durch seine reduzierte Halbwertszeit (3 Tage im Glaskörper bei Affen [34]) schneller systemisch eliminiert [31]. Weiterhin ist die Konzentration von Ranibizumab im Serum generell niedrig und liegt auch bei maximalen Serumspiegeln weit unter der Konzentration, welche eine Hemmung des Wachstumsfaktors zu 50 % bewirkt [97]. Daher ist davon auszugehen, dass der VEGF-A außerhalb des Auges nur geringfügig durch Ranibizumab gehemmt wird.

Die antiangiogene Substanz Lucentis® ist für die Injektion in den Glaskörper zur Behandlung der feuchten (neovaskulären) Form der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), des diabetischen diffusen Makulaödems und des Makulaödems bei Venenverschlüssen zugelassen. Durch die Bindung mit dem Fab-Fragment werden die VEGF-Rezeptoren auf der Oberfläche der Endothelzellen inaktiviert und dadurch die angiogene Kaskade blockiert. Die Endothelzellen werden nicht zu weiteren Proliferationen angeregt und es bilden sich somit keine neuen pathologischen Gefäße. Durch die Hemmung der Neovaskularisationsbildung kann die Progression der zuvor erwähnten Erkrankungen verhindert werden.

Obwohl Lucentis® auch in höheren Dosen (bis 2,0 mg) bei langsamer Dosissteigerung gut toleriert wird [96], können durch die Gabe der Injektionslösung in den Glaskörper unerwünschte Ereignisse beobachtet werden. Infolge des Eingriffs können allgemeine Symptome wie Kopfschmerzen, Sehstörungen und Fremdkörpergefühl in den Augen auftreten. Bedingt durch kleinere venöse Blutungen in den Glaskörperraum beim Durchstich durch die Bulbuswand können „Mouches volantes“ entstehen. Diese Erscheinungen sind reversibel und bilden sich in der Erholungsphase wieder zurück. Weiterhin können Blutungen an der Bindehaut und eine Glaskörpergrenzmembranabhebung resultieren. Häufig kommt es nach der Injektion (60 Minuten) zu einem Anstieg des intraokularen Drucks, weshalb sowohl der Augeninnendruck als auch die Durchblutung der retinalen Zentralarterie postoperativ kontrolliert werden müssen [97]. Auch wurde nach der Gabe von Ranibizumab in verschiedenen Studien (MARINA [95], ANCHOR [21]) über intraokulare Entzündungen, infektiöse Endophthalmitiden, rhegmatogene Netzhautablösungen, Einrisse in der Netzhaut und iatrogene Linsenverletzungen bei der Injektion mit traumatischer Katarakt als mögliche auftretende Nebenwirkungen berichtet [97]. In seltenen Fällen kann durch den Wirkstoff eine intraokulare Antikörperreaktion ausgelöst werden und die erhöhte VEGF-Hemmung außerhalb des Auges Blutungen induzieren. Ebenfalls scheint sich durch eine Behandlung mit Ranibizumab das Risiko arterieller thromboembolischer Ereignisse zu erhöhen [97]. Der Zusammenhang der Verabreichung antiangiogener Substanzen mit dem Auftreten von Schlaganfällen und Myokardinfarkten wurde ebenfalls in Studien belegt (CATT) [22]. Bei Überempfindlichkeitsreaktionen gegen den Wirkstoff sowie bei okulären und periokulären Entzündungen und Infektionen sollte das Medikament nicht eingesetzt werden. Da es bisher keine Studien zu Interaktionen gibt, darf Ranibizumab nicht mit anderen Arzneimitteln gemischt werden [97]. Bezüglich karzinogener und teratogener Wirkungen liegen ebenfalls noch keine Daten vor.

Bevacizumab (Avastin®)

Das in der Tumorthherapie verwendete Bevacizumab ist, wie Ranibizumab, ein gentechnisch hergestellter humanisierter Antikörper mit hoher Affinität zu allen VEGF-A-Isoformen. Er wurde ursprünglich für die Behandlung von Tumoren entwickelt [114] und ist in Kombination mit der Chemotherapie für den Einsatz bei metastasierenden kolorektalen Karzinomen, Mamma-Karzinomen, inoperablen oder fortgeschrittenen metastasierenden nicht-

kleinzelligen Bronchial-Karzinomen und metastasierenden Nierenzellkarzinomen zugelassen [99]. Durch die Bindung von VEGF-A werden die pathologischen Gefäßneubildungen reduziert und die Tumore in ihrem Wachstum gestoppt. Daher kann durch die Therapie mit Avastin® einer weiteren Progression der fortgeschrittenen Karzinome vorgebeugt werden.

Am Auge wird Bevacizumab häufig „off-label“ eingesetzt. Zum einen verhindert die VEGF-hemmende Wirkung von Avastin® eine Visusverschlechterung bei der feuchten altersabhängigen Makuladegeneration [22]. Zum anderen können auch häufige okuläre Erkrankungen wie die diabetische Retinopathie [9] und Makulaödeme nach venösen Gefäßverschlüssen [55] mit Bevacizumab behandelt werden. Intraoperativ kann der vorab injizierte VEGF-Hemmer bei einer durch die proliferative diabetische Retinopathie induzierten traktiven Ablatio potentielle retinale Blutungen während der Vitrektomie reduzieren [124]. Auch bei seltenen neovaskulären okulären Krankheiten wie Morbus Eales [64], Retinopathia praematurorum und POHS (Presumed-Ocular-Histoplasmosis-Syndrom) [127] ist eine antiangiogene Therapie mit Avastin® sehr wirkungsvoll.

Obwohl Ranibizumab und Bevacizumab den gleichen Wirkmechanismus bei der Wachstumshemmung von Neovaskularisationen haben, unterscheiden sich beide hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer Pharmakokinetik. Der Antikörper Bevacizumab enthält zwar ebenfalls Genabschnitte von der Maus für die Bindung des Wachstumsfaktors, hat jedoch durch seine Humanisierung eine längere Halbwertszeit im Glaskörper (9,82 Tage) als Ranibizumab [73]. Die Konzentrationsabnahme in der Vorderkammer ist jedoch ähnlich wie bei Ranibizumab [73]. Des Weiteren ist das Molekül von Avastin® mit 148 kDa im Vergleich zu Lucentis® (48 kDa) erheblich größer und stabiler. Während Ranibizumab nur eine Bindungsstelle für VEGF-A hat, besitzt Bevacizumab zwei Bindungs epitope [11]. Jedoch ist die Bindungsaffinität von Avastin® trotzdem geringer als die des speziell für die Anwendung im Auge entwickelten Antikörpers Lucentis®. Auch bei der Herstellung der beiden antiangiogenen Substanzen gibt es erhebliche Unterschiede. Das Krebstherapeutikum Avastin® wird aus eukaryotischen CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells) gebildet und enthält, anders als Lucentis®, noch einen glykosylierten Fc-Teil, welcher Immunreaktionen induzieren kann [112, 114]. Zudem zeigen Untersuchungen an retinalen Pigmentepithelzellen von Schweinen, dass sich Bevacizumab im Gegensatz zu Ranibizumab in den RPE-Zellen anreichert [63] und einen negativen Effekt auf die Phagozytose von abgestoßenen Photorezeptoraußensegmenten hat. Dadurch wird die Funktionstüchtigkeit der retinalen Pigmentepithelzellen beeinträchtigt [62].

Mögliche Komplikationen bei einer Therapie mit Bevacizumab könnten zum einen durch den kompletten IgG-Antikörper in Form von Immunreaktionen und zum anderen durch die Zusammensetzung der Injektionslösung bedingt sein. Diese enthält neben dem Wirkstoff zusätzlich auch Puffersalze, Trehalose und das Polysorbat 20 (Tween20®). Ob dieser Zusatz negative Auswirkungen am Auge haben kann und ob durch das vorhandene Fc-Fragment erhebliche Immunreaktionen ausgelöst werden könnten, ist bisher noch ungeklärt [112]. Die lokalen Nebenwirkungen entsprechen denen der anderen VEGF-Inhibitoren [11]. Bevacizumab wird meist gut vertragen. Bei intravitrealer Gabe in höheren Dosen kann eine Verzögerung der Wundheilung auftreten und bei Hypertonie-Patienten wurden Blutdruckanstiege beobachtet [67]. Der Zusammenhang zwischen der antiangiogenen Therapie und dem Auftreten von thromboembolischen Ereignissen ist auch beim Einsatz von Bevacizumab noch nicht ausreichend durch Studien belegt [112].

Pegabtanib (Macugen®)

Bei dem VEGF-Hemmer Pegabtanib handelt es sich um ein modifiziertes RNA-Oligonukleotid, welches selektiv die VEGF-Isoform₁₆₅ bindet [26]. Das VEGF-Aptamer bindet spezifisch an den VEGF₁₆₅-Rezeptor und inhibiert durch die Strukturveränderung innerhalb des Wachstumsfaktors die Bindung an die Endothelzellen [65].

Macugen® ist zur Therapie von okulären Erkrankungen für die Behandlung der feuchten AMD zugelassen [91]. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass Pegabtanib die VEGF₁₆₅-induzierte Delokalisation des Tight-Junction-Proteins Occludin aus der Plasmamembran ins Zytosol vollständig zurückbildet und sich Occludin nach dem Einsatz von Macugen wieder in die Plasmamembran einlagert [26]. Da es den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke verhindert, scheint bei der Therapie der diabetischen Retinopathie der Einsatz sinnvoll.

Infolge der selektiven Blockierung von VEGF₁₆₅ hat Pegabtanib gegenüber anderen VEGF-Hemmern, wie Ranibizumab und Bevacizumab, eine geringere Rate an Nebenwirkungen, ist jedoch dadurch auch weniger antiangiogen wirksam [91].

Aflibercept (Eylea®)

Seit Dezember 2012 ist Aflibercept (Eylea®) für die Behandlung der exsudativen AMD in Deutschland zugelassen. Bei dem Wirkstoff handelt es sich um ein Fusionsprotein aus

Fragmenten der extrazellulären Domänen der humanen VEGF-Rezeptoren-1 und -2 und dem Fc-Fragment des humanen IgG1 [98]. Auch hier erfolgt, wie bei Avastin, die Herstellung in den Ovarialzellen chinesischer Hamster (CHO). In mehreren Studien konnte die Wirksamkeit mit günstigem Visusverlauf wie nach der Gabe von Ranibizumab belegt werden [46].

Triamcinolon (Triamcinolonacetonid)

In der Augenheilkunde wird Triamcinolon zur Therapie zahlreicher vitreoretinaler Erkrankungen eingesetzt. Beim diabetischen Makulaödem, der exsudativen altersbedingten Makuladegeneration bei nach Katarakt-Operationen aufgetretenem Irvine-Gass-Syndrom (zystoides Makulaödem bei Pseudophakie) [4, 116], kann durch die Gabe der kristallinen Lösung in den Glaskörper Gefäßleckagen und Ansammlungen intra- und subretinaler Flüssigkeiten verringert werden. Der Wirkstoff wird aufgrund seiner antiproliferativen, antiinflammatorischen und antiangiogenen Wirkung auch zur Behandlung von proliferativer diabetischer Retinopathie, Uveitis und retinalen Venenverschlüssen eingesetzt.

Es handelt sich um ein synthetisches lipophiles Kortikosteroid mit einem breiten Wirkspektrum. Aufgrund der Darreichungsform als kristalline Suspensionslösung resultiert ein Depoteffekt im behandelten Gewebe [117] und somit eine länger anhaltende Wirkung. Durch die geringe Löslichkeit in wässriger Lösung ist seine Bioverfügbarkeit sehr hoch und es erfolgt eine verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs, was z. B. im Glaskörper einen gleichbleibenden Wirkstoffspiegel über mehrere Monate zur Folge hat. Bei einer Halbwertszeit von 18,6 Tagen nach intravitrealer Applikation von 4 mg sind noch bis zu 13 Wochen danach therapeutische Konzentrationen nachweisbar [15].

Triamcinolon zeichnet sich durch eine große Wirkstoffbreite aus. Es hat zum einen durch die Reduktion der Prostaglandinsynthese und durch die Hemmung der Freisetzung von Arachidonsäure eine antiinflammatorische Wirkung [32]. Zum anderen unterdrückt es die Kaskade einer Entzündungsreaktion durch das Supprimieren der Leukozytenmigration [88], infolge der Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen und der Reduktion der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Da Ödeme im Auge infolge einer insuffizienten Blut-Retina-Schranke entstehen, wird auch hier das Kortikosteroid durch die Stabilisierung der Schranke mittels Verringerung der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren (VEGF) antiödematös wirksam [88]. Weiterhin können durch die direkte Hemmung von Fibroblasten sowie durch die Reduktion der Freisetzung von Kollagen und der

Blockierung des stimulierenden Zytokins TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) pathologische Proliferationen verhindert werden [116]. Auf die Angiogenese hat Triamcinolon sowohl direkt als auch indirekt einen inhibierenden Einfluss. Es hat eine supprimierende Wirkung auf Matrix-Metalloproteinasen durch das Andocken an die Steroidrezeptoren der Endothelzellen und unterbindet somit den Umbau der extrazellulären Matrix [109, 125]. Indirekt antiangiogen wirkt das Steroid durch Unterdrückung der Aktivierung und Migration von Entzündungszellen. Dies hat zur Folge, dass keine proangiogenen Faktoren, wie der Wachstumsfaktor VEGF, synthetisiert werden.

Trotz des breiten Wirkspektrums nimmt die Zahl der Indikationen für den Einsatz von Triamcinolon im Glaskörper wieder ab. Zum einen gibt es heute neue und effektivere Medikamente, wie die VEGF-Inhibitoren bei Neovaskularisationen. Zum anderen treten durch die intravitreale Gabe des Kortikosteroids erhebliche Nebenwirkungen auf. Bei langer Depotwirkung von Triamcinolon können lokal unerwünschte Wirkungen auftreten. Die Gabe des Kortikosteroids in das Corpus vitreum kann durch eine irreversible Trübung der hinteren Linsenkapsel frühzeitig eine Katarakt induzieren [54]. Bei älteren Patienten ist es möglich, dass zusätzlich zur altersbedingten Katarakt eine Verstärkung der Rinden- und Kerntrübung der Linse resultiert [54]. Dies erfordert dann meist einen operativen Eingriff. Des Weiteren kann sich durch die Behandlung mit dem Medikament ein Sekundärglaukom entwickeln [116]. Der intraokulare Druck steigt meist 1-2 Monate nach der Injektion an, erreicht nach 2-5 Monaten Maximalwerte [10] und kann bei einem aggressiven Verlauf eine systemische oder operative antiglaukomatöse Therapie erfordern. Hinzu kommt, dass bei der Injektion von Triamcinolon das Risiko für eine infektiöse Endophthalmitis höher ist als bei anderen intraokularen Eingriffen. Dies ist bedingt durch die kortisoninduzierte Immunsuppression [83]. Da mit Triamcinolon oft Schäden der Netzhaut behandelt werden, welche im Rahmen des Diabetes mellitus auftreten, haben die Patienten bereits durch ihr Grundleiden eine verringerte Immunabwehr und eine höhere Infektanfälligkeit [115]. Dadurch kommt es bei der intravitrealen Applikation vermehrt zu lokalen Infektionen. Bisher noch ungeklärt ist die mögliche toxische Wirkung von Triamcinolon auf die retinalen Zellen. Untersuchungen in vitro haben ergeben, dass das Steroid das Wachstum der Netzhautzellen negativ beeinflusst und zusätzlich die Synthese von pro-apoptotischen Faktoren stimuliert [131]. Selbst bei niedrigen Konzentrationen (200 μ g/ml) konnte eine direkte toxische Wirkung von Triamcinolon auf die Zellschichten der Retina nachgewiesen werden [79]. Wird das Löslichkeitsgewicht von

Triamcinolon ab einer bestimmten Konzentration überschritten, lagern sich die Kristalle epiretinal auf der Netzhautoberfläche ab. Da die ebenfalls lipophilen Zellmembranen damit direkten Kontakt mit den Sedimenten haben, wird die Stabilität der Membranen gestört und die Zellen gehen zugrunde [117]. Haben die Zellen keinen unmittelbaren Kontakt mit dem Wirkstoff, ist Triamcinolon gut verträglich und wirkt nicht toxisch. In vivo besitzt das Auge protektive Faktoren, wie die Membrana limitans interna und den Glaskörper [116]. Diese grenzen die retinalen Zellen vom Glaskörperraum ab und unterbinden dadurch den toxischen Effekt. Jedoch können durch operative Eingriffe diese Barrierefunktionen verloren gehen. Die Membrana limitans interna wirkt für Triamcinolon abweisend. Im Rahmen eines ILM-Peelings können sich die Sedimente leichter an die Netzhautzellen anlagern und die Zellstrukturen zerstören. Auch der Glaskörper schützt indirekt die Retina vor toxischen Einwirkungen. Die Triamcinolon-Kristalle haben eine hohe Affinität zur Glaskörpersubstanz. Daher wird das Medikament häufig bei schwierigen intravitrealen Eingriffen zur besseren Darstellung des Corpus vitreum genutzt. Durch die erhöhte Bindung der Kristalle mit den intravitrealen Strukturen wird eine Sedimentation auf der Netzhautoberfläche verhindert. Wenn nun bei einem vitrektomierten Auge Triamcinolon in den Glaskörperraum gegeben wird, kommt es, aufgrund der fehlenden protektiven Wirkung des Glaskörpers, zu einer erhöhten Sedimentation. Des Weiteren kann das Kortikosteroid beim Einsatz während einer Vitrektomie, durch die anschließende Bauchlage des Patienten, über die Pupille in die Vorderkammer gelangen und dort das Endothel der Hornhaut schädigen (vgl. Abb. 2).

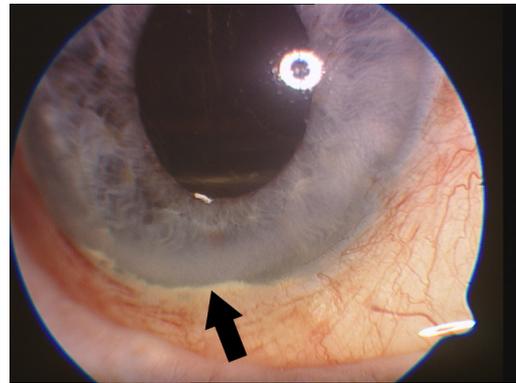


Abb. 2: Triamcinolon in der Vorderkammer bei einem vitrektomierten Patienten nach Eingabe des Medikamentes in den Glaskörperraum mit Gastamponade und postoperativer Kopf-Tief-Lagerung

1.3.2 Einsatz antiangiogener Substanzen bei AMD

Die exsudative (feuchte) altersbedingte Makuladegeneration macht 15 % aller AMD-Formen aus, ist im Vergleich zur trockenen AMD durch eine schnellere Visusverschlechterung gekennzeichnet und ist die häufigste Erblindungsursache im höheren Alter (> 65 Jahre) in Europa [66]. Bei dieser neovaskulären Erkrankung wird durch oxidativen Stress, entzündliche Zellen und Hypoxie [78, 118] aus den RPE-Zellen der Wachstumsfaktor VEGF exprimiert,

welcher die Bildung neuer Blutgefäße aus der Choriokapillaris induziert. Da die retinalen Pigmentepithelzellen altersbedingt in ihrer Funktionsfähigkeit abnehmen, lagern sich innerhalb dieser Zellen Abbauprodukte, wie Lipofuszin, ab, welche in der Funduskopie und in der Fluoreszenzangiografie (FAG) als Drusen sichtbar sind. Die Zellen des Pigmentepithels gehen infolge davon zugrunde und es entstehen Lücken in der Bruch'schen Membran (Grenzmembran zwischen Choroidea und Pigmentepithel). An diesen Stellen können die abnormen Gefäße die Grenzmembran durchdringen und proliferieren subretinal. Aufgrund des insuffizienten Wandbaus der Neovaskularisationen treten seröse Flüssigkeit, Lipide und Blut aus den Gefäßen aus [66]. Durch die Leckage im Bereich der Makula entsteht fibrovaskuläres Narbengewebe, welches einen irreversiblen Visusabfall zur Folge hat.

Bei der Behandlung der neovaskulären AMD ist die intravitreale Injektion von VEGF-Hemmern gegenüber anderen Verfahren, wie photodynamischer Therapie (PDT), Laserkoagulation und subretinaler Makulachirurgie, heute die Therapie der Wahl [74]. Die Inhibitoren des Wachstumsfaktors wirken durch die Hemmung der proangiogenen Aktivität des VEGF's bei allen Subtypen der feuchten altersbedingten Makuladegeneration und haben ein geringeres Risikoprofil als andere Methoden. Wichtig ist hierbei ein früher Beginn der Behandlung, da die Photorezeptoren noch nicht irreversibel geschädigt sind und eine bessere visuserhaltende und teilweise sogar -verbessernde Wirkung erreicht werden kann [33]. Jedoch verändern die antiangiogenen Substanzen nicht die Größe der Neovaskularisation, sondern wirken nur inhibierend auf das Wachstum [111]. Die Hemmung von VEGF-A ist keine kurative Therapie, sondern schaltet einen bedeutenden Faktor für die Angiogenese aus. Zusätzlich muss daher immer die eigentliche Ursache für die VEGF-Induktion (Ischämie) behandelt werden.

Für die Behandlung der verschiedenen Subtypen der exsudativen choroidalen Neovaskularisationen (CNV) hat sich die intravitreale Gabe von Ranibizumab heute durchgesetzt. Die antiangiogene Substanz ist seit Februar 2007 mit einer Dosierung von 0,5 mg pro Injektion für die Therapie der neovaskulären AMD in Deutschland zugelassen [11]. Es ist die erste Therapieform, bei der die Sehkraft von Patienten mit minimal klassischer und okkulten CNV nicht nur erhalten wird, sondern auch ein Anstieg des Visus erreicht werden kann. Von den bei der AMD angewandten Medikamenten erzielte Lucentis® beim intravitrealen Einsatz in den Studien die besten Ergebnisse. In klinischen Studien der Phase III (MARINA, ANCHOR) [21, 95] konnte bei einer monatlichen Anwendung von Ranibizumab über 2 Jahre bei über 90 % der Patienten mit einer neovaskulären AMD die Verschlechterung des

Visus auf weniger als 15 Buchstaben auf der ETDRS-Tafel minimiert werden. Des Weiteren wurde bei 30-40 % der Erkrankten eine deutliche Verbesserung der Sehschärfe von 7,2 (MARINA) [95] bis 11,3 Buchstaben (ANCHOR) [21] auf der ETDRS-Tafel erreicht. Da Lucentis® alle VEGF-A-Isoformen hemmt und jede einzelne Schicht der Retina durchdringt, können Ödeme und Verdickungen der Netzhaut, welche durch intra- und subretinale Flüssigkeit bedingt sind, rasch reduziert werden [47]. Dies wirkt sich positiv auf den Visus des Patienten aus. Zu Beginn der Therapie mit Ranibizumab steht eine Aufsättigungsphase (Upload) durch 3 intravitreale Injektionen in 4-wöchigem Abstand. Anschließend erfolgt individuell die Erhaltungstherapie, in der anhand von monatlichen Kontrolluntersuchungen die Restaktivität oder das Ödemrezidiv der AMD mit einer erneuten Gabe von Lucentis® behandelt werden [87]. Die Einhaltung der regelmäßigen Kontrolluntersuchungen alle 4 Wochen sind für den Erfolg der Therapie sehr wichtig, um eine dauerhafte Visusstabilisierung und -verbesserung zu ermöglichen [87].

Bei Versagen der Ranibizumab-Therapie sind Pegabtanib oder die PDT die Therapie der zweiten Wahl. Der Wirkstoff Pegabtanib ist seit Juli 2006 in Deutschland zur Behandlung der feuchten altersabhängigen Makuladegeneration zugelassen und wird in 6-wöchigen Abständen mit 0,3 mg pro Injektion verabreicht [20]. Durch seine selektive Hemmung des VEGF-A₁₆₅ verlangsamt es zwar das Voranschreiten der neovaskulären Erkrankung, verbessert jedoch nicht die Sehkraft der Patienten [38]. Weiterhin konnte bisher nur ein therapeutischer Effekt bei einer Therapiezeit über 2 Jahre nachgewiesen werden (V.I.S.O.N.-Studie) [23]. Bei einer Behandlungsdauer von nur einem Jahr, hatte der intravitreale Einsatz von Macugen® keinen dauerhaften Nutzen. Ob eine Kombination von Pegabtanib mit anderen antiangiogenen Substanzen eine bessere Wirkung erzielt, ist bisher noch nicht ausreichend belegt [52].

Bis zur Zulassung von Ranibizumab wurde bei der AMD überwiegend das Krebsmedikament Bevacizumab (Avastin®) injiziert [127]. Auch heute wird es weiterhin behandlungsalternativ als „off label“-Therapie bei verschiedenen Subtypen der choroidalen Neovaskularisationen eingesetzt [127] und hat eine größere therapeutische Wirkung als die photodynamische Therapie oder Pegabtanib. Da Avastin® in gleicher Weise an alle VEGF-A-Isoformen bindet wie Ranibizumab und ebenfalls vollständig die Retina und Choroidea durchdringt [45], können auch hier eine Visusstabilisierung und ein Anstieg der Sehschärfe erreicht werden [102]. Die Verbesserung der Sehkraft durch die intravitreale Gabe von 1,25 mg/ 0,05 ml Bevacizumab

[11] ist vergleichbar mit der Wirkung von Ranibizumab während der Phase-III-Studien in den ersten Monaten [6, 21, 95]. Weiterhin sind durch die längere Halbwertszeit die Behandlungsintervalle größer und der Wirkstoff Bevacizumab ist zudem kostengünstiger als Lucentis® [127].

Die intravitreale Gabe von Triamcinolon bei der exsudativen AMD hat zwar eine indirekte antiangiogene Wirkung zur Folge, jedoch wird eine Monotherapie mit dem Kortikosteroid nicht empfohlen. Zum einen treten durch die Injektion in den Glaskörper häufig Nebenwirkungen auf (siehe Abschnitt 0) und zum anderen konnte in Studien keine eindeutige therapeutische Wirkung nachgewiesen werden [35]. Nach 12 Monaten waren die antiangiogenen Effekte aus der Anfangsphase der Behandlung nicht mehr belegbar. In Kombination mit der photodynamischen Therapie kann Triamcinolon jedoch sinnvoll eingesetzt werden, da die PDT-induzierten entzündlichen Reaktionen und die vermehrte VEGF-Produktion reduziert werden [11].

1.3.3 Anwendung bei Erkrankungen des Augenvorderabschnitts

Auch in der Therapie von Erkrankungen des vorderen Augenabschnitts hat der Einsatz antiangiogener Substanzen in den letzten Jahren Einzug gehalten.

Bei Neovaskularisationen an der Hornhaut werden Ranibizumab, Bevacizumab und Pegabtanib „off label“ in Form von Augentropfen wirkungsvoll eingesetzt [91]. Avastin® hat bei dieser Anwendung gegenüber anderen lokalen Arzneimitteln, wie Steroiden oder Cyclosporin A, sogar erhebliche Vorteile. Aufgrund seines höheren antiangiogenen Effekts, kann es adjuvant in Form von Augentropfen oder subkonjunktival bei fortgeschrittener Limbusstammzellinsuffizienz und nach einer Keratoplastik eingesetzt werden [19, 44]. Des Weiteren wird Bevacizumab „off-label“ zur Exzision bei Pterygien gegeben, um Rezidiven vorzubeugen [67]. Um bei der Filterkissenchirurgie von Glaukomen die Fibroblastenproliferation und somit die Vernarbung des Filterkissens zu verhindern, ist auch hier eine VEGF-Inhibition durch die subkonjunktivale Verabreichung des Krebsmedikamentes sehr hilfreich [72].

Da Ranibizumab und Bevacizumab aufgrund der raschen Penetration von Irisgewebe, Kammerwinkelstrukturen und Ziliarkörper einen schnellen Rückgang von Neovaskularisationen bewirken [112], werden sie ebenfalls „off label“ beim Neovaskularisationsglaukom mit Rubeosis iridis in die Vorkammer gegeben [91].

1.3.4 Einsatz beim Neovaskularisationsglaukom

Beim neovaskulären Sekundärglaukom können antiangiogene Substanzen ergänzend zu den derzeitigen therapeutischen Behandlungen bei einer Rubeosis iridis eingesetzt werden [71]. In den frühen Stadien der Rubeosis reduzieren sie die Gefäßneubildungen auf der Iris und verhindern dadurch eine Verlegung des Kammerwinkels. Bei fortgeschrittener Erkrankung mit Proliferationen der Gefäße in das Trabekelwerk können die VEGF-Hemmer additiv zur Basisbehandlung verabreicht werden, um den intraokularen Druck zu stabilisieren [104].

Bevacizumab verhindert durch die Inhibition des Wachstumsfaktors die Bildung neuer Gefäße auf der Irisoberfläche und reduziert die vaskuläre Hyperpermeabilität der Neovaskularisationen. Dadurch bilden sich die Leckagen aus den wandinsuffizienten Gefäßen zurück und der Anteil von Zellen und Proteinen im Kammerwasser wird reduziert [16]. Dies verhindert weitere Druckerhöhungen und eine Progression des Neovaskularisationsglaukoms.

Avastin® kann sowohl intravitreal als auch intrakameral verabreicht werden. Zwar setzt bei beiden Applikationsformen die Wirkung schon nach 48 Stunden ein [12], jedoch hält der therapeutische Effekt nach intravitrealer Injektion mit 6-8 Wochen [12] länger an als bei der intrakameralen Anwendung (4 Wochen) [40]. Weiterhin hat die Injektion in das Corpus vitreum den Vorteil, dass auch das hintere Segment behandelt wird und dadurch weniger proangiogene Faktoren in den vorderen Augenabschnitt gelangen [108]. Für die Injektion in den Glaskörper wird beim NVG meist die gleiche Dosis wie bei der Behandlung der AMD verwendet (1,25 mg/ 0,05 ml) [53]. Bei der seltener angewandten intrakameralen Applikation, werden nur 1,0 mg Avastin® in die Vorderkammer injiziert [40]. Da durch den physiologischen Abfluss des Kammerwassers und einem fehlenden Depoteffekt wie im Glaskörper die Konzentration von Bevacizumab schneller absinkt, sind häufiger Re-Injektionen nötig [71]. Dem gegenüber steht jedoch der sofortige Wirkungseintritt nach der Gabe in die Vorderkammer, da sich hier die antiangiogene Substanz sofort im Anwendungsgebiet befindet und nicht erst über den Glaskörper in die Vorderkammer gelangen muss [40] (vgl. Abb. 3). Die therapeutische Wirkung des VEGF-Hemmers hält bis zu 6 Monate an. Anschließend müssen erneut Injektionen erfolgen, da sich sonst bei fehlender Hemmung des Wachstumsfaktors wieder Gefäße an der Irisoberfläche bilden [57].

Da mit der antiangiogenen Therapie nicht die Ischämie als eigentliche Ursache der Erkrankung behandelt wird, sondern durch die VEGF-Hemmung besonders bei irreversibler Synechie des Kammerwinkels nur eine Progression des Glaukoms verhindert werden kann [16], erfolgt

der Einsatz von VEGF-Inhibitoren adjuvant zur Basistherapie [71]. Durch die panretinale Laserkoagulation und die Netzhautkryokoagulation kann der ischämische Reiz beseitigt werden und mit Hilfe der Zyklokryotherapie und filtrierenden Eingriffen lassen sich sowohl die Produktion als auch der Abfluss des Kammerwassers regulieren. Durch die zusätzliche Verabreichung der VEGF-Inhibitoren kann durch deren schnellen Wirkungseintritt der Zeitraum bis zur Behandlung der antiangiogenen Ursache überbrückt werden [71].

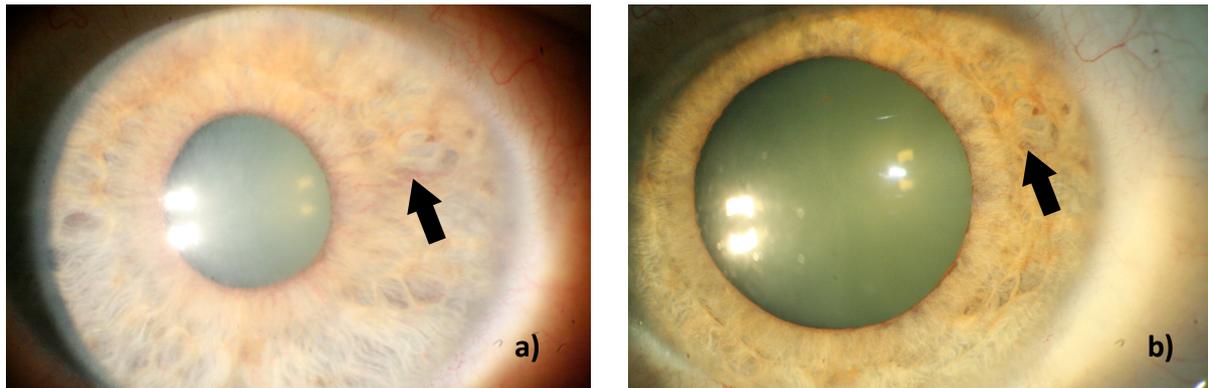


Abb. 3: Patient mit Rubeosis iridis vor (a) und nach (b) der Gabe von Bevacizumab (Avastin®) in die Vorderkammer

1.4 Problemstellung

Durch Neovaskularisationen auf der Irisvorderfläche in Form einer Rubeosis iridis, die bei vielen ischämischen Netzhauterkrankungen als Komplikation entstehen können, kann der Kammerwinkel verlegt werden. Daraus ergibt sich eine Abflussbehinderung für das Kammerwasser. Da der erhöhte Augeninnendruck das Sehvermögen gefährdet, ist es wichtig, diese Neovaskularisationen frühzeitig zu behandeln, um die pathologischen Gefäßneubildungen zu stoppen und den Augendruck zu senken. Die operative Behandlung bei einer ausgeprägten Rubeosis gestaltet sich oftmals schwierig. Daher stellt der „off-label“-Gebrauch durch die Injektionen von antiangiogenen Substanzen wie Ranibizumab (Lucentis®), Bevacizumab (Avastin®) und Pegaptanib (Macugen®) in die Vorderkammer eine sinnvolle Behandlungsalternative dar, um Proliferationen an der Iris zurückzudrängen und den intraokularen Druck zu senken. Diese Medikamente sind bei der Behandlung von Gefäßneubildungen an der Netzhaut bereits etabliert und verhindern durch die Inhibition der VEGF-Bildung in den ischämischen Arealen die Angiogenese. Durch die Applikation in die Vorderkammer haben die antiangiogenen Substanzen jedoch direkten Kontakt zu dem empfindlichen Endothel der Hornhaut. Da noch nicht geklärt war, welchen Einfluss der Einsatz von VEGF-Inhibitoren in der Vorderkammer auf die innerste Schicht der Hornhaut hat, war es Ziel der Arbeit zu untersuchen, ob die Gabe der antiangiogenen Substanzen in den vorderen Augenabschnitt zu morphologischen Veränderungen am Hornhautendothel führt.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmodell Schweineauge

Zur Untersuchung der Morphologie des Endothels wurden Hornhäute von enukleierten Schweineaugen der Rasse „Deutsches Hausschwein“ verwendet, da diese der Anatomie, Physiologie und Embryologie des menschlichen Auges sehr ähnlich sind und sich nur durch das Fehlen einer Bowman-Lamelle von humanen Hornhäuten unterscheiden. Es handelte sich um 4 bis 5 Monate alte Schweine mit einem Gewicht von 25-50 kg. Die Eukleation der Schweineaugen erfolgte im Schlachtbetrieb Möllin (Mecklenburg-Vorpommern) unmittelbar nach der Tötung der Tiere. Um eine thermische Schädigung der Hornhäute auszuschließen, wurden die Proben vor der Bebrührung entnommen. Die Bulbi wurden in einer Kühlbox bei +4 °C vom Schlachthof Möllin in das Forschungslabor der Schweriner Augenklinik (HELIOS-Kliniken) transportiert und anschließend im Kühlschrank bis zur jeweiligen Präparation gelagert. Aufgrund des langen Schlachtungszeitraums von 4 bis 5 Stunden und der Aufeinanderfolge der einzelnen Präparationen ergab sich für die Hornhäute jeweils eine postmortale Zeit von 6 bis 13 Stunden. Vor dem Einsatz der antiangiogenen Substanzen wurden durch die Promovendin mehr als 200 Schweineaugen ohne die Injektion eines Medikaments präpariert, um die Technik der Gabe von Substanzen in die Vorderkammer und der anschließenden Trepanation der Hornhäute zu erlernen.

2.2 Versuchsregime

Es wurden pro Versuchsreihe in jeweils 10 Schweineaugen die zu untersuchenden Substanzen Lucentis®, Avastin®, Triamcinolon und BSS injiziert, wobei für Triamcinolon und Bevacizumab aufgrund der guten Verfügbarkeit jeweils eine weitere Versuchsreihe erfolgte und hier die Gesamtprobenanzahl N=20 betrug. Bei jeder Injektion wurden 50 µl (= 0,05 ml) des jeweiligen Medikamentes in die Vorderkammer der einzelnen Schweinebulbi gegeben (vgl. Tab. 1).

Zur Beurteilung der Endothelschädigung durch Ranibizumab wurde eine Injektionslösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/0,05 ml verabreicht, wie sie ursprünglich zur intravitrealen Anwendung bei Patienten eingesetzt wurde. Die bei der klinischen Anwendung am Menschen verbliebenen Lucentis®-Reste wurden gesammelt und in die Vorderkammer der Schweinebulbi gegeben.

Bei der Untersuchung der Beeinflussung des Hornhautendothels durch das Krebsmedikament Bevacizumab wurde die Injektionslösung mit einer Konzentration von 1,25 mg/ 0,05 ml verwendet. Die Lösung wurde ausgeeinzelt in einer Fertigspritze von der Krone-Apotheke (Kiel) bezogen.

Als Vergleichsserie wurden unbehandelte Hornhautproben (Nullserie) nach den gleichen Präparations-, Fixier- und Trocknungsverfahren für die Rasterelektronenmikroskopie aufbereitet. Ebenfalls zur Gegenüberstellung der mit antiangiogenen Substanzen belasteten Präparate wurden in zehn weitere Schweinebulbi 50 µl balancierte Kochsalzlösung (Balanced Salt Solution) gegeben und in die Vorderkammer von 10 Schweineaugen das Kortikosteroid Triamcinolon injiziert. Bei dem Steroid handelte es sich um eine Triamcinolonacetonid-Suspension mit einem Konzentrationsverhältnis von 2 mg/0,05 ml zur intravitrealen Anwendung, bereitgestellt von der Apotheke der HELIOS-Kliniken in Schwerin.

Tab. 1: Übersicht über die injizierten Medikamente

Medikament	Konzentration	Injektionsvolumen
Ranibizumab (Lucentis®)	0,5 mg/ 0,05 ml	50 µl
Bevacizumab (Avastin®)	1,25 mg/ 0,05 ml	50 µl
Triamcinolonacetonid	2 mg/ 0,05 ml	50 µl
Balanced Salt Solution	-	50 µl

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Injektion in die Vorderkammer

Zuerst wurde überschüssiges Gewebe wie Bindegewebe und Muskulatur mittels Schere makroskopisch von der Sklera entfernt und die Schweineaugen in einem Bulbushalter nach SPITZNAS [113] fixiert. Anschließend wurden die Bulbi mit dem Halter für die Injektion des Medikaments unter einem binokularen Operationsmikroskop platziert.

Nach dem Abpräparieren der Konjunktiva mit einer Bindehaut-Schere wurde mit einem Mikroskalpell in horizontaler Lage zur Hornhautkrümmung bei 12⁰⁰ Uhr eine ca. 1mm große Parazentese am Limbus corneae angelegt. Dadurch wurde der Limbus eröffnet und bis zur Descemet'schen Membran perforiert. Durch den angeschnittenen Bereich wurde eine 0,40 x 22 mm (= 27 Gauge) große Injektionskanüle (Fa. BRAUN/Melsungen) mit der Öffnung nach

oben in die Vorderkammer eingeführt und anschließend um 180° gedreht, um Strömungsschäden am Endothel der Hornhaut zu vermeiden. Mit einer 1-ml-Spritze konnten danach 50 µl der antiangiogenen Substanz eingegeben werden (vgl. Abb. 4). Nach der Injektion wurde die Kanüle vorsichtig aus der Vorderkammer entfernt und dabei der Ansaugdruck des Bulbushalters langsam reduziert, um ein Kollabieren der Bulbi durch eine zu schnelle Druckentlastung zu verhindern.

Die Bulbi lagerten anschließend für 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur (vgl. Abb. 4). Diese Zeit entspricht der vollständigen Erneuerung des Kammerwassers im Auge [120] und wäre in vivo der Zeitraum, in dem die injizierte Substanz vollständig aus der Vorderkammer durch den Abfluss mit dem Kammerwasser über den Kammerwinkel abtransportiert worden wäre.

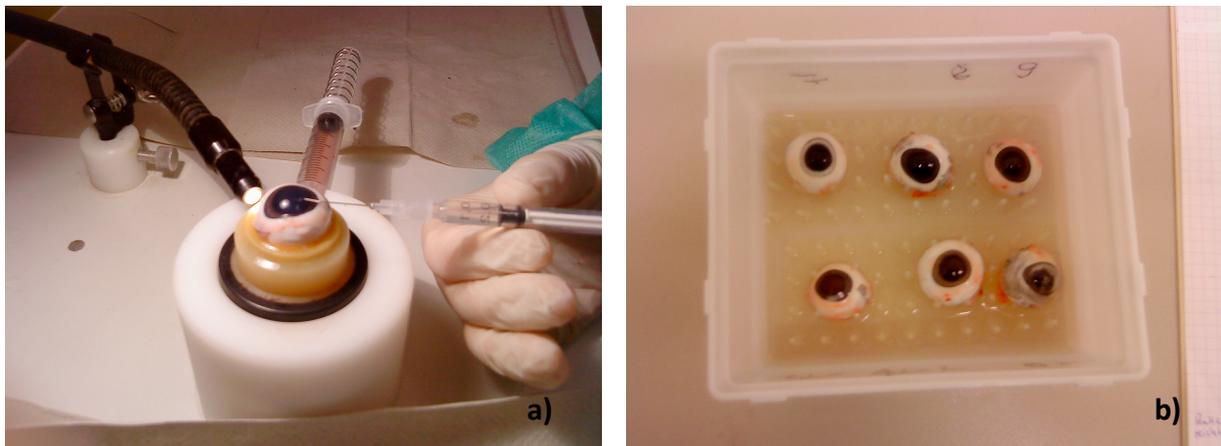


Abb. 4: a) Injektion einer Testsubstanz in die Vorderkammer des Schweinebulbus unter einem binokularen Operationsmikroskop; b) Lagerung der Schweinebulbi in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 90 Minuten

2.3.2 Präparation der Hornhäute

Nach dem Ablauf der Lagerungszeit von 90 Minuten wurden die Schweinebulbi erneut auf dem Bulbushalter fixiert und die Hornhautoberfläche zum Entfernen von Belägen mit einer Natrium-Chlorid-Lösung gespült. Am vorderen Augenpol wurde ein Trepan mit einem Durchmesser von 15 mm so aufgesetzt, dass die Kornea komplett einbezogen war und ein gleichmäßiger ca. 1 mm breiter Sklerarand für die Präparation resultierte (vgl. Abb. 5). Mit gleichmäßigem Druck wurde der Trepan auf dem Augapfel abwechselnd entgegen und mit dem Uhrzeigersinn gedreht und in die Sklera eingeschnitten bis diese an einer Stelle durchtrennt war, sodass anschließend der zirkuläre Schnitt mit einer gebogenen Hornhautschere entlang der Trepanationsfuge vervollständigt werden konnte (vgl. Abb. 5).

Dabei durfte kein Zug auf die Kornea ausgeübt werden, um das Endothel nicht zusätzlich zu schädigen. Die abgetrennte Korneoskleral-Scheibe wurde erneut mit einer Natrium-Chlorid-

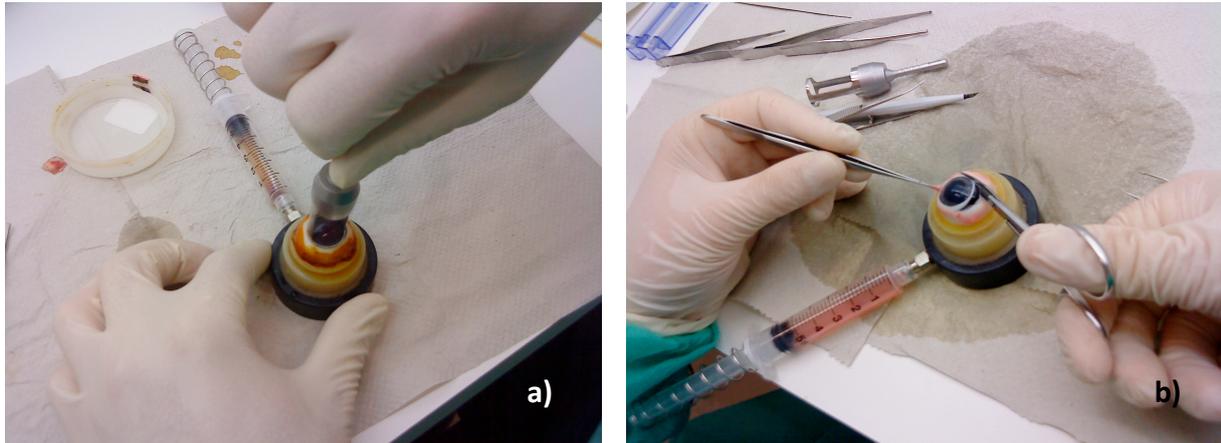


Abb. 5: a) Trepanation des Bulbus mit Hilfe eines 15 mm Trepens zur Präparation der Korneoskleral-Scheibe; b) Zirkulärer Schnitt mit der Hornhautschere zum Abtrennen der Korneoskleral-Scheibe

Lösung gespült, mit der Endothelfläche nach oben gelegt und mit einem Hornhaut-Trepan (HESSBURG BARON) mit 8,25 mm im Durchmesser zur Gewinnung einer zentralen Hornhautscheibe ausgestanzt.

2.3.3 Fixierung der Hornhäute

Um die Proben für die rasterelektronische Untersuchung vorzubereiten, wurden die Hornhäute im elektronenmikroskopischen Labor der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald nach einer Fixations-Methode von J.G. HIRSCH und M.A. FEDORKO (aus dem Jahre 1968) präpariert und fixiert [49].

Nach der Gewinnung der zentralen Hornhautscheiben wurden diese jeweils in 1 ml Fixans über eine Dauer von 24 bis 48 Stunden vorfixiert, welches kurz vor der Fixierung hergestellt wurde, um eine vorzeitige Reaktion der einzelnen Komponenten zu vermeiden. Bei dem Fixativ handelt es sich um ein Gemisch aus 0,8 % Glutaraldehyd, 0,67 % Osmiumtetroxid, 0,1 M Cacodylatpuffer, 1 mM Kalziumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid und 25 mM Natriumazid.

Anschließend wurden die Hornhautproben mit einem Waschpuffer (0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,4, 1 mM Kalziumchlorid, 25 mM Natriumazid) für 4 x 15 Minuten in einem Eisbad gespült und erneut mit einem Fixativ (2,5 % Glutaraldehyd, 0,1 M Cacodylatpuffer, 1 mM Kalziumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 25 mM Natriumazid) im Kühlschrank über Nacht gelagert.

Zur Nachfixierung wurden die Proben am Folgetag zunächst zum Entfernen nichtgebundener Glutaraldehyd-Moleküle wiederholt mit dem Waschpuffer (0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,4, 1 mM Kalziumchlorid, 25 mM Natriumazid) für 4 x 15 Minuten gereinigt. Anschließend erfolgte für 2 Stunden die Nachfixierung und Anfärbung der Hornhäute mit einem Osmiumtetroxid-Fixiemedium (2 %, OsO_4 , 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer) unter Abdunkelung der Hornhautscheiben. Nach dem Spülen der Proben mit Aqua bidest (2 x 5 Minuten und 2 x 10 Minuten), konnten die Präparate für die kritische Punkttrocknung mit Ethanol in aufsteigenden Konzentrationsstufen (jeweils 15 Minuten in 20-, 40-, 60 % Ethanol, über Nacht bei +4 °C in 70 % Ethanol, jeweils 15 Minuten in 80-, 90-, 96 % Ethanol, 3 x 20 Minuten in 99,8 % wasserfreiem Ethanol) entwässert werden.

Nach der Entwässerung wurden die Proben in ein Essigsäure-iso-Amylacetat-Gemisch mit einem Ethanol-Amylacetat-Verhältnis von 2:1 und 1:2 für jeweils 15 Minuten stufenweise überführt, um anschließend die Hornhäute für 3 x 15 Minuten in reinem Amylacetat (reinst, 0,02 % Wasser, RIEDEL DE HAEN) zu spülen. Mithilfe der kritischen Punkttrocknung an einem Gerät der Firma POLARON (CPD7501, VG Microtech, East Sussex, England) wurden die Präparate durch das Spülen mit flüssigem Kohlendioxid in 11 Wiederholungen getrocknet. Nach 12 Durchläufen dieses Trocknungsverfahrens, wurde die Temperatur in der geschlossenen Vorrichtung über den kritischen Punkt (auf 38 °C) erhöht, wobei sich ein Druckanstieg auf 84 bar zeigte. Die getrockneten Hornhautscheiben wurden bis zur weiteren Bearbeitung in einem Exsikkator aufbewahrt.

2.4 Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop

Zur Herstellung der Leitfähigkeit für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Proben zunächst mit Nagellack auf einen Aluminium-Objektträger geklebt und durch Leitsilber mit der Unterlage verbunden. Durch das Aufdampfen einer 5 nm dicken Goldschicht in einem Sputter coater (SC 7640, VG MICROTECH, East Sussex, U.K.) für 8 Minuten bei 1 kW und 13 mA erhielten die Präparate ihre elektrische Leitfähigkeit.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit dem Mikroskop DSM 940A der Firma ZEISS bei einer Arbeitsspannung von 10 kV und einem Abstand von 8-10 mm. Zur Beurteilung des Hornhautendothels wurden für jedes Präparat jeweils 5 Aufnahmen bei 500- und 3000facher Vergrößerung angefertigt (eine Aufnahme aus der Präparatmitte, vier Aufnahmen aus der Peripherie).

2.5 Beurteilung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

Zur morphologischen Bewertung der rasterelektronenmikroskopischen Befunde wurden die einzelnen Hornhäute mit Hilfe eines Scores nach KINZEL [61] bewertet. Dieser Score (vgl. Tab. 2 bis Tab. 5) setzt sich aus den Kriterien Mikrovilli (3000fache Vergrößerung), Zellgrenzen (3000fache Vergrößerung), Zelloberfläche (3000fache Vergrößerung) und Zellmuster (500fache Vergrößerung) zusammen und wurde bereits für die Untersuchungen von postmortalen Veränderungen des Schweinehornhautendothels und ihrer zeitlicher Abhängigkeit eingesetzt.

Jede Aufnahme wurde pro Kriterium mit einem Punktwert zwischen 0 (kaum erhaltene Strukturen) und 3 (sehr gut erhaltenes Hornhautendothel) bewertet (vgl. Abb. 6 bis Abb. 9). Durch Addition der Werte für die einzelnen Merkmale konnte die maximale Punktzahl 12 erreicht werden.

Tab. 2: Punktwert für die Mikrovilli (3000fache Vergrößerung)

Mikrovilli	Punktwert
homogene Verteilung und einheitliche Größe der Mikrovilli	3
unregelmäßige Verteilung der Mikrovilli in den einzelnen Zellen mit Größenunterschieden	2
inhomogene Verteilung der Mikrovilli über das gesamte Hornhautendothel	1
Fehlen von Mikrovilli	0

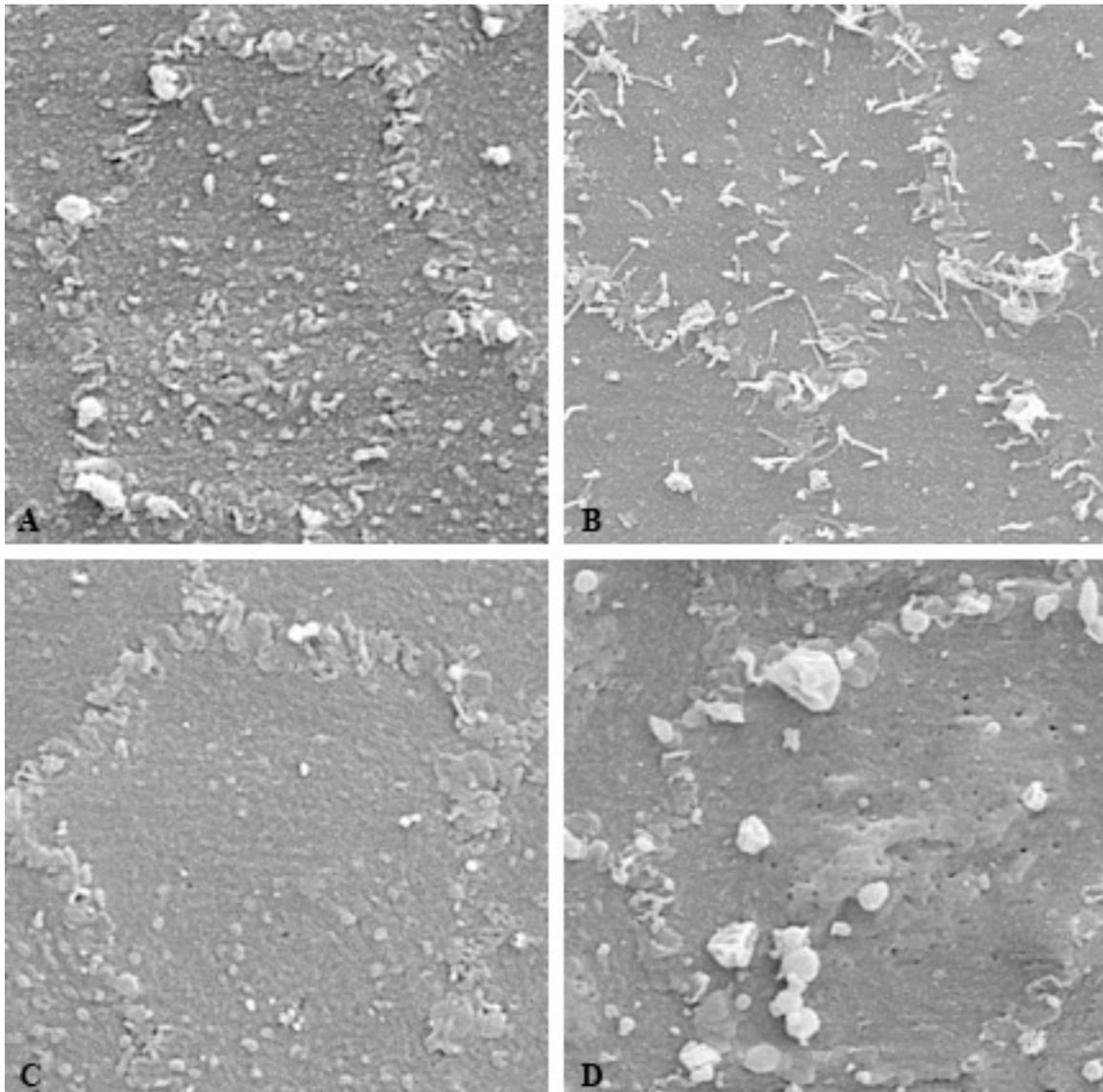
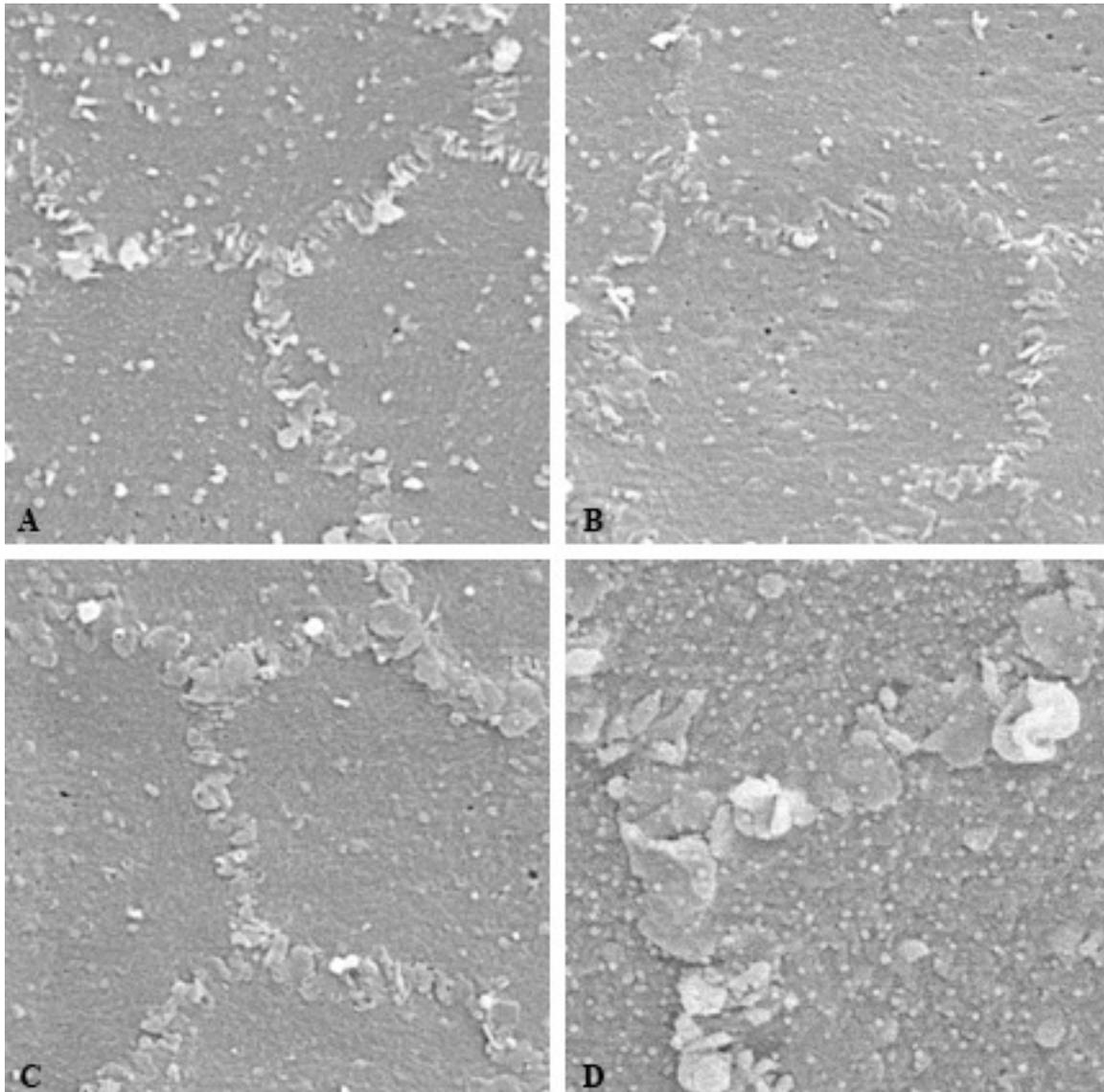


Abb. 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der **Mikrovilli** mit der Bewertung nach Kinzel, rasterelektronenmikroskopische Bilder unbeeinflusster Hornhäute (Nullserie), 3000fache Vergrößerung; (A) Punktwert 3, (B) Punktwert 2, (C) Punktwert 1, (D) Punktwert 0

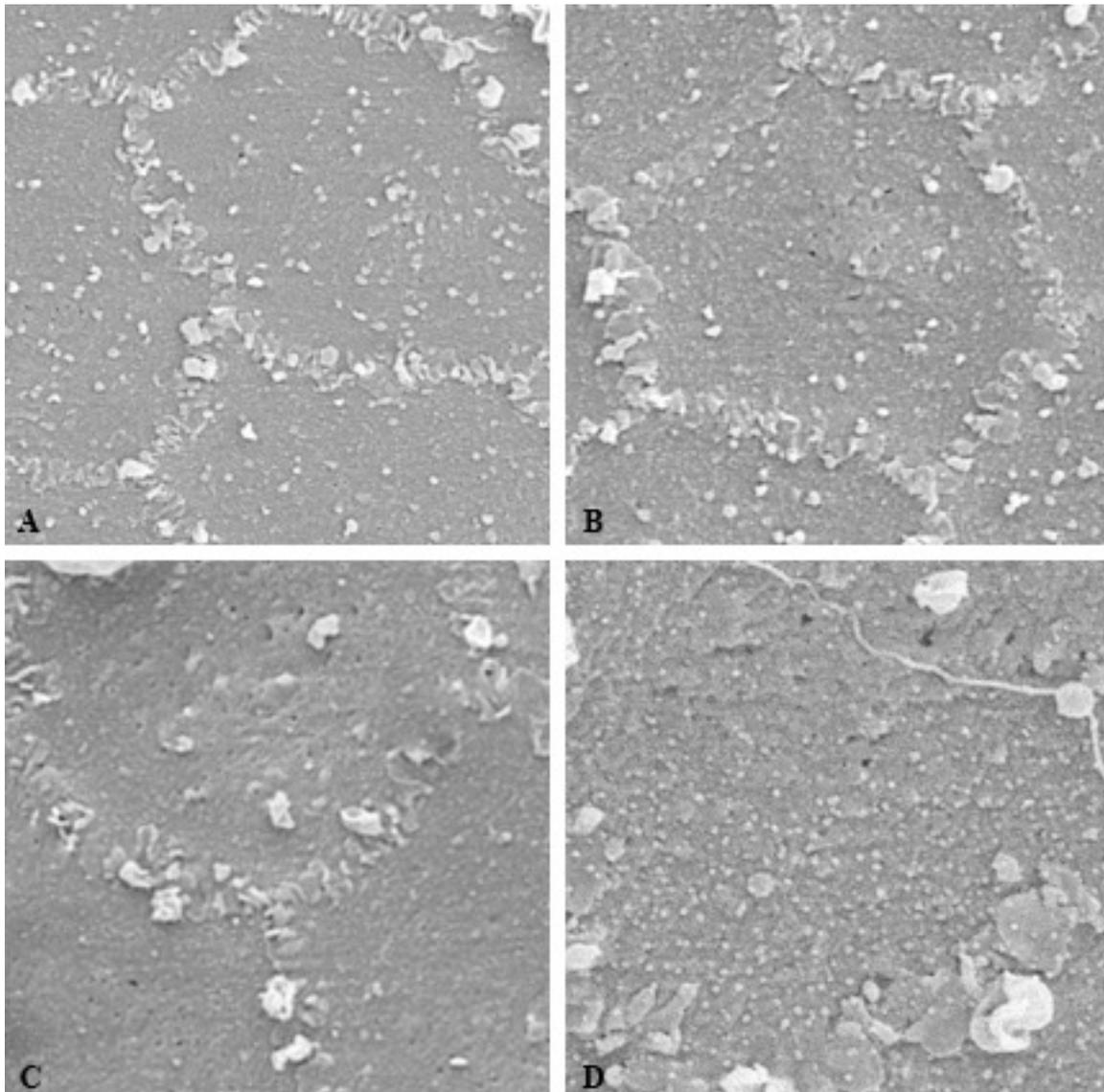
Tab. 3: Punktwert für die **Zellgrenzen** (3000fache Vergrößerung)

Zellgrenzen	Punktwert
ausgeprägte Interdigitationen der Zellgrenzen	3
leichte Vergrößerung der Verzahnungen	2
Verzahnung nur noch angedeutet	1
Auflösung der Zellgrenzen, keine Interdigitationen mehr erkennbar	0

**Abb. 7:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der **Zellgrenzen** mit der Bewertung nach Kinzel, rasterelektronenmikroskopische Bilder unbeeinflusster Hornhäute (Nullserie), 3000fache Vergrößerung; (A) Punktwert 3, (B) Punktwert 2, (C) Punktwert 1, (D) Punktwert 0

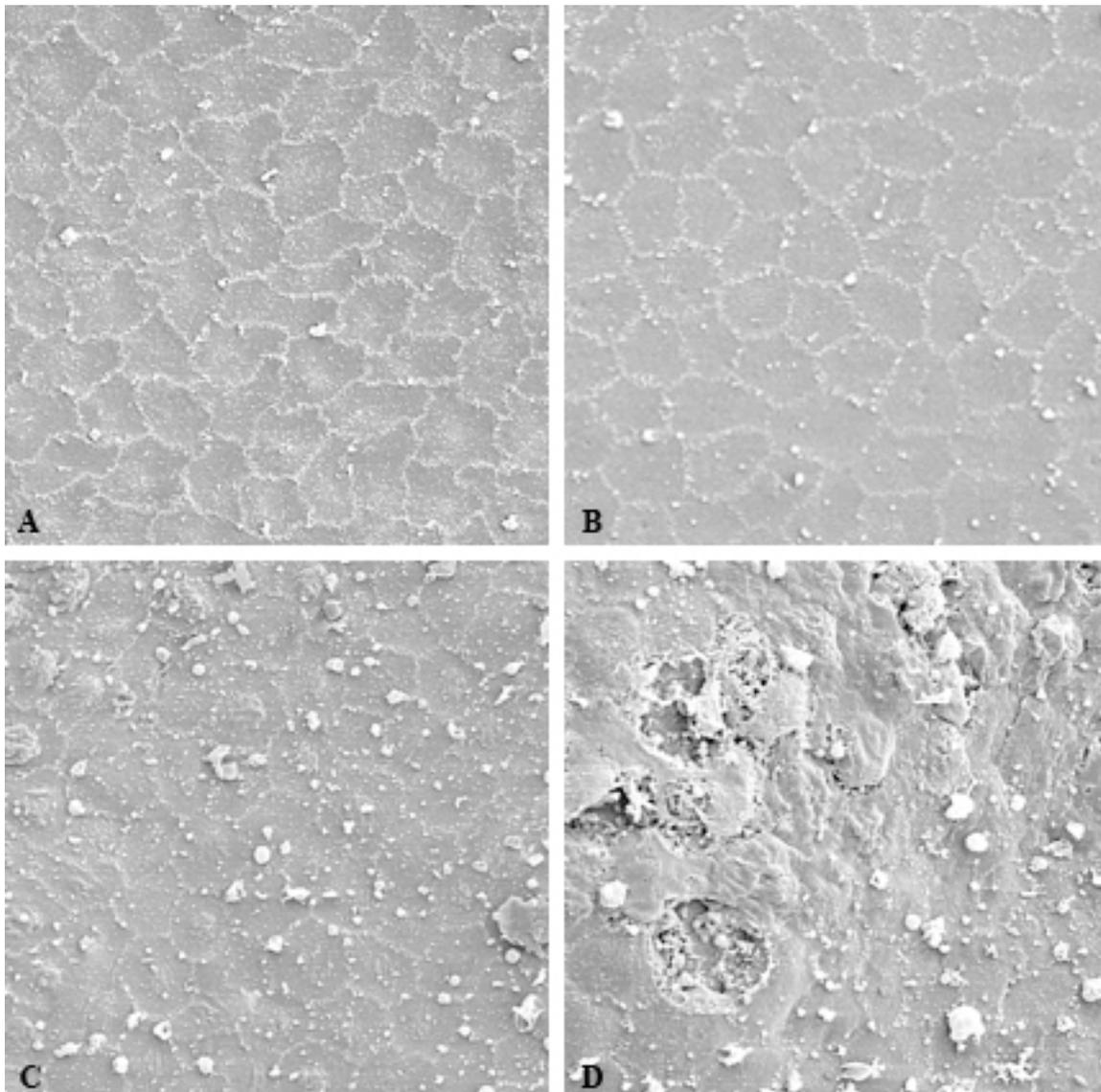
Tab. 4: Punktwert für die **Zelloberfläche** (3000fache Vergrößerung)

Zelloberfläche	Punktwert
homogene Zelloberfläche ohne Unebenheiten	3
vereinzelte zentrale Erhebungen	2
poröse Zelloberfläche mit Schwellungen	1
unregelmäßige Zelloberfläche mit multiplen Zellschwellungen und Zellschrumpfungen	0

**Abb. 8:** Aufnahmen der **Zelloberfläche** mit der Bewertung nach Kinzel, rasterelektronenmikroskopische Bilder unbeeinflusster Hornhäute (Nullserie), 3000fache Vergrößerung; (A) Punktwert 3, (B) Punktwert 2, (C) Punktwert 1, (D) Punktwert 0

Tab. 5: Punktwert für das **Zellmuster** (500fache Vergrößerung)

Zellmuster	Punktwert
wabenförmige und homogene Struktur des Zellmusters	3
Zellverformungen durch zentrale Oberflächenveränderungen sowie leichte Abweichungen in Form und Größe	2
inhomogenes Zellmuster mit Form- und Größenvarianz durch vermehrte Zellschwellungen und Zellschrumpfungen, vereinzelt Zellnekrosen	1
Struktur des Zellmusters kaum noch erkennbar, Auflösung der hexagonalen Form und Unebenheiten an der Oberfläche, großflächige Endothelzellnekrosen	0

**Abb. 9:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des **Zellmusters** mit der Bewertung nach Kinzel, rasterelektronenmikroskopische Bilder unbeeinflusster Hornhäute (Nullserie), 500fache Vergrößerung; (A) Punktwert 3, (B) Punktwert 2, (C) Punktwert 1, (D) Punktwert 0

2.6 Statistische Methoden

Grundlage für die Statistik war die Bewertung der einzelnen Hornhautproben nach den zuvor festgelegten Kriterien, welche pro Präparat mit jeweils fünf Bildern (ein Bild aus der Mitte des Präparates und vier Bilder aus der Peripherie) nach dem einheitlichen Score mit Punktwerten von 0 bis 3 beurteilt wurden. Aus den Punktzahlen für jede Bewertung wurde anschließend der Durchschnitt ermittelt. Da dies nicht immer mit der Anzahl der Zellmerkmale im Präparat zusammenhing und der Score ausschließlich aus Punktwerten besteht (vgl. Tab. 2 bis Tab. 5), gibt es hier keine Einheit (vgl. Abb. 20 bis Abb. 24). Es wurden jeweils die mit dem gleichen Medikament behandelten Hornhäute in einer Gruppe zusammengefasst. Daraufhin ergaben sich innerhalb der fünf Gruppen bei der Vergleichsserie, der balancierten Kochsalzlösung, sowie bei der antiangiogenen Substanz Avastin® jeweils 10 Proben und bei dem zweiten zu untersuchendem VEGF-Hemmer Lucentis® und dem Kortikosteroid Triamcinolon jeweils 20 Hornhautproben. Daraus resultierte eine Gesamtprobenanzahl von N=70. Die Einwirkdauer aller Medikamente in der Vorderkammer betrug 90 Minuten entsprechend der physiologischen Erneuerung des Kammerwassers in der Vorderkammer.

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden zu jedem Kriterium Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum, sowie die Quartile inklusive Median berechnet (vgl. Anlage Tab. 11 bis Tab. 16). Die grafische Darstellung erfolgte anhand von Boxplots und Histogrammen. Mittels Shapiro-Wilk-Test [101] wurden die jeweiligen Verteilungen der Kriterien auf Normalverteilung geprüft. Bei signifikanter Abweichung erfolgte die weitere statistische Analyse durch nicht-parametrische Verfahren, anderenfalls kamen parametrische Methoden zum Einsatz. Die Medikamente wurden zunächst mit einem Globaltest auf signifikante Unterschiede in den untersuchten Kriterien geprüft. Dies erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse im parametrischen Fall oder sonst mit dem Kruskal-Wallis-Test [101]. Bei signifikantem Globaltest wurden Post-HOC-Vergleiche mittels Shapiro-Wilk-Test bzw. Games-Howell-Verfahren oder U-Test durchgeführt [101].

Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5 % zugrunde gelegt. Eine Alpha-Adjustierung für multiples Testen fand nicht statt, die Ergebnisse haben daher entsprechend explorativen und beschreibenden Charakter. Für die Durchführung der statistischen Berechnungen wurde IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc. An IBM Company, Chicago, IL) eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

3.1.1 Befunde der unbeeinflussten Hornhäute

Die Nullserie stellte mit zehn unbehandelten Hornhautproben die Vergleichsserie der Studie dar. Die Präparate waren durch ein gut erhaltenes Hornhautendothel (vgl. Abb. 10) mit einem größtenteils intakten Mikrovilli-Muster gekennzeichnet. Es lag vereinzelt eine unregelmäßige Verteilung der dennoch in großer Vielzahl erhaltenen Mikrovilli vor, sodass für diese Zellstrukturen ein Punktwert von 2 vergeben wurde. Bei den Zellgrenzen zeigte sich ein intakter Zell-zu-Zell-Verband mit einer leichten Vergröberung der Verzahnung. Auch hier lag die Punktvergabe meist bei 2. Es traten vereinzelt zentrale Unregelmäßigkeiten an der sonst glatten Membranoberfläche auf, weshalb dem Kriterium Zelloberfläche überwiegend ein Punktwert von 2 zugeteilt wurde. In der 500fachen Vergrößerung wirkte der Zellverband homogen und es lagen nur selten Zellpolymorphien und leichte Unterschiede in der Zellgröße vor. Daher wurde bei der Beurteilung des Zellmusters überwiegend die Höchstpunktzahl mit 3 erreicht. Die für die einzelnen Kriterien ermittelten Werte stellten für die Untersuchung die maximal zu erreichende Punktzahl dar, mit welcher alle weiteren Proben verglichen wurden.

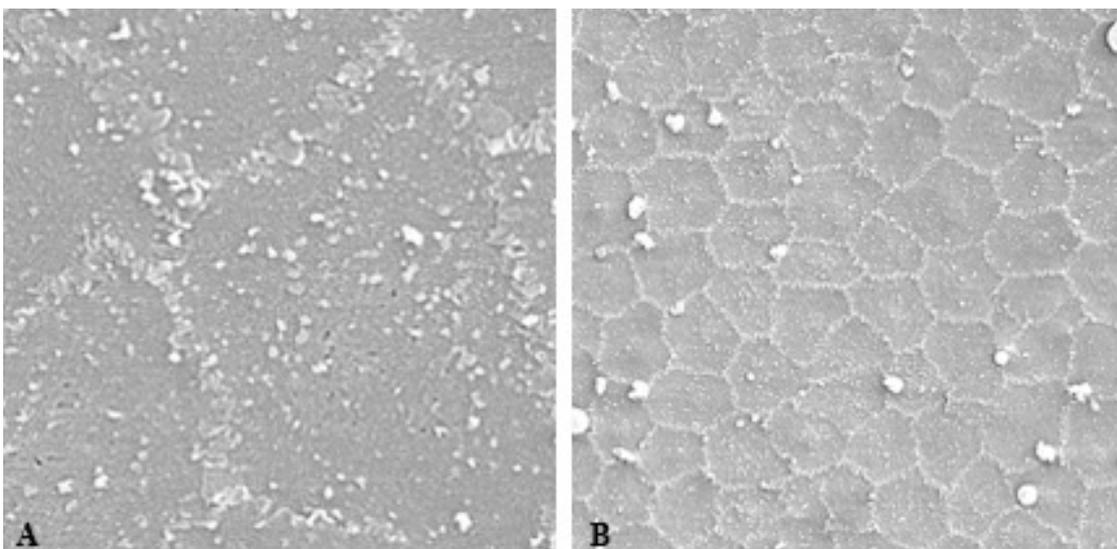


Abb. 10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unbeeinflussten Hornhäute (Nullserie); (A) Detailaufnahme aus der Peripherie (REM 3000fach, Score: Mikrovilli 2, Zellgrenzen 2, Zelloberfläche 2); (B) Übersichtsaufnahmen aus der Präparatmitte (REM 500fach, Score: Zellmuster 3)

3.1.2 Befunde nach Injektion von Balanced Salt Solution in die Vorderkammer

Das Hornhautendothel der mit Balanced-Salt-Solution versetzten Corneae zeigte ebenfalls eine gut erhaltene Ultrastruktur (vgl. Abb. 11). Aufgrund der zahlreichen Mikrovilli mit leichter Variation in Größe und Anzahl innerhalb der Zellen und der im Zentrum der Zellen leicht porösen Beschaffenheit der Zelloberflächen, wurden diese Merkmale, ähnlich der Vergleichsserie, überwiegend mit jeweils 2 Punkten bewertet. Die Zellgrenzen waren meist noch nachvollziehbar, jedoch stark auseinander gewichen und vergrößert, was einem Punktwert von 1 entspricht. Das Zellmuster wies eine homogene Struktur ohne ausgeprägte Form- und Größenunterschiede auf, sodass wie bei den unbehandelten Hornhäuten, meist die maximale Punktzahl vergeben wurde (Score 3). Die Werte der einzelnen Kriterien waren im Vergleich mit der Nullserie annähernd gleich (vgl. Abschn. 3.1.1). Es gab bei keiner der Zellstrukturen wesentliche morphologische Unterschiede im Vergleich zu den unbeeinflussten Hornhäuten.

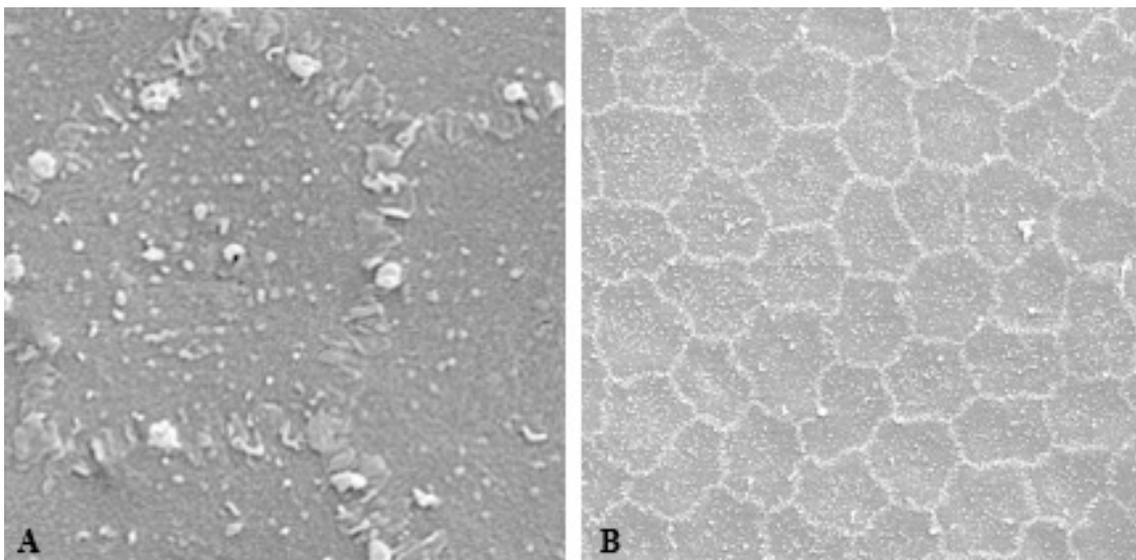


Abb. 11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Hornhäute nach BSS-Injektion; (A) Detailaufnahme aus der Peripherie (REM 3000fach, Score: Mikrovilli 2, Zellgrenzen 1, Zelloberfläche 2); (B) Übersichtsaufnahmen aus der Präparatmitte (REM 500fach, Score: Zellmuster 3)

3.1.3 Befunde nach Injektion von Triamcinolon in die Vorderkammer

Nach der Behandlung des Hornhautendothels mit dem Kortikosteroid kam es überwiegend zu einem Totalverlust der Zellstrukturen (vgl. Abb. 12). Die Mikrovilli waren als Merkmal nicht mehr vorhanden und es zeigten sich aufgerissene Zell-zu-Zellverbindungen mit tiefen

Spaltbildungen zwischen den einzelnen Zellen. Weiterhin fielen an den Oberflächen Zellschwellungen mit Membranrissen und ausgeprägten Endothelzellnekrosen auf. Bei der Betrachtung des Hornhautendothels in 500facher Vergrößerung war die Struktur des Zellmusters kaum noch nachvollziehbar. Bei allen vier zu bewertenden Zellmerkmalen lag der Punktwert meist bei 0 und es wurden nur sehr selten höhere Werte erreicht. Die Gegenüberstellung dieser Befunde und der Werte für unbeeinflusste Hornhäute zeigte bei den mit Triamcinolon behandelten Proben sehr ausgeprägte Strukturverluste, welche mit einer Zerstörung des Hornhautendothels einhergingen und in solcher Form bei den Präparaten der Nullserie und den mit BSS belasteten Hornhäuten nicht auftraten (vgl. Abschn. 3.1.1).

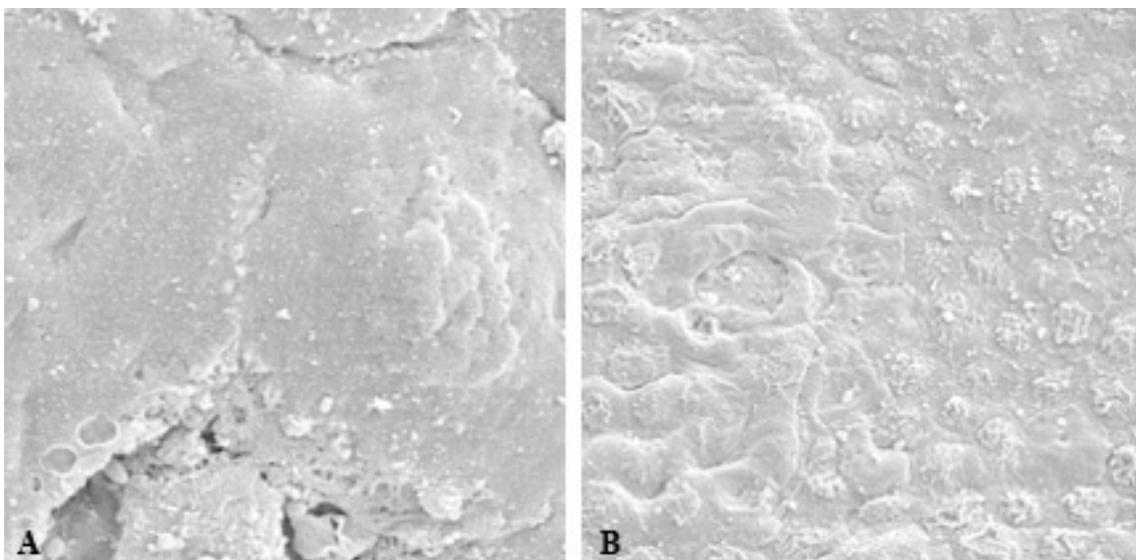


Abb. 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Hornhäute nach Triamcinolon-Injektion; (A) Detailaufnahme aus der Peripherie (REM 3000fach, Score 0-0-0); (B) Übersichtsaufnahmen aus der Präparatmitte (REM 500fach, Score 0)

3.1.4 Befunde nach Injektion von antiangiogenen Substanzen in die Vorderkammer

Lucentis® (Ranibizumab)

Nach der Einwirkung des VEGF-Inhibitors in der Vorderkammer waren die Feinstrukturen des Hornhautendothels gut erhalten (vgl. Abb. 13). Das Bild der Mikrovilli wirkte in den Präparaten größtenteils einheitlich mit stellenweise zentralen Verdichtungen innerhalb der einzelnen Zellen. Da weiterhin die Grenzen eine deutliche Verzahnung mit leichter Auflockerung dieser Interdigitationen sowie fehlende Interzellularspalten aufwiesen und sich an den Zelloberflächen vereinzelte Erhebungen ohne Zellödem oder Zellschrumpfungen zeigten,

ergab sich für alle drei Kriterien bei der Bewertung ein Punktwert von 2. Das Zellmuster war insgesamt gleichmäßig angeordnet mit vereinzelt vergrößerten Endothelzellen und Variationen in der Zellform, sodass auch bei diesem Merkmal nach dem Einzel-Score 2 Punkte vergeben wurden. Die Bewertung der Einzelkriterien nach Lucentis®-Injektion lag in einem ähnlichen Bereich wie die Beurteilung der Vergleichsserie (vgl. Abschn. 3.1.1).

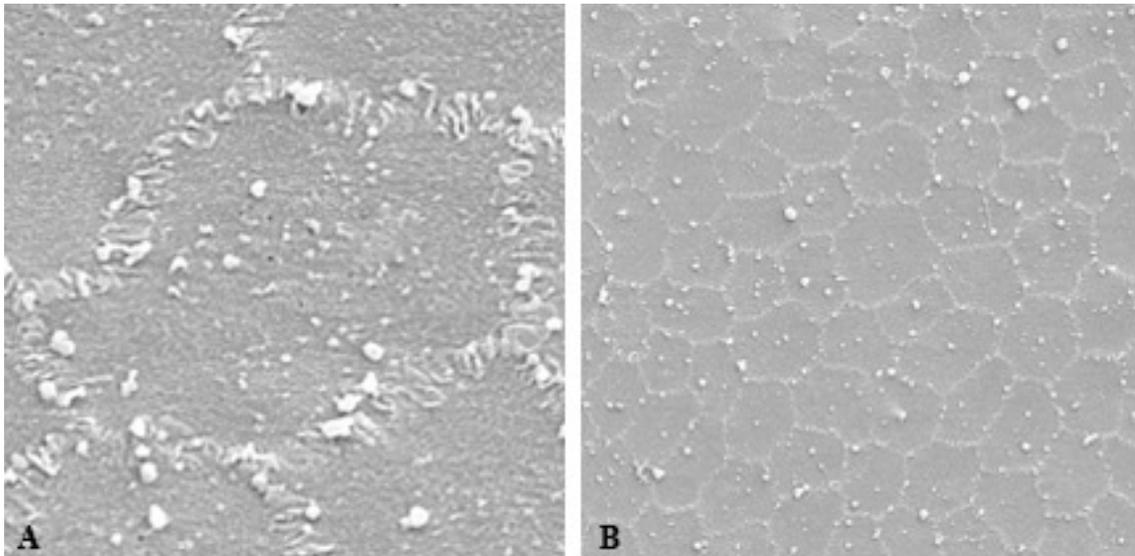


Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Hornhäute nach der Injektion von Ranibizumab (Lucentis®); (A) Detailaufnahme aus der Peripherie (REM 3000fach, Score 2-2-2); (B) Übersichtsaufnahmen aus der Hornhautperipherie (REM 500fach, Score 2)

Avastin® (Bevacizumab)

Die morphologischen Endothelzell-Befunde der mit Avastin konfrontierten Hornhautproben waren der vorherigen Untersuchungsgruppe sehr ähnlich (vgl. Abb. 14). Die Mikrovilli waren in den Zellen sehr zahlreich erhalten, wiesen jedoch vermehrt unregelmäßige Verteilungen auf, sodass bei der Beurteilung überwiegend die Punktzahl 2 vergeben wurde. Es zeigten sich Zellgrenzen von relativ plumper Gestalt, bei denen die ehemals gut ausgeprägte Verzahnung teilweise nur noch grob nachvollziehbar war. Da jedoch keine Interzellularspalten auftraten, lag der Punktwert nach dem Einzel-Score größtenteils bei 1. Das Stroma der Endothelzellen war bei sonst ebener Zelloberfläche in der Mitte der Zellen leicht aufgeworfen und in der 500fachen Vergrößerung zeigte sich ein homogenes Zellmuster mit leichten Veränderungen Form und Größe. Beide Kriterien wurden überwiegend mit jeweils 2 Punkten bewertet. Auch hier wichen die Werte der vier beurteilten Kriterien nur gering von denen der Nullserie ab (vgl. Abschn. 3.1.1).

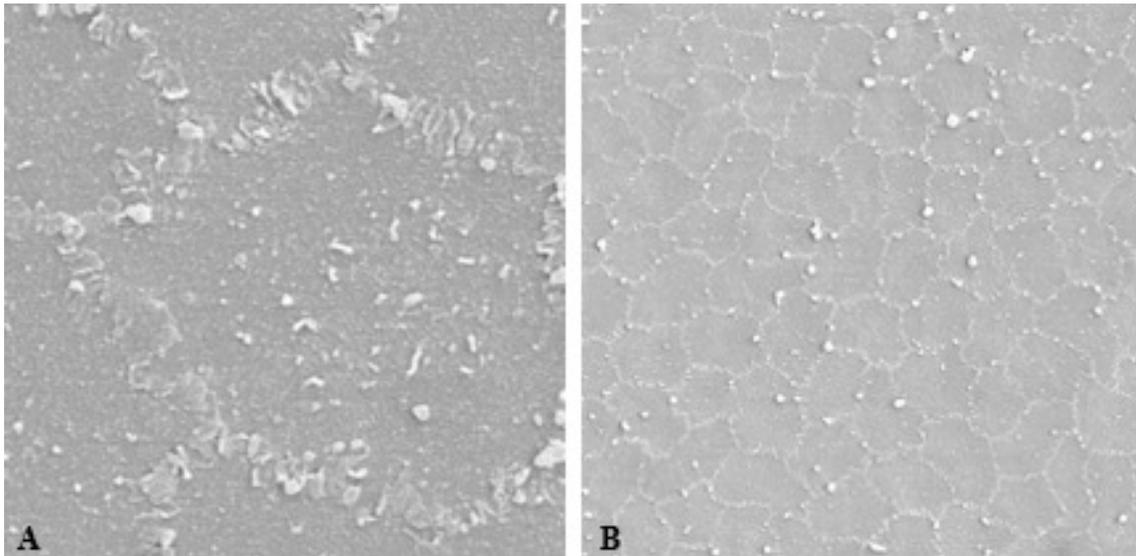


Abb. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Hornhäute nach der Injektion von Bevacizumab (Avastin®); (A) Detailaufnahme aus der Peripherie (REM 3000fach, Score 2-1-2); (B) Übersichtsaufnahmen aus der Hornhautperipherie (REM 500fach, Score 2)

3.1.5 Atypische Befunde der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

In den rasterelektronenmikroskopischen Bildern fanden sich teilweise amorphe Auflagerungen (vgl. Abb. 15). Diese stehen jedoch nicht im Zusammenhang mit der Injektion der einzelnen Medikamente, da sie auch bei den unbehandelten Hornhäuten der Nullserie auftraten. Sie sind vermutlich im Rahmen der Präparation und Eingabe in das Fixiermedium entstanden und wurden daher bei der Auswertung der Befunde nicht in die Wertung einbezogen.

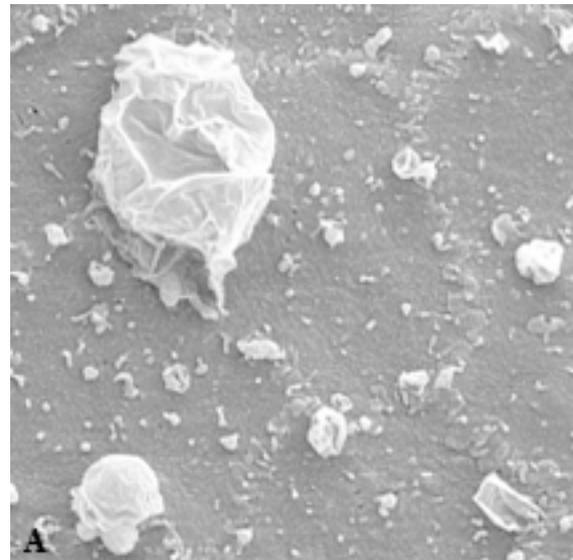


Abb. 15: Detailaufnahme aus der Präparatmitte eine unbeeinflussten Hornhautprobe mit amorphen Auflagerungen (REM 3000fach, Score 2-1-2)

3.2 Vergleich der einzelnen Kriterien

3.2.1 Mikrovilli

Im Medikamentenvergleich (vgl. Abb. 16) waren die Mikrovilli bei der balancierten Kochsalzlösung bei unregelmäßiger Verteilung und Größenunterschieden gut erhalten. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den VEGF-Hemmern Lucentis® und Avastin®. Trotz der leichten Form- und Größenvarianz stellte sich ein intaktes Mikrovilli-Muster dar. Bei den mit Triamcinolon belasteten Proben fehlte dieses Zellmerkmal vollständig.

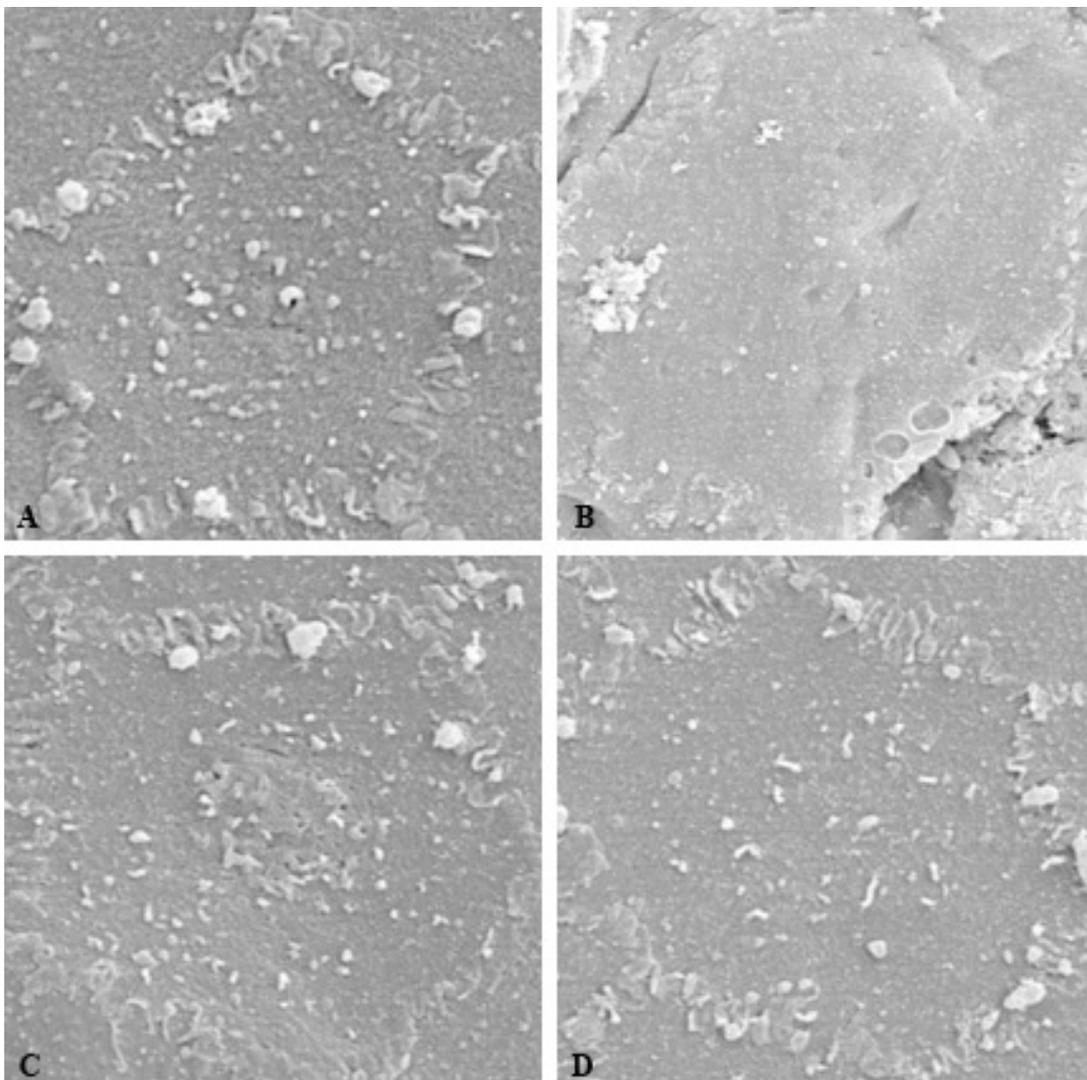


Abb. 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen im Vergleich der Medikamente miteinander nach dem Kriterium Mikrovilli; (A) Balanced-Salt-Solution: (REM 3000fach, Score 2); (B) Triamcinolon (REM 3000fach, Score 0); (C) Ranibizumab (Lucentis®) (REM 3000fach, Score 2); (D) Bevacizumab (Avastin®) (REM 3000fach, Score 2)

3.2.2 Zellgrenzen

Bei der Gegenüberstellung der Substanzen hinsichtlich der Erhaltung der Zellgrenzen (vgl. Abb. 17) zeigte die antiangiogene Substanz Ranibizumab meist die besten Ergebnisse. Hier wirkten die Zell-zu-Zellverbände homogen und es fanden sich nur geringfügige Auflockerungen der Verzahnungen. Bei der Eingabe von Balanced-Salt-Solution und Bevacizumab in die Vorderkammer waren die Zellgrenzen zwar zunehmend gröber, jedoch insgesamt intakt. Anders verhielt es sich bei dem Kortikosteroid. Die Zellgrenzen waren überwiegend aufgelöst und es hatten sich zwischen den Zellen tiefe Spalten ausgebildet.

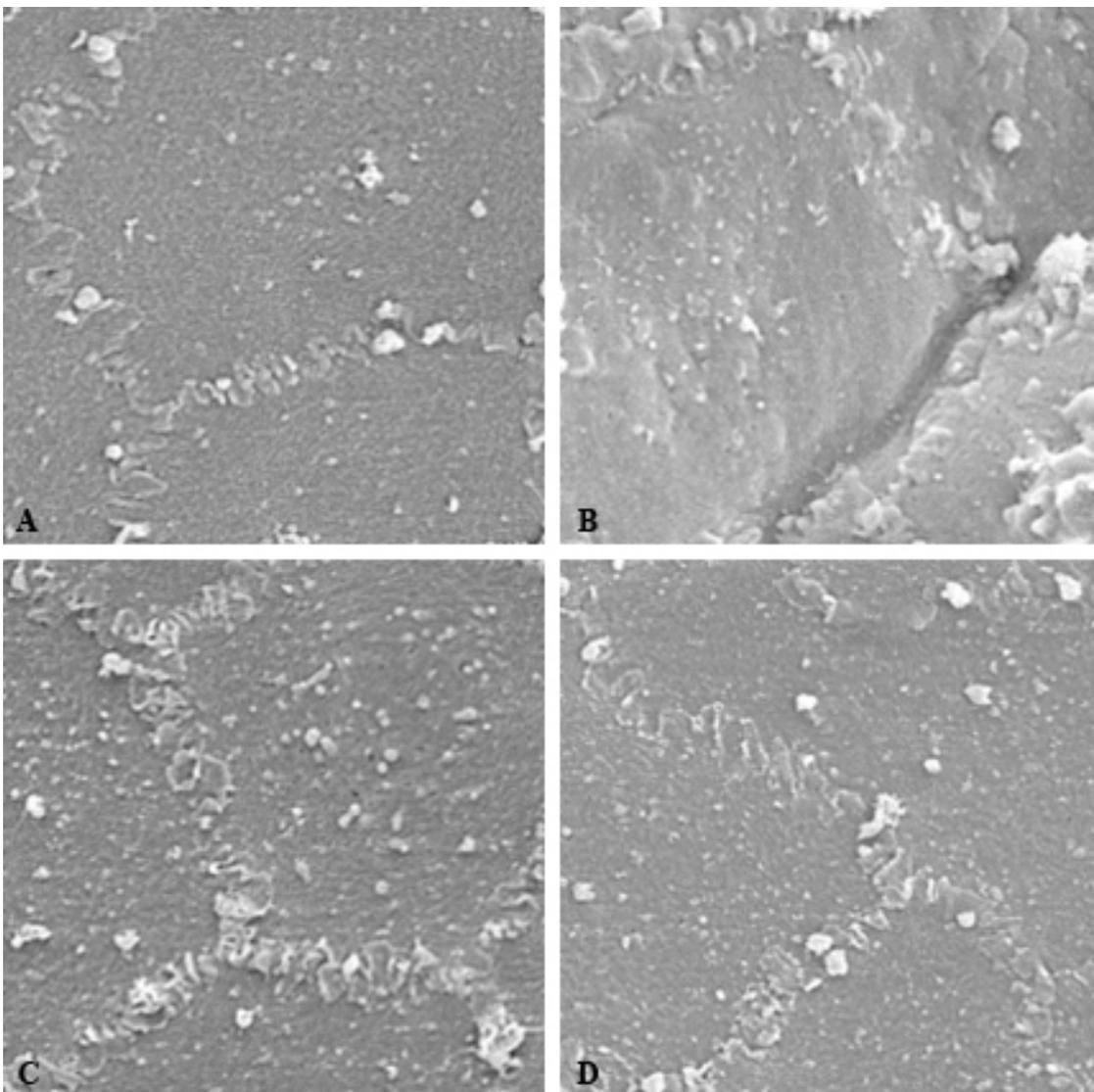


Abb. 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen im Vergleich der Medikamente miteinander nach dem Kriterium Zellgrenzen; (A) Balanced-Salt-Solution (REM 3000fach, Score 1); (B) Triamcinolon (REM 3000fach, Score 0); (C) Ranibizumab (Lucentis®) (REM 3000fach, Score 2); (D) Bevacizumab (Avastin®) (REM 3000fach, Score 1)

3.2.3 Zelloberfläche

Die Beschaffenheit der Zelloberfläche (vgl. Abb. 18) war bei den VEGF-Inhibitoren und bei BSS überwiegend einheitlich. Die meisten Endothelzellen wiesen im Versuch mit balancierter Kochsalzlösung, Lucentis® und Avastin® größtenteils eine glatte Oberfläche mit geringfügigen Veränderungen in der Zellmitte ohne Anzeichen für Zellschwellungen oder Membranrisse auf. Bei den Hornhäuten, welche mit Triamcinolon konfrontiert wurden, traten hingegen Zellödeme und ausgeprägte Nekrosen der Endothelzellen auf.

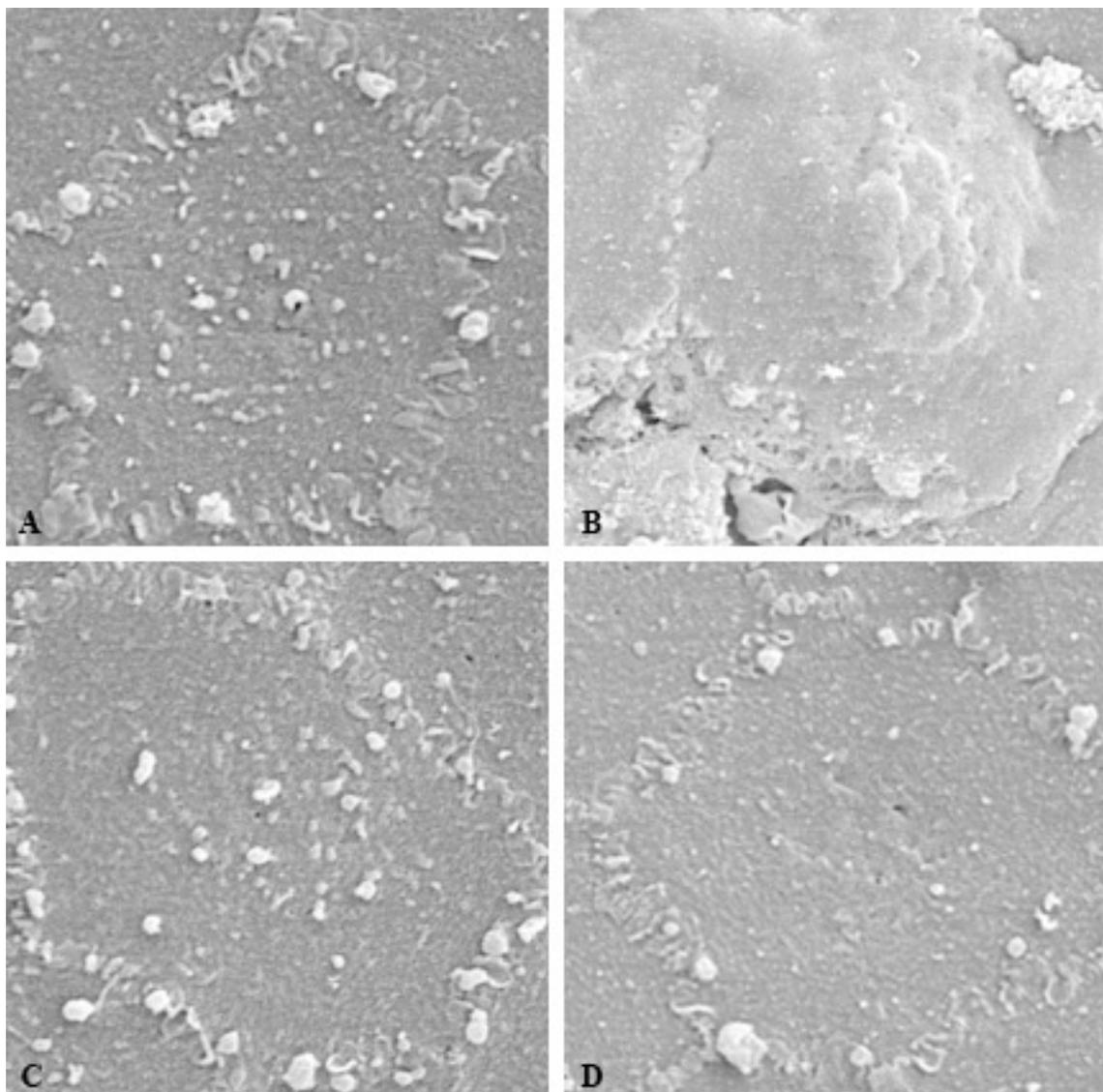


Abb. 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen im Vergleich der Medikamente miteinander nach dem Kriterium Zelloberfläche; (A) Balanced-Salt-Solution (REM 3000fach, Score 2); (B) Triamcinolon (REM 3000fach, Score 0); (C) Ranibizumab (Lucentis®) (REM 3000fach, Score 2); (D) Bevacizumab (Avastin®) (REM 3000fach, Score 2)

3.2.4 Zellmuster

In den 500fach vergrößerten Aufnahmen wurden bei den Zellmustern der Hornhäute nach Eingabe von Balanced-Salt-Solution in die Vorderkammer die besten Ergebnisse beobachtet (vgl. Abb. 19). Die homogene Struktur der Zellen war meist gut erkennbar und die hexagonale Gestalt der Zellen nachvollziehbar. Nach der Injektion von Ranibizumab und Bevacizumab wiesen auch diese Zellen ein einheitliches Muster mit geringen Veränderungen in Form und Größe der Zellen auf. Nach dem Einsatz von Triamcinolon jedoch war der Zellverband nicht mehr erhalten und es waren kaum noch zelluläre Strukturen erkennbar.

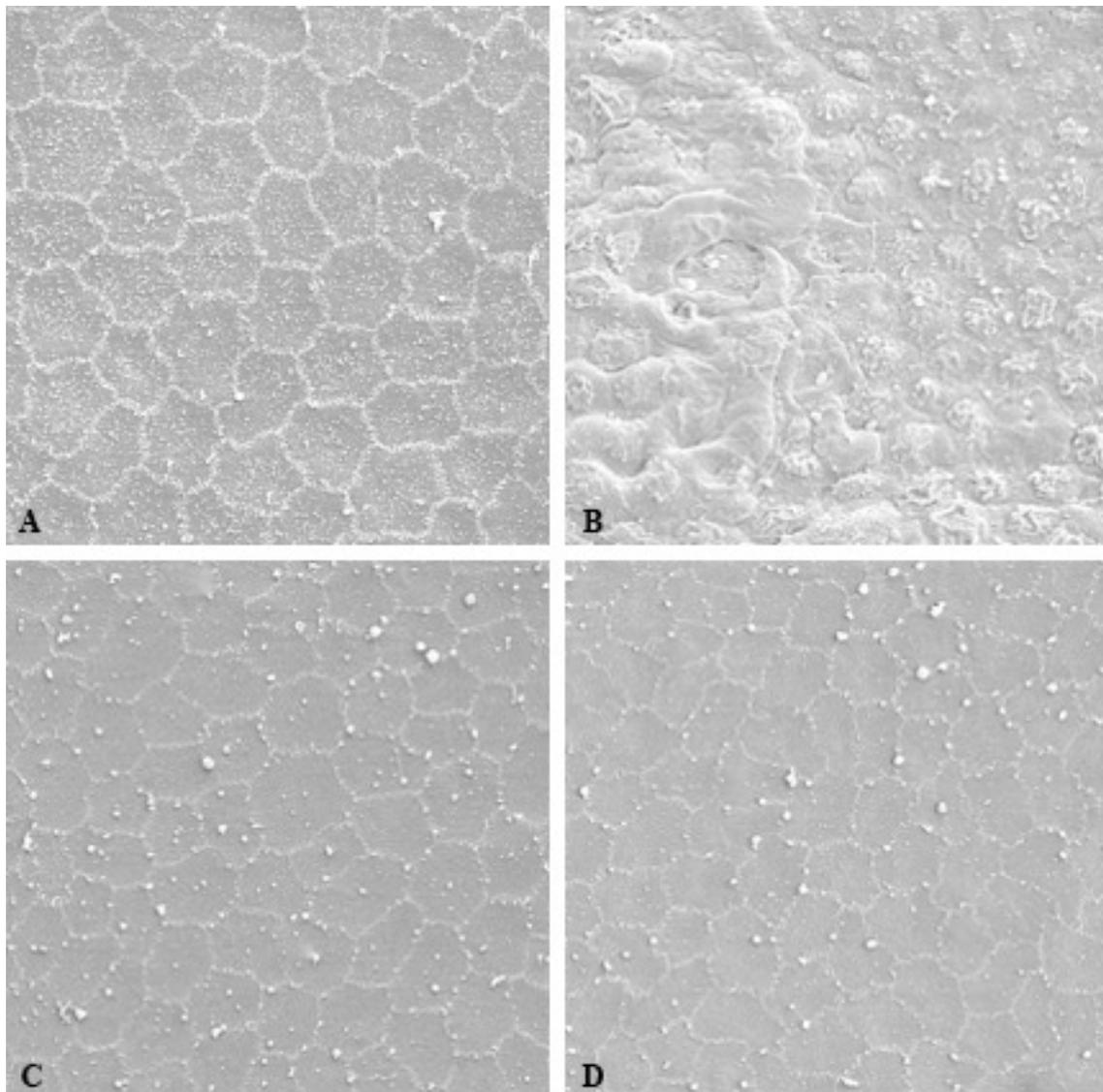


Abb. 19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen im Vergleich der Medikamente miteinander nach dem Kriterium Zellmuster; (A) Balanced-Salt-Solution (REM 500fach, Score 3); (B) Triamcinolon (REM 500fach, Score 0); (C) Ranibizumab (Lucentis®) (REM 500fach, Score 2); (D) Bevacizumab (Avastin®) (REM 500fach, Score 2)

3.3 Statistische Vergleiche der Resultate für die einzelnen Kriterien

3.3.1 Mikrovilli

Hinsichtlich der Bewertung der Mikrovilli im Durchschnitt konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den fünf Gruppen nachgewiesen werden (Varianzanalyse ($p < 0,001$)) (vgl. Tab. 6). Dies wird auch durch die Verteilung der Mikrovilli im Durchschnitt in Abhängigkeit von dem injizierten Medikament veranschaulicht (vgl. Abb. 20). Die sich anschließenden multiplen Paarvergleiche zeigten, dass der Durchschnitt der Mikrovilli bei Triamcinolon signifikant niedriger war gegenüber allen übrigen Behandlungen (Paarvergleich nach Games-Howell, $p < 0,05$) (vgl. Tab. 6). Zwischen den anderen Medikamentengruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($p > 0,05$) (vgl. Tab. 6).

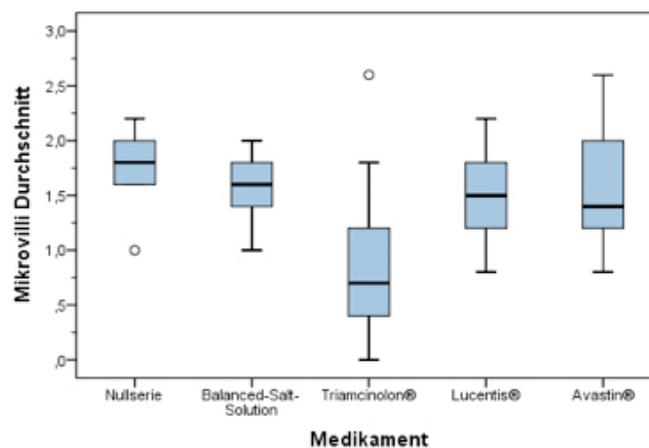


Abb. 20: Verteilung der Mikrovilli im Durchschnitt in Abhängigkeit von der Medikation

Tab. 6: Statistischer Vergleich der Medikamente hinsichtlich der Bewertung der Mikrovilli im Durchschnitt

Mikrovilli	Test	Signifikanz (p-Wert)
Globaler Vergleich	ANOVA	$p < 0,001$
Paarvergleich Nullserie /BSS	Games-Howell	$p = 0,862$
Paarvergleich Nullserie/Triamcinolon	Games-Howell	$p < 0,001$
Paarvergleich Nullserie/Lucentis[®]	Games-Howell	$p = 0,473$
Paarvergleich Nullserie/Avastin[®]	Games-Howell	$p = 0,983$
Paarvergleich BSS/Triamcinolon	Games-Howell	$p = 0,001$
Paarvergleich BSS/Lucentis[®]	Games-Howell	$p = 0,961$
Paarvergleich BSS/Avastin[®]	Games-Howell	$p > 0,999$
Paarvergleich Triamcinolon/Lucentis[®]	Games-Howell	$p = 0,003$
Paarvergleich Triamcinolon/Avastin[®]	Games-Howell	$p = 0,036$
Paarvergleich Lucentis[®] /Avastin[®]	Games-Howell	$p = 0,987$

3.3.2 Zellgrenzen

Die verabreichten Medikamente unterschieden sich ebenfalls signifikant bezüglich der Durchschnitts bei der Bewertung der Zellgrenzen (Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,001$) (vgl. Tab. 7). Die Vergleiche der einzelnen Medikamentengruppen untereinander zeigten wieder signifikant niedrigere Durchschnitte in der Triamcinolon-Gruppe gegenüber den anderen Behandlungen (U-Test, $p < 0,05$) (vgl. Tab. 7). Auch hier lassen sich die beobachteten Unterschiede zwischen den übrigen Medikamenten nicht als signifikant nachweisen ($p > 0,05$). Die folgende Abbildung veranschaulicht die Bewertung der Zellgrenzen in den einzelnen Medikamentengruppen im Durchschnitt (vgl. Abb. 21).

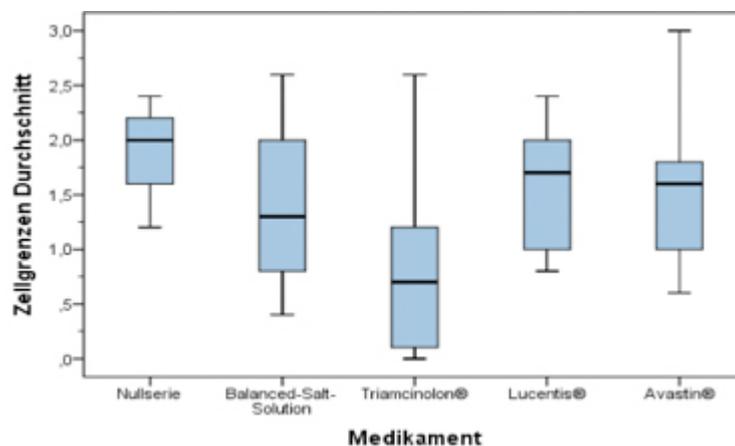


Abb. 21: Verteilung der Zellgrenzen im Durchschnitt in Abhängigkeit von der Medikation

Tab. 7: Statistischer Vergleich der Medikamente hinsichtlich der Bewertung der Zellgrenzen im Durchschnitt

Zellgrenzen	Test	Signifikanz (p-Wert)
Globaler Vergleich	Kruskal-Wallis-Test	$p = 0,001$
Paarvergleich Nullserie/BSS	U-Test	$p = 0,123$
Paarvergleich Nullserie/Triamcinolon	U-Test	$p < 0,001$
Paarvergleich Nullserie/Lucentis [®]	U-Test	$p = 0,082$
Paarvergleich Nullserie/Avastin [®]	U-Test	$p = 0,165$
Paarvergleich BSS/Triamcinolon	U-Test	$p = 0,031$
Paarvergleich BSS/Lucentis [®]	U-Test	$p = 0,779$
Paarvergleich BSS/Avastin [®]	U-Test	$p = 0,631$
Paarvergleich Triamcinolon/Lucentis [®]	U-Test	$p = 0,002$
Paarvergleich Triamcinolon/Avastin [®]	U-Test	$p = 0,006$
Paarvergleich Lucentis [®] /Avastin [®]	U-Test	$p = 0,914$

3.3.3 Zelloberfläche

Auch hinsichtlich der Zelloberfläche wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt. Wieder zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den fünf Medikamenten bezüglich der durchschnittlichen Bewertung der Zelloberfläche (Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,001$) (vgl. Tab. 8). Es war deutlich erkennbar, dass die Triamcinolonbehandlung auch bezüglich der Zelloberfläche die niedrigsten Werte hervorbringt (vgl. Abb. 22). Erneut zeigte sich im Paarvergleich der Medikamente untereinander, dass sich Triamcinolon signifikant von allen übrigen Medikamenten unterscheidet (U-Test, $p < 0,001$) (vgl. Tab. 8). Wieder sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den übrigen Gruppen nachweisbar ($p > 0,05$) (vgl. Tab. 8).

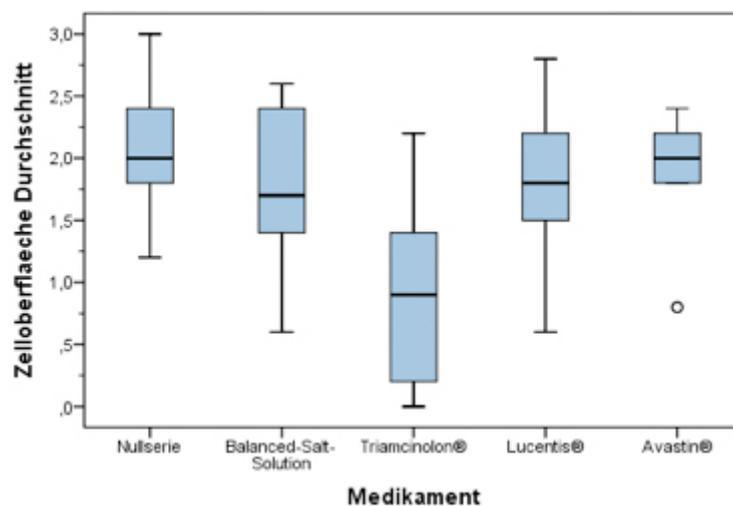


Abb. 22: Verteilung der Zelloberfläche im Durchschnitt in Abhängigkeit von der Medikation

Tab. 8: Statistischer Vergleich der Medikamente hinsichtlich der Bewertung der Zelloberfläche im Durchschnitt

Zelloberfläche	Test	Signifikanz (p-Wert)
Globaler Vergleich	Kruskal-Wallis-Test	$p < 0,001$
Paarvergleich Nullserie/BSS	U-Test	$p = 0,353$
Paarvergleich Nullserie/Triamcinolon	U-Test	$p < 0,001$
Paarvergleich Nullserie/Lucentis [®]	U-Test	$p = 0,248$
Paarvergleich Nullserie/Avastin [®]	U-Test	$p = 0,436$
Paarvergleich BSS/Triamcinolon	U-Test	$p = 0,003$
Paarvergleich BSS/Lucentis [®]	U-Test	$p = 0,846$
Paarvergleich BSS/Avastin [®]	U-Test	$p = 0,912$
Paarvergleich Triamcinolon/Lucentis [®]	U-Test	$p < 0,001$
Paarvergleich Triamcinolon/Avastin [®]	U-Test	$p = 0,004$
Paarvergleich Lucentis [®] /Avastin [®]	U-Test	$p = 0,619$

3.3.4 Zellmuster

Die Bewertung des Zellmusters verhielt sich ähnlich wie die vorangegangenen Zellkriterien. Es zeigte sich zunächst ein Unterschied global zwischen allen Medikamentengruppen (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,001$) (vgl. Tab. 9) und auch die Post-HOC-Paarvergleiche brachten hervor, dass die Behandlung der Hornhäute mit Triamcinolon signifikant niedrigere durchschnittliche Punktzahlen bei der Bewertung des Zellmusters erreichten als die übrigen hier untersuchten Medikamente (U-Test, $p < 0,001$) (vgl. Tab. 9 und Abb. 23). Die Vergleiche der übrigen Medikamenten erwiesen sich wiederum als nicht signifikant ($p > 0,05$) (vgl. Tab. 9).

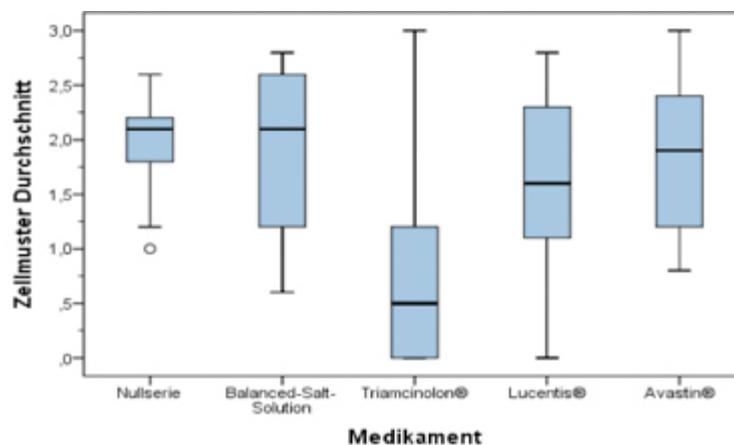


Abb. 23: Verteilung des Zellmusters im Durchschnitt in Abhängigkeit von der Medikation

Tab. 9: Statistischer Vergleich der Medikamente hinsichtlich der Bewertung des Zellmusters im Durchschnitt

Zellmuster	Test	Signifikanz (p-Wert)
Globaler Vergleich	Kruskal-Wallis-Test	$p = 0,001$
Paarvergleich Nullserie/BSS	U-Test	$p = 0,796$
Paarvergleich Nullserie/Triamcinolon	U-Test	$p < 0,001$
Paarvergleich Nullserie/Lucentis [®]	U-Test	$p = 0,267$
Paarvergleich Nullserie/Avastin [®]	U-Test	$p = 0,631$
Paarvergleich BSS/Triamcinolon	U-Test	$p = 0,002$
Paarvergleich BSS/Lucentis [®]	U-Test	$p = 0,267$
Paarvergleich BSS/Avastin [®]	U-Test	$p = 0,684$
Paarvergleich Triamcinolon/Lucentis [®]	U-Test	$p = 0,004$
Paarvergleich Triamcinolon/Avastin [®]	U-Test	$p = 0,002$
Paarvergleich Lucentis [®] /Avastin [®]	U-Test	$p = 0,475$

3.3.5 Synopsis der Einzelkriterien

Der Vergleich der Behandlungen des Gesamtdurchschnitts der Zellkriterien brachte ebenfalls einen signifikanten Unterschied, sowohl global (Varianzanalyse, $p < 0,001$) als auch in den anschließenden Paarvergleichen hervor (vgl. Tab. 10). Triamcinolon verursachte signifikant niedrigere Gesamtdurchschnitte in der Bewertung der Zellkriterien als alle anderen hier untersuchten Medikamente (Scheffé-Test, $p < 0,001$), welche sich untereinander wieder nicht signifikant unterscheiden ($p > 0,05$) (vgl. Tab. 10 und Abb. 24).

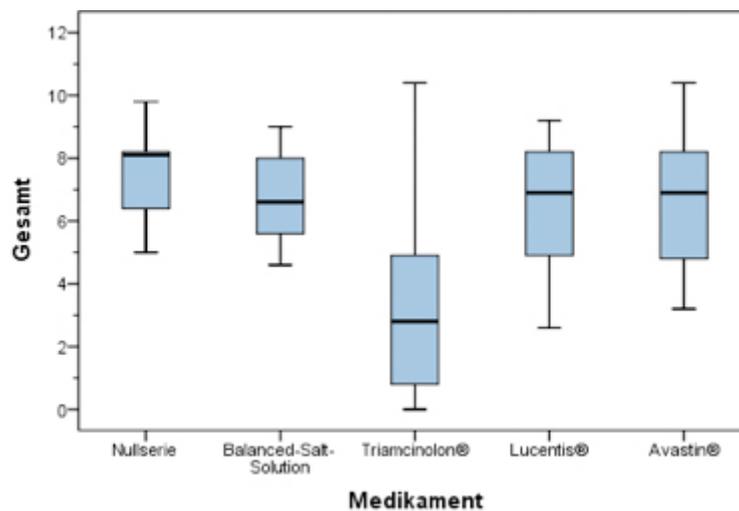


Abb. 24: Verteilung der Auswertung aller Kriterien des Hornhautendothels im Durchschnitt in Abhängigkeit von der Medikation

Tab. 10: Statistischer Vergleich der Medikamente hinsichtlich der Bewertung aller Kriterien im Durchschnitt

Gesamt	Test	Signifikanz (p-Wert)
Globaler Vergleich	ANOVA	$p < 0,001$
Paarvergleich Nullserie/BSS	Scheffé-Prozedur	$p = 0,930$
Paarvergleich Nullserie/Triamcinolon	Scheffé-Prozedur	$p < 0,001$
Paarvergleich Nullserie/Lucentis [®]	Scheffé-Prozedur	$p = 0,692$
Paarvergleich Nullserie/Avastin [®]	Scheffé-Prozedur	$p = 0,953$
Paarvergleich BSS/Triamcinolon	Scheffé-Prozedur	$p = 0,005$
Paarvergleich BSS/Lucentis [®]	Scheffé-Prozedur	$p = 0,996$
Paarvergleich BSS/Avastin [®]	Scheffé-Prozedur	$p > 0,999$
Paarvergleich Triamcinolon/Lucentis [®]	Scheffé-Prozedur	$p = 0,002$
Paarvergleich Triamcinolon/Avastin [®]	Scheffé-Prozedur	$p = 0,004$
Paarvergleich Lucentis [®] /Avastin [®]	Scheffé-Prozedur	$p = 0,990$

3.3.6 Einwirkdauer der Medikamente

Die Einwirkzeit war mit einer Dauer von ca. 90 Minuten bei allen Medikamentengruppen nahezu gleich und wich bei den einzelnen Proben nur geringfügig von diesem Wert ab (vgl. Abb. 25). Bei der Beurteilung des Einflusses der Einwirkdauer einer Substanz auf das Hornhautendothel konnte daher von einer konstanten Größe bei allen Präparaten ausgegangen werden. Ausgenommen von dieser Untersuchung war die Nullserie, da diese als Vergleichsserie diente und hier keine Injektion in die Vorderkammer erfolgt war.

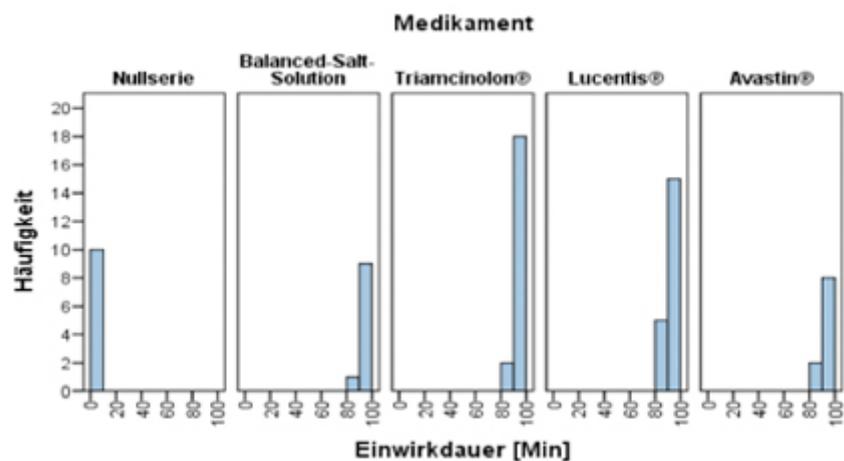


Abb. 25: Häufigkeitsverteilung der Einwirkdauer der untersuchten Präparate

4 Diskussion

4.1 Methodenkritische Bewertung

4.1.1 Eignung des Schweineauges als Versuchsmodell

Im Rahmen von experimentellen Untersuchungen des Hornhautendothels ist das Schweineauge als Versuchsmodell etabliert. Dies ist meist durch die Ähnlichkeit zu humanen Hornhäuten bezüglich histologischer und physiologischer Eigenschaften begründet. Zum einen ist das Stroma sowohl bei der menschlichen als auch bei der porkinen Hornhaut größtenteils aus dem Strukturprotein Kollagen Typ I aufgebaut [56]. Zum anderen weist die innerste Hornhautschicht von Schweinen eine vergleichbare Fähigkeit der Regeneration auf wie das Endothel der menschlichen Cornea. Auch hier finden sich nur einzelne Mitosen [25]. Weiterhin durchläuft das Schweineauge eine ähnliche embryologische Entwicklung wie das humane Auge. Für die Verwendung von Schweineaugen als Versuchsmodell liegt außerdem, aufgrund der regelmäßig durchgeführten Schlachtungen, eine hohe und preiswerte Verfügbarkeit an Untersuchungsobjekten vor.

Es gibt jedoch auch Unterschiede zwischen dem eingesetzten Untersuchungsmodell und der Hornhaut des Menschen, welche bei der Versuchsdurchführung und der Übertragung der Versuchsergebnisse auf humane Corneae zu berücksichtigen sind. Die Hornhaut der Schweine weist einen größeren Hornhautdurchmesser auf (horizontal 14,09-16,61 mm, vertikal 12,04-14,00 mm) als menschliche Hornhäute (horizontaler Durchmesser 11,5 mm, vertikaler Durchmesser 10,5 mm) [29]. Beim Einsatz des in der Hornhautbank üblichen Treplans mit 15 mm Durchmesser resultierte daher nur ein schmaler Sklerasaum. Weiterhin ist die porkine Hornhaut mit 877,6-1013 μm [56] nahezu doppelt so dick wie die des Menschen (520 μm), weshalb bei der Trepanation vermutlich ein etwas höherer Druck auf die Hornhaut für die Durchtrennung dieser notwendig war, als bei humanem Gewebe. Dies könnte infolge des vermehrten Zuges auf das Endothel eine zusätzliche Belastung für diese Zellschicht zur Folge haben. Das Fehlen der Bowmann-Lamelle beim Schwein [56] stellt zwar einen weiteren Unterschied in der Morphologie dar, war jedoch für die Untersuchung des Hornhautendothels in dieser Studie nicht bedeutsam.

Insgesamt stellt das Schweineauge aufgrund seiner anatomischen und biologischen Nähe zum menschlichen Auge ein geeignetes Versuchsobjekt dar.

4.1.2 Bewertung des Versuchsaufbaus

Einen wesentlichen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Proben hatte die einheitliche Vorgehensweise der Injektion. Hier war es wichtig, nach der Parazentese die Injektionskanüle um 180° zu drehen, um im Injektionsbereich einen direkten Kontakt des Endothels mit höheren Medikamentenkonzentrationen zu vermeiden und an allen Arealen des Hornhautendothels eine annähernd gleichhohe Ausgangskonzentration der Substanzen zu ermöglichen.

Jede Versuchsreihe beinhaltete 10 Proben. Bei guter Verfügbarkeit von Triamcinolon und Bevacizumab wurden die Serien wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu prüfen. Die Anzahl der Proben betrug daher für diese beiden Substanzen insgesamt $N = 20$. Dies fand bei der statistischen Auswertung Berücksichtigung.

Um ein Voranschreiten postmortaler und lagerungsbedingter Veränderungen zu reduzieren [121] wurden die Schweinebulbi in dem Zeitraum von der Eukleation bis zur Injektion der Testsubstanzen in einer Kühlbox bei +4 °C aufbewahrt. Die Lagerung der Proben erfolgte für 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur, da so eine Schädigung der endothelialen Strukturen in der Einwirkzeit verringert werden kann [121].

Da während der Präparation die Hornhautscheiben zur Entfernung makroskopisch sichtbarer Anheftungen von Irispigmentpartikeln an der Endothelseite mit 0,9 % Natrium-Chlorid-Lösung gespült wurden, konnten durch den Spülvorgang Schmutzpartikel auf das Hornhautendothel gelangen, welche in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen als amorphe Auflagerungen imponierten. Jedoch erfolgten die Versuche ausschließlich unter gleichen Bedingungen und es fanden sich an allen Präparaten diese Verunreinigungen. Darüber hinaus wiesen die Endothelbereiche mit diesen Auflagerungen keine wesentlichen morphologischen Veränderungen auf, sodass sie für die Beurteilung der Präparate nach den vorgegebenen Kriterien keine Relevanz hatten.

Auch im Rahmen des Fixier- und Trocknungsverfahrens für die Rasterelektronenmikroskopie können morphologische Veränderungen des Hornhautendothels auftreten. In einigen Studien wurden unter der Fixation mit Glutaraldehyd [123] und bei der kritischen Punkttrocknung [130] Schrumpfungen im Zelldurchmesser beschrieben. Diese Veränderungen können die Beurteilung der Präparate ebenfalls beeinflussen, was jedoch als systematischer Fehler für alle Präparate gilt.

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie ist es möglich, eine große Fläche des Hornhautendothels zu erfassen und dabei Zellstrukturen wie Mikrovilli, Zellgrenzen, Zelloberflächen und Regularität des Zellmusters zu beurteilen. Es können Aussagen über morphologische Veränderungen durch toxische oder mechanische Einwirkungen getroffen werden. Jedoch können aufgrund der Art der Aufbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie keine Veränderungen im weiteren Verlauf wie Zellregenerationen oder die Zunahme von Schäden dargestellt werden, da durch die Einbringung in das Fixiermedium die Präparate einen irreversiblen Zustand erreichen und die rasterelektronenmikroskopischen Bilder somit Momentaufnahmen darstellen.

4.2 Interpretation der rasterelektronenmikroskopischen Befunde

Anliegen dieser Arbeit war es, den Einfluss von antiangiogenen Substanzen wie Ranibizumab und Bevacizumab auf die sensibelste Schicht der Hornhaut, das Endothel, nach deren Eingabe in die Vorderkammer mit Hilfe rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen zu untersuchen. Hierbei wurden neben der Referenzgruppe (Hornhäuten ohne Injektion) auch die häufig intraoperativ in der Vorderkammer eingesetzte Spüllösung Balanced Salt Solution und das in der Regel meist in den Glaskörper injizierte Steroid Triamcinolon zur Gegenüberstellung mit den VEGF-Inhibitoren herangezogen. Die Gesamtpunktzahl der Nullserie definierte den Maximalwert für den Vergleich mit den anderen Substanzen. Höhere Werte konnten auch in diesen Proben nicht vergeben werden, da hier postmortale, präparations-, fixier- und trocknungsbedingte Veränderungen der Ultrastrukturen meist nicht die Höchstpunktzahl „12“ zuließen [123, 130].

Bei der Gegenüberstellung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder der Referenzgruppe mit den Aufnahmen der mit Medikamenten versetzten Hornhäute zeigte sich, dass das Endothel der Proben nach dem Einsatz von Balanced Salt Solution und den antiangiogenen Substanzen in ihrer Morphologie vergleichbare Befunde wie die Präparate der Nullserie aufwies. Die Mikrovilli der Gruppen von Avastin® und Lucentis® waren, wie auch bei BSS und den unbehandelten Corneae, noch zahlreich erhalten und wiesen allenfalls eine unregelmäßige Verteilung oder eine leichte Variation in der Größe auf. Es wurde meist ein Punktwert von „2“ vergeben. Auch die Zelloberflächen der mit den VEGF-Inhibitoren behandelten Präparate zeigten ein ähnliches Bild wie die der Vergleichsserie und der Spüllösung. Mit Ausnahme von geringen zentralen Veränderungen fanden sich überwiegend

glatte Membranoberflächen ohne Zellödem oder ausgeprägte Zellschrumpfungsercheinungen. Die Proben konnten hier häufig ebenfalls mit 2 Punkten bewertet werden. Bei der Beurteilung der Zellgrenzen zeigten sich leichte Unterschiede. Hierbei waren die Interdigitationen auf den rasterelektronenmikroskopischen Bildern der Nullserie und Ranibizumab nur leicht aufgelockert und bei den Proben mit Balanced Salt Solution und Avastin® etwas ausgeprägter vergrößert. Folglich wurden für die unbehandelten Hornhautendothelien und die mit Lucentis® behandelten Präparate 2 Punkte und für die Proben mit Balanced Salt Solution und Bevacizumab 1 Punktwert vergeben. Jedoch waren auch bei den zuletzt aufgeführten Bildern die Grenzen noch gut erhalten. Bei 500facher Vergrößerung wurde in den vier verschiedenen Versuchsreihen meist ein homogenes Zellmuster nachgewiesen, wobei die Proben der Nullserie und der balancierten Kochsalzlösung weniger Polymorphien und Variationen in der Zellgröße aufzeigten als die Hornhautendothelien der beiden antiangiogenen Substanzen. Es konnte bei der Vergleichsgruppe und der Spüllösung oft die Maximalpunktzahl erreicht werden. Die Präparate der VEGF-Inhibitoren wurden mit 2 Punkten bewertet. Insgesamt waren in den meisten Proben von Lucentis® und Avastin® die Ultrastrukturen gut erhalten und morphologisch mit den Aufnahmen der Nullserie und Balanced Salt Solution vergleichbar. Über ähnliche Ergebnisse berichteten auch Park et al. in ihrer Studie. Bei dem Vergleich von intrakameral eingesetzter balancierter Kochsalzlösung und Avastin® in Kaninchenaugen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Endothelzellstrukturen wie Mikrovilli, Zellgrenzen und Zelldichte [86]. Die zuvor aufgeführten Hornhautendothelbefunde von Bevacizumab und Ranibizumab sind als reversible Veränderungen zu deuten, wie sie auch in rasterelektronenmikroskopischen Bildern von Hagenah et al. nach 5 Tage langer Lagerung in ME-Medien mit Hydroxyethylstärke beobachtet wurden [43]. In Übertragung auf diese Studie könnten daher die diskreten Veränderungen an dem mit antiangiogenen Substanzen belasteten Hornhautendothel ebenfalls temporär sein und sich in vivo im weiteren Verlauf wieder zurückbilden.

Ein völlig anderes Bild boten die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Eingabe von Triamcinolonacetonid in die Vorderkammer. Im Vergleich zu den vorherigen Versuchsreihen traten hier sehr ausgeprägte Strukturverluste bis hin zum Totalverlust des Zellverbandes auf. Die Zelloberflächen imponierten mit Zellschwellungen und mit Nekrosen der Endothelzellen. Anstelle der fein verzahnten Zellgrenzen klafften breite Spalten zwischen den einzelnen Zellen. Des Weiteren zeigte sich ein nahezu vollständiger Verlust der Mikrovilli

und auch die wabenförmige Anordnung des Zellmusters war kaum noch nachvollziehbar. Diese ausgeprägten morphologischen Veränderungen scheinen den von Nartey et al. beschriebenen mechanischen Läsionen am Hornhautendothel nach einem Iriskontakt während der Präparation sehr ähnlich [80]. Bei der direkten Gegenüberstellung der Versuchsreihen mit unbehandelten Hornhäuten, Balanced Salt Solution, Bevacizumab und Ranibizumab wurden die morphologischen Differenzen ebenfalls deutlich. Auch beim Mehrfachvergleich in der statistischen Auswertung gab es zwischen der Nullserie, BSS und den antiangiogenen Substanzen hinsichtlich der Beurteilungskriterien der elektronenmikroskopischen Bilder keinen signifikanten Unterschied, wohingegen sich im Vergleich von Triamcinolon und mit der Referenzgruppe und den anderen Medikamenten ausgeprägte Unterschiede zeigten, welche signifikant waren.

Die Aufnahmen von insgesamt 5 Bildern innerhalb einer Hornhautprobe, von denen eine dem Zentrum entsprach und sich vier weitere in der Peripherie befanden, erfolgten zur einheitlichen Bewertung der gesamten Probenfläche. Da in verschiedenen Arealen des Hornhautendothels topografische Variationen in Zellgröße und Zellform auftreten können, wurde sich für das vorliegende Regime der Fotodokumentation und Auszählung entschieden. Diese Verteilung wurde bereits von Doughty et al. an Endothelien von Kaninchenhornhäuten beschrieben [27].

4.3 Wertung der Ergebnisse

Die erhobenen Daten und die Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Befunde erlauben Rückschlüsse auf die Toxizität der untersuchten Medikamente für das Hornhautendothel. Ranibizumab und Bevacizumab hinterlassen am Endothel gut erhaltene Ultrastrukturen, wobei die leichten morphologischen Veränderungen den Proben der Nullserie und Balanced Salt Solution entsprechen. Daraus ergibt sich, dass beide Substanzen keine toxische Wirkung auf das Endothel beim Einsatz in der Vorderkammer haben. Eine intrakamerale Injektion von VEGF-Inhibitoren zur Reduktion von Irisneovaskularisationen infolge eines Sekundärglaukoms würde demnach keine lokale Schädigung der Endothelzellen der Hornhaut hervorrufen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien nach der Eingabe von Avastin® in den vorderen Augenabschnitt beobachtet. Bei einer Versuchsreihe von Park et al. zeigten sich in vivo nach Injektionen von bis zu 2,4 mg/0,1 ml Bevacizumab in die Vorderkammer von Kaninchenaugen am Hornhautendothel keine toxischen Veränderungen

im Sinne von Zelltod, anormalen Zellformationen, Blasenbildung oder Auflösung der Zellgrenzen [86]. Es gab im Vergleich zur Injektion von Balanced Salt Solution keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung von Merkmalen wie Zelldichte, Hornhautdicke, Zellgrenzen und Mikrovilli. Vergleichbare Resultate ergaben sich ebenfalls bei Shin et al. nach einer der Gegenüberstellung des intrakameralen Einsatzes von 0,05 ml balancierter Kochsalzlösung und einer Avastin®-Konzentration (1,25 mg/0,05 ml), wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde [107]. Die gute Verträglichkeit des Endothels könnte auch durch eine Resorption des Medikaments durch Gefäße im Bereich des vorderen Augenabschnitts und einer daraus resultierenden Reduktion der zu Anfang injizierten Dosis bedingt sein [7]. Nach Lockington et al. werden bei der Eingabe von Bevacizumab freie Radikale freigesetzt, welche auch ein Risiko für eine endotheliale Schädigung darstellen könnten [69]. Während der Injektion von Lucentis® entstehen dabei zwar ebenfalls Radikale, jedoch liegt hier die Menge unterhalb des schädigenden Wirkungsbereichs [69]. Andere Studien zeigten jedoch, dass auch beim Einsatz weitaus höherer Konzentrationen (bis 5,0 mg/ml), der VEGF-Inhibitor Bevacizumab keinen zytotoxischen Effekt auf die Hornhautinnenschicht hat [132]. Außerdem hat eine Untersuchung der Toxizität von Avastin® auf kultivierte Hornhautendothelzellen ergeben, dass die hohe Dosierung von 5,0 mg/ml keine toxische Wirkung auf die Zellen hat und ein Endothelschaden beim klinischen Einsatz in der Vorderkammer nicht zu erwarten ist [75]. Bezüglich schädigender Auswirkungen auf das Hornhautendothel nach intrakameraler Injektion von Ranibizumab liegen bisher keine Ergebnisse vor. Es finden sich in der Literatur lediglich Angaben über die gute Verträglichkeit bei intravitrealer Eingabe [89]. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigt sich jedoch auch hier, dass wie bei Bevacizumab die Injektion in die Vorderkammer keine gravierenden Veränderungen am Endothel der Hornhaut hervorruft.

In den Bildern der mit Triamcinolonacetonid belasteten Hornhäute, waren deutliche Schäden des Endothelzellverbandes zu erkennen. Die hier vorliegenden Destruktionen sind vermutlich osmotisch bedingte Zerstörungen der Zellen, welche aufgrund der Galenik der kristallinen Suspension entstanden sind. Bei keiner anderen Untersuchungsreihe waren vergleichbare morphologische Veränderungen nachweisbar. Auch Chang et al. konnten in ihren Versuchen nach intrakameraler Injektion von Triamcinolon (40 mg/ml) in Kaninchenaugen in vitro strukturelle Schädigungen wie Zellschwellungen, Desorganisationen von Zellorganellen und Auflösungen der Zellgrenzen feststellen [24]. Jedoch könnten diese beschriebenen

Veränderungen nicht durch das Triamcinolonacetonid selbst, sondern auch durch das in der Lösung enthaltene Konservierungsmittel Benzylalkohol verursacht worden sein. Auch bei einem direkten Vergleich scheint die Schädigung durch die konservierungsmittelhaltige Triamcinolonacetonid-Lösung ausgeprägter zu sein, als bei der Lösung ohne Konservierungsmittel [100]. Kleinere Mengen des intrakameral applizierten Steroids (1 mg/0,1 ml) scheinen hingegen die Strukturen des vorderen Augenabschnitts nicht zu beeinträchtigen und darüberhinaus bei Kataraktoperationen mit Phacoemulsifikation postoperativ Entzündungsreaktionen abzuschirmen [59]. Zu beachten bei der Einordnung dieser Schäden ist, dass Triamcinolon in der Regel intravitreal zur Darstellung des Glaskörpers bei schwierigen Vitrektomien eingesetzt wird und allenfalls sekundär, zum Beispiel lagerungsbedingt und aufgrund einer Zonulafaserschwäche oder bei aphaken Augen, aus dem Glaskörperraum in die Vorderkammer gelangt [18]. Bei solch geringen Konzentrationen treten meist keine toxischen Effekte am Endothel auf.

4.4 Kritische Einschätzung der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Verfahren

4.4.1 Kritische Einschätzung der Ergebnisse

Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es neben den Medikamenten auch weitere Komponenten gibt, welche das Hornhautendothel beeinflussen und somit auch als Ursache cornealer Strukturveränderungen in Betracht gezogen werden müssen. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen endothelialen Destruktionen und der postmortalen Zeit [61]. Mit der Verlängerung der Zeit zwischen Enukleation und Einbringung der Präparate in das Fixiermedium schreiten auch die postmortalen Veränderungen am Hornhautendothel voran. Obwohl in dieser Studie die postmortale Zeit bei den Präparaten teilweise zwischen 6 und 13 Stunden variierten, resultierten hinsichtlich der zeitlich bedingten Veränderung nur geringe Abstufungen, die zu vernachlässigen waren.

Auch ist bekannt, dass durch die eingesetzten Fixier- und Trocknungsmethoden Zellschrumpfungen entstehen [123, 130]. Da jedoch alle Präparate nach dem gleichen Verfahren aufbereitet wurden, wären diese Veränderungen auch in den Vergleichsproben nachweisbar.

Ebenfalls ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass es sich bei der Triamcinolonacetonid Suspension um ein Gemisch aus 0,08 g Triamcinolonacetonid und 2 ml

0,9%iger Natrium-Chlorid-Lösung handelt. Die Spüllösung Balanced Salt Solution ist in ihrer chemischen Zusammensetzung (pH-Wert 7,2; Osmolalität 300 mOsm/kg) dem Kammerwasser nachempfunden, welches einen pH-Wert von 7,38 und eine Osmolalität von 304 mOsm/kg aufweist [13, 36]. Die physiologische 0,9%ige Natrium-Chlorid-Lösung ist eine Spüllösung, welche in der Vergangenheit intraoperativ im vorderen Augenabschnitt eingesetzt wurde. Sie ist jedoch hinsichtlich der Osmolalität (286 mOsm/kg) und des pH-Wertes (4,5-7,0) nicht so gut auf das Kammerwasser abgestimmt wie die balancierte Kochsalzlösung [90, 133]. Daher könnten die gravierenden Schädigungen der Hornhautendothelproben, wie sie bei den Proben nach Triamcinoloninjektion gefunden wurden, auch osmotisch bedingt sein. Hinzu kommt, dass nach Chang et al. das Konservierungsmittel der Triamcinolonacetonid Suspension eine weitere Ursache für die ausgeprägten Schäden an den Zellstrukturen sein könnte [24].

4.4.2 Vergleich mit anderen Verfahren

Die Eingabe von VEGF-Inhibitoren beim Neovaskularisationsglaukom zur Behandlung der Rubeosis iridis erfolgt im klinischen Gebrauch meist intravitreal, da zum einen die antiangiogenen Substanzen auch zur Behandlung von Makulaödemen über diesen Weg appliziert werden und zum anderen mit einer Injektion in den Glaskörperraum die Medikamente in direkter Nähe zum Bildungsort des VEGFs, dem retinalen Pigmentepithel, wirken können. Die intrakamerale Injektion hingegen findet in der Klinik deutlich seltener Anwendung, obgleich sie gegenüber der intravitrealen Medikamenteneingabe auch Vorteile aufweist. Die Applikation in die Vorderkammer ist weniger invasiv als Injektionen in den Glaskörperraum [7]. Daher ist das Risiko für Hypersensibilitätsreaktionen infolge intrakameraler Injektionen wesentlich geringer als bei intravitrealen Eingaben [132]. Darüber hinaus können bei Injektionen über die Pars Plana Komplikationen wie choroidale Blutungen, Endophthalmitiden, Ablationes retinae und sogar Risse im retinalen Pigmentepithel auftreten [7, 86]. Bei Applikationen in die Vorderkammer sind solche Komplikationen äußerst selten zu erwarten. Auch das Blutungsrisiko während des Eingriffs ist deutlich geringer, da hier die Einführung der Injektionskanüle unter direkter Sicht über das avaskuläre Gewebe der Cornea erfolgt [50]. Andererseits können jedoch ein vergrößertes Vorderkammervolumen nach der Injektion, sowie kleine Traumata während der Eingabe des Medikaments die Ausbildung sogenannter Riesenzellen am Hornhautendothel induzieren [86]. Daher sollte auch bei diesem Eingriff stets der intraokulare Druck überwacht werden.

Für eine Injektion in das vordere Augensegment spricht weiterhin der schnelle Wirkungseintritt durch die direkte Eingabe der antiangiogenen Substanzen in den Bereich der Iris, welche das Zielgewebe zur Behandlung des rubeotischen Sekundärglaukoms darstellt [7]. Dies ermöglicht eine weitaus schnellere Senkung der lokalen VEGF-Konzentration als bei intravitrealer Injektion und es erfolgt somit innerhalb weniger Wochen eine deutliche Reduktion der Neovaskularisationen [68]. Aufgrund der effektiven Senkung der VEGF-Konzentration, könnte im Vergleich zu Applikationen in den Glaskörper bei der intrakameralen Injektion eine geringere Dosis eingesetzt werden [68]. Dem steht allerdings ein höherer Umsatz der Substanzen bei direkter Eingabe in die Vorderkammer gegenüber. Die intrakameral applizierten Medikamente werden schneller abgebaut und haben einen kürzeren Wirkungseffekt als solche, die in den Glaskörper injiziert werden [107, 129]. Daher ist längerfristig der alleinige Einsatz von antiangiogenen Substanzen im vorderen Augenabschnitt für eine wirksame Senkung des Augeninnendrucks nicht ausreichend und sollte durch andere Verfahren wie die panretinale Laserkoagulation ergänzt werden [68, 129]. Durch die intravitreale Eingabe hingegen kann eine effektive Reduktion des intraokularen Drucks erfolgen und es sind oft keine weiterführenden Behandlungen notwendig [68]. Da bei Injektionen in den Glaskörperraum die antiangiogenen Substanzen in weitaus niedrigerer Konzentration in die Vorderkammer gelangen, zeigen sich auch hier keinerlei toxische Veränderungen am Hornhautendothel [14].

Der Einsatz von VEGF-Inhibitoren in der Vorderkammer zur Behandlung des Neovaskularisationsglaukoms stellt auch für Erkrankungen, bei denen eine intravitreale Injektion nicht möglich ist, eine gute Therapieoption dar. So können zum Beispiel nach Brachytherapien bei Aderhautmelanomen intrakameral applizierte antiangiogene Substanzen zur Behandlung von Neovaskularisationen mit exsudativer Ablatio eingesetzt werden. Aufgrund der Netzhautablösung wäre hier eine Eingabe in den Glaskörper keine sichere Methode [122].

Bei der Gegenüberstellung der auch in der vorliegenden Studie genutzten Injektion von VEGF-Inhibitoren in die Vorderkammer und der in der Klinik häufig angewandten Applikation dieser in den Glaskörper zeigt sich, dass die Eingabe von Ranibizumab und Bevacizumab in das vordere Augensegment durchaus Vorteile haben kann.

4.5 Einsatz der intrakameralen Injektion von antiangiogenen Substanzen

Die Anwendung von antiangiogenen Substanzen wie Ranibizumab und Bevacizumab im vorderen Augenabschnitt stellt eine gute Behandlungsoption für die Therapie des rubeotischen Sekundärglaukoms dar. Bei der intrakameralen Injektion gelangt das Medikament direkt an das Zielgewebe und kann dadurch sofort an diesen Strukturen wirken [28]. Aufgrund dieses schnellen Wirkungseintritts können die Neovaskularisationen an der Iris rasch und deutlich reduziert [68] und der intraokulare Druck gesenkt werden [129]. Da jedoch bei alleiniger Injektion in die Vorderkammer oft nach kurzer Zeit erneute Druckerhöhungen auftreten [129], sollte der intrakamerale Einsatz mit anderen Verfahren, wie der Ahmed-Valve-Implantation [107] oder der panretinalen Laserkoagulation [129], kombiniert werden. Darüberhinaus ist die Laserbehandlung der Netzhaut häufig erst nach einer Vorbehandlung des vorderen Augenabschnitts möglich, da aufgrund des druckbedingten Hornhautödems der Einblick oft reduziert ist [129]. Hier stellt die intrakamerale Injektion aufgrund ihrer schnellen Wirkung eine gute additive Therapieoption dar. Nicht selten liegt neben dem rubeotischen Sekundärglaukom eine dichte Katarakt vor, die eine kontrollierte intravitreale Eingabe antiangiogener Substanzen gar nicht möglich macht, sodass eine „blinde“ Injektion erfolgen müsste. Hier stellt die Applikation in die Vorderkammer eine Alternative dar. Nach Rückbildung ist dann die Kataraktoperation möglich. Es resultiert oft ein besserer Funduseinblick, der dann die Laserbehandlung der Netzhaut als Therapie mit nachhaltigem Erfolg möglich macht. Weiterhin ist die Eingabe von Medikamenten in die Vorderkammer ein einfaches und minimal invasives Verfahren [28] und es können geringere Dosen der VEGF-Inhibitoren verwendet werden als bei anderen Applikationsformen [68]. Auch zur Behandlung von Irisneovaskularisationen bei Kontraindikationen für eine intravitreale Injektion, kann auf den direkten Einsatz von Substanzen in der Vorderkammer zurückgegriffen werden [122].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie und anderer Versuchsreihen zeigen, dass bei der Eingabe von Lucentis® und Avastin® in das vordere Augensegment keine toxisch bedingten Veränderungen am Hornhautendothel auftreten und diese Darreichungsform von den cornealen Strukturen gut vertragen wird [68, 107].

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblicke

Zur Behandlung von Neovaskularisationen im vorderen Augensegment sind die antiangiogenen Substanzen Lucentis® und Avastin® sehr potent. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Medikamente bei der Eingabe in die Vorderkammer keine toxischen Veränderungen am Hornhautendothel bewirken und im Hinblick auf die Protektion der innersten Zellschicht der Hornhaut bei der Injektion dieser VEGF-Hemmer in den vorderen Augenabschnitt kein erhöhtes Risiko für eine Schädigung vorliegt. Anhand der intrakameralen Eingabe des Steroides Triamcinolon konnte in dieser Studie verdeutlicht werden, wie sensibel das corneale Endothel auf einen direkten Kontakt mit einem Medikament reagieren kann und welche ausgeprägten irreversible Veränderungen in der endothelialen Ultrastruktur daraus resultieren.

Mit der intrakameralen Injektion von Ranibizumab und Bevacizumab bietet sich die Möglichkeit, beim rubeotischen Sekundärglaukom eine schnelle antiangiogene Wirkung der Substanzen durch den direkten Kontakt mit dem Zielgewebe zu erreichen. Es ist ein Verfahren, welches aufgrund seiner geringen Invasivität weniger unerwünschte Wirkungen hervorruft als die intravitreale Injektion der VEGF-Hemmer. Jedoch sollte aufgrund des schnellen Abbaus der Medikamente in der Vorderkammer für eine längerfristige Senkung des Augeninnendrucks eine additive Behandlung mit anderen Verfahren, wie der panretinalen Laserkoagulation, erfolgen. Bedeutung hat die intrakamerale Injektion auch für Erkrankungen, bei denen eine intravitreale Eingabe aufgrund des erhöhten Risikos weiterer Komplikationen kontraindiziert ist. Hier stellt der Einsatz in der Vorderkammer ebenfalls eine gute Behandlungsalternative dar.

Um den Einsatz von antiangiogenen Substanzen im vorderen Augenabschnitt für den klinischen Gebrauch zu etablieren, sind jedoch insbesondere bei Lucentis® weitere Untersuchungen notwendig, welche den fehlenden toxischen Einfluss auf humane Hornhautendothelzellen bei der Eingabe in die Vorderkammer bestätigen. Darüber hinaus sollten zusätzlich klinische Studien zur Anpassung einer adäquaten Kombinationstherapie aus intrakameraler Applikation von VEGF-Hemmern und einer kausalen Therapie der Neovaskularisation erfolgen.

5 Zusammenfassung

Die Eingabe von VEGF-Inhibitoren in das Auge zur Behandlung von Neovaskularisationen stellt heute die Therapie der Wahl bei altersabhängiger Makuladegeneration dar und wird auch bei anderen Erkrankungen der Netzhaut, die mit pathologischer Gefäßneubildungen einhergehen, eingesetzt. Hierbei erfolgt die Injektion der antiangiogenen Substanzen in den Glaskörperraum. Beim rubeotischen Sekundärglaukom bilden sich die Neovaskularisationen an der Irisvorderfläche und behindern bei Progredienz den Abfluss des Kammerwassers in den Kammerwinkel. Daraus resultiert eine Erhöhung des Augeninnendrucks. Hier ist der Einsatz von VEGF-Hemmern eine wirkungsvolle Therapie. Neben der intravitrealen Injektion stellt die Eingabe der Substanzen in die Vorderkammer ebenfalls eine gute Option dar.

Anliegen dieser Arbeit war es, den Einfluss von Ranibizumab und Bevacizumab auf das Hornhautendothel von Schweineaugen nach deren Injektion in die Vorderkammer zu untersuchen.

Hierbei wurden an jeweils 10 enukleierten Schweineaugen pro Versuchsreihe die antiangiogenen Substanzen Lucentis® und Avastin® sowie Balanced-Salt-Solution und Triamcinolon in die Vorderkammer injiziert. Die Eingabe der Medikamente erfolgte in den gleichen Konzentrationen wie sie auch intravitreal eingesetzt werden. Nach einer festgelegten Lagerungszeit, welche dem Zeitraum einer vollständigen Erneuerung des Kammerwassers im Vorderabschnitt entspricht, wurden die Hornhautscheiben präpariert und anschließend für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung aufbereitet. Zur Beurteilung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurden die Ultrastrukturen Mikrovilli, Zellgrenzen, Zelloberfläche und Zellmuster nach einem determinierten Score bewertet und anschließend statistisch sowohl mit den unbehandelten Hornhäuten als auch untereinander verglichen.

Bei den Endothelien der mit Ranibizumab und Bevacizumab belasteten Corneae traten nur leichte Veränderungen der Strukturen auf, welche sich in ähnlicher Ausprägung auch bei den unbehandelten und den mit BSS versetzten Hornhäuten fanden und auch reversibel sein könnten. Das Endothel der Hornhäute mit intrakameraler Injektion von Triamcinolon zeigte deutliche Strukturverluste, welche auf eine irreversible Schädigung der Zellen schließen lassen. Diese könnten auch durch das in der Suspensionslösung enthaltene Konservierungsmittel bedingt sein.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von antiangiogenen Substanzen in der Vorderkammer keine schädigende Wirkung auf das Hornhautendothel hat und eine Option zur Therapie des Neovaskularisationsglaukoms darstellt. Dennoch bedarf es weiterer Studien, um irreversible Schäden am menschlichen Hornhautendothel auszuschließen. Die intrakamerale Eingabe von Triamcinolon hingegen führt zur einer deutlichen Destruktion der Endothelzellen und stellt somit bei einer Applikation in das vordere Augensegment ein erhöhtes Risiko für die innere Hornhautschicht dar.

Literaturverzeichnis

1. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, D'Amore PA, Miller JW: Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:66-71
2. Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Berse B, D'Amore PA, Folkman J: Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193:631-638
3. Agostini H, Funk J: Neovaskuläres Glaukom. In: Schlote T, Rohrbach JM (Hrsg): Sekundärglaukome — komplizierte Glaukome in Theorie und Praxis. 1. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 2004, S. 237-248
4. Agostini HT, Hansen LL, Feltgen N: Therapie des zystoiden Makulaödems bei Pseudophakie. *Ophthalmologie* 2007; 104:425-430
5. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE et al: Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331:1480-1487
6. Aisenbrey S, Ziemssen F, Volker M, Gelissen F, Szurman P, Jaissle G, Grisanti S, Bartz-Schmidt KU: Intravitreal bevacizumab (Avastin) for occult choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245:941-948
7. Altintas AG, Arifoglu HB, Tutar E, Koklu G, Ozcan PY: Effect on anterior chamber bevacizumab injection combined with seton implantation in treatment of rubeosis iridis in neovascular glaucoma. *Cutan Ocul Toxicol* 2012; 31:124-127
8. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP: Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:18-22
9. Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ, Wendel R, Patel A: Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2006; 113:1695-1705
10. Bakri SJ, Beer PM: The effect of intravitreal triamcinolone acetonide on intraocular pressure. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2003; 34:386-390
11. Bartz-Schmidt U, Bertram B, Bornfeld N, Grisanti S, Holz FG, Lemmen KD, Pauleikhoff D, Roeder J, Walter P: Stellungnahme der Deutschen Retinologischen Gesellschaft, der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands zu aktuellen therapeutischen Möglichkeiten bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration. *Klin Monbl Augenheilkd* 2007; 224:559-566
12. Batioglu F, Astam N, Ozmert E: Rapid improvement of retinal and iris neovascularization after a single intravitreal bevacizumab injection in a patient with central retinal vein occlusion and neovascular glaucoma. *Int Ophthalmol* 2008; 28:59-61

13. Bausch & Lomb GmbH: Die Bausch & Lomb Balanced Salt Solution hydratisiert und schützt Gewebe und Zellen bei allen ophthalmologischen Eingriffen. K BSS 1/01. 2009, unter: <http://www.bausch-lomb.de/startseite-ecp/-/m/BL/Germany/Files/Downloads/ECP/Surgical/bss-datenblatt.pdf>, abgerufen am 17.05.2010
14. Bayar SA, Altinors DD, Kucukerdonmez C, Akova YA: Severe corneal changes following intravitreal injection of bevacizumab. *Ocul Immunol Inflamm* 2010; 18:268-274
15. Beer PM, Bakri SJ, Singh RJ, Liu W, Peters GB, Miller M: Intraocular concentration and pharmacokinetics of triamcinolone acetonide after a single intravitreal injection. *Ophthalmology* 2003; 110:681-686
16. Beutel J, Grisanti S: Therapie des rubeotischen Sekundärglaukoms. In: Bartz-Schmidt KU, Ziemssen F (Hrsg): *Intravitreale Pharmakotherapie*. 1. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 2008, S. 140-3
17. Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, P K., Partanen TA, Alitalo K, Kroon ME, Kijlstra A, van Hinsbergh VW, Schlingemann RO: Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 1999; 155:421-428
18. Blanco C, Fagundez A, Buznego L, Lopez-Moya J: Leak of intravitreal triamcinolone to the anterior chamber. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007; 82:781-783
19. Bock F, König Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C: Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246:281-284
20. Bornfeld N, Pauleikhoff D, Bartz-Schmidt U, Bertram B, Bresgen M, Holz FG, Kampik A, Kirchhof B, Lemmen KD, Roider J: Neue Aspekte in der Therapie der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration. Stellungnahme der Retinologischen Gesellschaft, der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands e.V. *Ophthalmologe* 2009; 106:457-464
21. Brown DM, Kaiser PK, M M., Soubrane G, Heier JS, Kim RY, Sy JP, Schneider S: Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration – for the ANCHOR study Group. *N Engl J Med* 2006; 355:1432-1444
22. CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, Ying GS, Grunwald JE, Feine SL, Jaffe GJ: Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2011; 364:1897-1908
23. Chakravarthy U, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Goldbaum M, Guyer DR, Katz B, Patel M: Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006; 113:1508,1-25
24. Chang YS, Tseng SY, Tseng SH, Wu CL, Chen MF: Triamcinolone acetonide suspension toxicity to corneal endothelial cells. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32:1549-1555
25. Daus W, Völcker HE: Hornhautendothel — Anatomie, Physiologie, Biomikroskopie, Klinik und Pathologie. *Ophthalmologe* 1992; 89:15-26
26. Deissler HL, Lang GE: Wirkung von VEGF165 und dem VEGF-Aptamer Pegaptanib (Macugen®) auf die Zusammensetzung der Tight Junctions mikrovaskulärer Endothelzellen aus der Retina. *Klin Monbl Augenheilkd* 2008; 225:863-867

27. Doughty MJ, Dilts DM: Identification of topographical variations in the sizes of cells in a monolayer-application to corneal endothelium. *Tissue Cell* 1994; 26:621-636
28. Duch S, Buchacra O, Milla E, Andreu D, Tellez J: Intracameral bevacizumab (Avastin) for neovascular glaucoma: a pilot study in 6 patients. *J Glaucoma* 2009; 18:140-143
29. Faber C, Scherfing E, Prause JU, Sørensen KE: Corneal thickness in pigs measured by ultrasound pachymetry in vivo. *Scand J Lab Anim Sci* 2008; 35:39-43
30. Faragher RG, Mulholland B, Tuft SJ, Sandeman S, Khaw PT: Aging and the cornea. *Br J Ophthalmol* 1997; 81:814-817
31. Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R: Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2006; 26:859-870
32. Floman N, Zor U: Mechanism of steroid action in ocular inflammation: Inhibition of prostaglandin production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16:69-73
33. Frank G, Herrmann M: Anti-VEGF-Therapie — neue klinische Evidenz bei AMD und diabetischem Makulaödem: Exsudative altersbedingte Makuladegeneration-Wirksamkeit und Sicherheit von Ranibizumab unter Praxisbedingungen. *Beilage Ophthalmologe* 2009; 106:1-4
34. Gaudreault J, Fei D, Rusit J, P. S., Shiu V: Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:726-733
35. Gillies MC, Simpson JM, Luo W, Penfold P, Hunyor AB, Chua W, Mitchell P, Billson F: A randomized clinical trial of a single dose of intravitreal triamcinolone acetonide for neovascular age-related macular degeneration: one-year results. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:667-673
36. Glasser DB, Matsuda M, Ellis JG, Edelhauser HF: Effects of intraocular irrigating solutions on the corneal endothelium after in vivo anterior chamber irrigation. *Am J Ophthalmol* 1985; 99:321-328
37. Goldberg MA, Schneider TJ: Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 1994; 269:4355-4359
38. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR: Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004; 351:2805-12806
39. Graham EM, Stanford MR, Shilling JS, Sanders MD: Neovascularisation associated with posterior uveitis. *Br J Ophthalmol* 1987; 71:826-833
40. Grisanti S, Biester S, Peters S, Tatar O, Ziemssen F, Bartz-Schmidt KU: Intracameral bevacizumab for iris rubeosis. *Am J Ophthalmol* 2006; 142:158-160
41. Grisanti S, Ziemssen F: Angiogenese und Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF). In: Bartz-Schmidt KU, Ziemssen F (Hrsg): *Intravitreale Pharmakotherapie*. 1. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 2008, S. 6-10
42. Guerrin M, Moukadiri H, Chollet P, Moro F, Dutt K, Malecaze F, Plouet J: Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for

- human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J Cell Physiol* 1995; 164:385-394
43. Hagenah M, Halberstadt M, Wehming S, Brewitt H, Winter R: Hydroxyäthylstärke als Entquellungs-substanz in Kurzzeitkulturmedien für Spenderhornhäute. *Klin Monbl Augenheilkd* 1996; 208:107-111
 44. Harooni H, Reddy V, Root T, Ambati B: Bevacizumab for graft rejection. *Ophthalmology* 2007; 114:1950
 45. Heiduschka P, Fietz H, Hofmeister S, Schultheiss S, Mack AF, Peters S, Ziemssen F, Niggemann B, Julien S, Bartz-Schmidt KU, Schraermeyer U: Penetration of bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:2814-2823
 46. Heier JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik JF, Kaiser PK, Nguyen QD, Kirchhof B, Ho A, Ogura Y, Yancopoulos GD, Stahl N, Vitti R, Berliner AJ, Soo Y, Anderesi M, Groetzbach G, Sommerauer B, Sandbrink R, Simader C, Schmidt-Erfurth U, VIEW 1 and VIEW 2 Study Groups: Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2012; 119:2537-2548
 47. Hernandez-Pastor LJ, Ortega A, Garcia-Layana A, Giraldez J: Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65:1805-14
 48. Heydenreich A, Bauer F, Busch KT, Hähnel R, Trautmann I: Bowmansche Membran. In: Heydenreich A (Hrsg): *Mikroskopisch-histologische Untersuchungsmethoden unter besonderer Berücksichtigung des Sehorgans*. 1. Aufl. Thieme, Leipzig, 1968, S. 314
 49. Hirsch JG, Fedorko ME: Ultrastructure of human leukocytes after simultaneous fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide and "postfixation" in uranyl acetate. *J Cell Biol* 1968; 38:615-627
 50. Hosny MH, Zayed MA, Shalaby AM, Eissa IM: Effect of intracameral bevacizumab injection on corneal endothelial cells: an in vivo evaluation. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009; 25:513-517
 51. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winter J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267:26031-26037
 52. Hughes MS, Sang DN: Safety and efficacy of intravitreal bevacizumab followed by pegaptanib maintenance as a treatment regimen for age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2006; 37:446-454
 53. Iliev ME, Domig D, Wolf-Schnurrbursch U, Wolf S, Sarra GM: Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of neovascular glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2006; 142:1054-1056
 54. Jaissle GB, Szurman P, Bartz-Schmidt KU: Nebenwirkungen und Komplikationen der intravitrealen Triamcinolonacetamid-Therapie. *Ophthalmologe* 2004; 101:121-128
 55. Jaissle GB, Ziemssen F, Petermeier K, Szurman P, Ladewig M, Gelisken F, Volker M, Holz FG, Bartz-Schmidt KU: Bevacizumab zur Therapie des sekundären Makulaödems nach venösen Gefäßverschlüssen. *Ophthalmologe* 2006; 103:471-475

56. Jay L, Brocas A, Singh K, Kieffer JC, Brunette I, Ozaki T: Determination of porcine corneal layers with high spatial resolution by simultaneous second and third harmonic generation microscopy. *Opt Express* 2008; 16:16284-16293
57. Jonas JB, Golubkina L, Libondi T, Rensch F: Intravitreal bevacizumab for neovascular glaucoma. *Acta Ophthalmol* 2010; 88:22-23
58. Jousseaume AM, Kirchhof B, Gottstein C: Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und der Angiogenese. *Ophthalmologie* 2003; 100:284-291
59. Karalezli A, Borazan M, Akova YA: Intracameral triamcinolone acetonide to control postoperative inflammation following cataract surgery with phacoemulsification. *Acta Ophthalmol* 2008; 86:183-187
60. Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amano S, Aguilar S, Miller JW, Adamis AP: Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2115-2121
61. Kinzel R: Die postmortalen Veränderungen des Schweinehornhautendothels in Abhängigkeit von der Zeit. Greifswald, Univ., Med. Fak., 72 Seiten, 2008
62. Klettner A, Mohle F, Roider J: Intracellular bevacizumab reduces phagocytotic uptake in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010; 248:819-824
63. Klettner AK, Kruse ML, Meyer T, Wesch D, Kabelitz D, Roider J: Different properties of VEGF-antagonists: Bevacizumab but not Ranibizumab accumulates in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247:1601-1608
64. Kumar A, Sinha S: Rapid regression of disc and retinal neovascularization in a case of Eales disease after intravitreal bevacizumab. *Can J Ophthalmol* 2007; 42:335-336
65. Ladewig MS, Ziemssen F, Jaissle G, Helb HM, Scholl HP, Eter N, Bartz-Schmidt KU, Holz FG: Intravitreales Bevacizumab bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration. *Ophthalmologie* 2006; 103:463-70
66. Lang G: Altersbedingte Makuladegeneration. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2003; 220:1-16
67. Leippi S, Grehn F, Geerling G: Antiangiogene Therapie bei Pterygienrezidiven. *Ophthalmologie* 2009; 106:413-419
68. Lim TH, Bae SH, Cho YJ, Lee JH, Kim HK, Sohn YH: Concentration of vascular endothelial growth factor after intracameral bevacizumab injection in eyes with neovascular glaucoma. *Korean J Ophthalmol* 2009; 23:188-192
69. Lockington D, Macdonald EC, Young D, Stewart P, Caslake M, Ramaesh K: Presence of free radicals in commonly used ophthalmic preparations. *Br J Ophthalmol* 2010; 94:525-526
70. Lucke K, Bopp S: Intraokuläre Eingriffe bei Augen mit Rubeosis iridis und Neovaskularisationsglaukom. *Ophthalmologie* 1998; 95:514-528
71. Lüke J, Lüke M, Grisanti S: Antiangiogene Therapie bei neovaskulärem Glaukom und nach Filterkissenchirurgie. *Ophthalmologie* 2009; 106:407-412
72. Memarzadeh F, Varma R, Lin LT, Parikh JG, Dustin L, Alcaraz A, Elliott D: Postoperative use of bevacizumab as an antifibrotic agent in glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:3233-3237

73. Meyer CH: Wie schnell fällt die Avastinkonzentration im Auge ab? Messungen der Pharmakokinetik von Bevacizumab im menschlichen Auge. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2009; 226:5
74. Meyer CH, Holz FG: Effizientes Patientenmonitoring unter Anti-VEGF-Therapie. *Z. prakt. Augenheilkd* 2008; 29:359-364
75. Meyer MW, Dryia D, Reichl S, Brunotte I, Winter R: Analyse der Toxizität von Bevacizumab (Avastin®) auf kultivierte humane Endothelzellen der Hornhaut. In: Holz FG (Hrsg), *Perspektiven der Augenheilkunde — Innovation für mehr Lebensqualität*. 106. DOG-Kongress 2008, Berlin. Deutsche ophthalmologische Gesellschaft e.V., München, <http://www.dog2008.org/DOG2008-Abstractband.pdf>, 2008, S. 65
76. Mishima S: Clinical investigations on the corneal endothelium. *Ophthalmology* 1982; 89:525-530
77. Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N, Thomsen K, Berleau L, Licko V, Allen PC, Valverde CR, Meng Y., Fei DT, Fourre KM, Ryan AM: Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol* 1999; 27:536-544
78. Mousa SA, Lorelli W, Campochiaro PA: Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Biochem* 1999; 74:135-143
79. Narayanan R, Mungcal JK, Kenney MC, Seigel GM, Kuppermann BD: Toxicity of triamcinolone acetonide on retinal neurosensory and pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:722-728
80. Nartey IN, Sherrard ES, Steele AD: Manipulative damage to the endothelium of infant and adult donor corneas. *Br J Ophthalmol* 1990; 74:261-264
81. Naumann GOH: Reaktive Proliferationen des gefäßführenden Bindegewebes. In: Naumann GOH (Hrsg): *Pathologie des Auges*. 2. Aufl. Springer, Berlin, 1997, S. 165-171
82. Naumann GOH, Apple DJ, Deuble-Bente K, von Domarus D: Retinale Neovaskularisationen. In: Doerr W, Seifert S (Hrsg): *Pathologie des Auges II*. 2. Aufl. Springer, Berlin, 1997, S. 1014-1021
83. Nelson ML, Tennant MT, Sivalingam A, Regillo CD, Belmont JB, Martidis A: Infectious and presumed noninfectious endophthalmitis after intravitreal triamcinolone acetonide injection. *Retina* 2003; 23:686-691
84. Noden DM: The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissues. *Dev Biol* 1978; 67:296-312
85. Odenthal MTP: In vivo studies on human corneal endothelial morphology and function. *Mostert & van Onderen*, Amsterdam, 2007, S. 43-48
86. Park HY, Kim SJ, Lee HB, Kim ES, Tchah H: Effect of intracameral bevacizumab injection on corneal endothelium in rabbits. *Cornea* 2008; 27:1151-1155
87. Pauleikhoff D, Bertram B, Holz FG, Kirchof B, Bartz-Schmidt KU, Bornfeld N, Bresgen M, Eter N, Friedrichs W, Heimann H, Helbig H, Hörauf H, Kampik A, Lemmen KD, Roider J, Ziemssen F: Aktuelle Stellungnahme der Retinologischen Gesellschaft, der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte

- Deutschlands e.V. Die Anti-VEGF-Therapie bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration: Therapeutische Strategien. *Klin Monbl Augenheilkd* 2012; 229:541-547
88. Penfold PL, Wen L, Madigan MC, Gillies MC, King NJ, Provis JM: Triamcinolone acetonide modulates permeability and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression of the ECV304 cell line: implications for macular degeneration. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:458-465
 89. Pérez-Rico C, Benítez-Herreros J, Castro-Rebollo M, Gómez-Sangil Y, Germain F, Montes-Mollón MA, Teus MA: Effect of intravitreal ranibizumab on corneal endothelium in age-related macular degeneration. *Cornea* 2010; 29:849-852
 90. Pollmann TO: Organkultivierung von tief stromal lamellierten Hornhäuten. Hannover, Med. FH, 87 Seiten, 2009
 91. Regenfuss B, Bock F, Bachmann B, König Y, Hos D, Parthasarathy A, Cursiefen C: Topische antiangiogene Therapie an der Hornhaut. *Ophthalmologe* 2009; 106:399-406
 92. Reme C, Müller FO, Bamasch P: Der Einfluss von Konservierung durch Lufttrocknung auf die Feinstruktur von Schweinehornhautlamellen. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1973; 185:189-205
 93. Renard G, Pouliquen Y, Hirsch M: Regeneration of the human corneal endothelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1981; 215:341-348
 94. Rieck P, Edelmann B, Schmidt S, Hartmann C: Effekt von Prostaglandin-F2 alpha auf die Proliferation von Hornhautendothelzellen in vitro. *Ophthalmologe* 2001; 98:1157-1161
 95. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY: Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration — for the MARINA Study Group. *N Engl J Med* 2006; 355:1419-1431
 96. Rosenfeld PJ, Heier JS, Hantsbarger G, Shams N: Tolerability and efficacy of multiple escalating doses of ranibizumab (Lucentis) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006; 113:623 e1
 97. Rote Liste Service GmbH: Fachinformation Lucentis®. 010065-F841. 2007, unter: <http://www.fachinfo.de/FachInfo/data/fi/pdf/01/00/010065.pdf>, abgerufen am 23.07.2013
 98. Rote Liste Service GmbH: Fachinformation Eylea®. 014339-E963. 2012, unter: <http://www.fachinfo.de/FachInfo/data/fi/pdf/01/43/014339.pdf>, abgerufen am 05.03.2013
 99. Rote Liste Service GmbH: Fachinformation Avastin®. 008726-F820. 2013, unter: <http://www.fachinfo.de/FachInfo/data/fi/pdf/00/87/008726.pdf>, abgerufen am 13.07.2013
 100. Rothbaum M, Springs C: The Effect of Preserved and Preservative-Free Triamcinolone on Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; E-Abstract, 46:4522
 101. Sachs L, Hedderich J: *Angewandte Statistik*. 12. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006, S. 341-581
 102. Schaal KB, Engler C, Schutt F, Scheuerle A, Dithmar S: Intravitreale Anti-VEGF-Therapie mit Bevacizumab bei neovaskulärer AMD. *Ophthalmologe* 2008; 105:538-543

103. Schiebler TH: Anatomie. 9. Aufl. Springer, Berlin, 2004, S. 654
104. Schubert K, Gamulescu MA, Kraus J, Gabel PV, Sachs H: Intrakamerale Bevacizumab-Injektionen als Therapie bei sekundärem Neovaskularisationsglaukom. In: Schubert K, Gamulescu MA, Kraus J, Gabel PV, Sachs H (Hrsg), Meeting Abstract. Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V. 104. Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG.), Berlin. <http://www.egms.de/en/meetings/dog2006/06dog814.shtml>, 2006, S. 1-2
105. Sellheyer K, Spitznas M: Surface differentiation of the human corneal epithelium during prenatal development. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1988; 226:482-488
106. Sherrard ES, Novakovic P, Speedwell L: Age-related changes of the corneal endothelium and stroma as seen in vivo by specular microscopy. *Eye (Lond)* 1987; 1:197-203
107. Shin JP, Lee JW, Sohn BJ, Kim HK, Kim SY: In vivo corneal endothelial safety of intracameral bevacizumab and effect in neovascular glaucoma combined with Ahmed valve implantation. *J Glaucoma* 2009; 18:589-594
108. Silva Paula J, Jorge R, Alves Costa R, Rodrigues Mde L, Scott IU: Short-term results of intravitreal bevacizumab (Avastin) on anterior segment neovascularization in neovascular glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand* 2006; 84:556-7
109. Spandau UH, Sauder G, Schubert U, Hammes HP, Jonas JB: Effect of triamcinolone acetonide on proliferation of retinal endothelial cells in vitro and in vivo. *Br J Ophthalmol* 2005; 89:745-747
110. Spencer WH: Anatomy, histology, and physiology — Topographic Relations. In: Spencer WH (Hrsg): *Ophthalmic pathology — An Atlas and Textbook*. 3. Aufl. W.B. Saunders Comany, Philadelphia, 1985, S. 229-231
111. Spitzer MS: Entwicklung und Pharmakologie von Ranibizumab. In: Bartz-Schmidt KU, Ziemssen F (Hrsg): *Intravitreale Pharmakotherapie*. 1. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 2008, S. 79-86
112. Spitzer MS, Yörük E: Toxizität von Bevacizumab in der Zellkultur. In: Bartz-Schmidt KU, Ziemssen F (Hrsg): *Intravitreale Pharmakotherapie*. 1. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 2008, S. 87-104
113. Spitznas M: Ein Übungssockel für intraokulare Eingriffe am Auge. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1976; 168:435-436
114. Steinbrook R: The price of sight-ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1409-12
115. Sutter FK, Simpson JM, Gillies MC: Intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema that persists after laser treatment: three-month efficacy and safety results of a prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial. *Ophthalmology* 2004; 111:2044-2049
116. Szurman P: Triamcinolon. In: Bartz-Schmidt KU, Ziemssen F (Hrsg): *Intravitreale Pharmakotherapie*. 1. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 2008, S. 57-74
117. Szurman P, Sierra A, Kaczmarek R, Jaissle GB, Wallenfels-Thilo B, Grisanti S, Luke M, Bartz-Schmidt KU, Spitzer MS: Different biocompatibility of crystalline triamcinolone deposits on retinal cells in vitro and in vivo. *Exp Eye Res* 2007; 85:44-53

118. Tatar O, Grisanti S: Altersabhängige Makuladegeneration: Angiogenese. In: Bartz-Schmidt KU, Ziemssen F (Hrsg): *Intravitreale Pharmakotherapie*. 1. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 2008, S. 11-13
119. Tauber J, Lahav M, Erzurum SA: New clinical classification for iris neovascularization. *Ophthalmology* 1987; 94:542-544
120. Tortora GJ, Derrickson BH: Sehen. In: Pries AR (Hrsg): *Anatomie und Physiologie*. 1. Aufl. WILEY-VCH, Weinheim, 2006, S. 685-686
121. Van Horn DL, Hanna C, Schultz RO: Corneal cryopreservation. II. Ultrastructural and viability changes. *Arch Ophthalmol* 1970; 84:655-667
122. Vásquez LM, Somani S, Altomare F, Simpson ER: Intracameral bevacizumab in the treatment of neovascular glaucoma and exudative retinal detachment after brachytherapy in choroidal melanoma. *Can J Ophthalmol* 2009; 44:106-107
123. Virtanen J, Uusitalo H, Palkama A, Kaufman H: The effect of fixation on corneal endothelial cell dimensions and morphology in scanning electron microscopy. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1984; 62:577-585
124. Walter S, Viestenz A, Behrens-Baumann W: Bevacizumab-unterstützte Vitrektomie bei trakterer PDR-Abaltio retinae. In: Scharrer A, Neuhann Th (Hrsg), *Fortschritte der Ophthalmochirurgie 2009*. 22. Internationaler Kongress der Deutschen Ophthalmochirurgen, Nürnberg. Aktiv Druck & Verlags GmbH, Ebelsbach, <http://www.egms.de/static/en/meetings/doc2009/09doc056.shtml>, 2009, S. 310
125. Wang YS, Friedrichs U, Eichler W, Hoffmann S, Wiedemann P: Inhibitory effects of triamcinolone acetonide on bFGF-induced migration and tube formation in choroidal microvascular endothelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002; 240:42-48
126. Waring GO r., Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR: The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982; 89:531-590
127. Wecke T, Knop C, Schreiber W, Behrens-Baumann W: Intraokulare Bevacizumab-Injektionen bei seltenen Indikationen — zwei Kasuistiken. *Ophthalmologie* 2009; 106:435-42
128. Wilson SE, Bourne WM: Corneal preservation. *Surv Ophthalmol* 1989; 33:237-259
129. Wolf A, von Jagow B, Ulbig M, Haritoglou C: Intracameral injection of bevacizumab for the treatment of neovascular glaucoma. *Ophthalmologica* 2011; 226:51-56
130. Wollweber L, Stracke R, Gothe U: The use of a simple method to avoid cell shrinkage during SEM preparation. *J Microsc* 1981; 121:185-189
131. Yeung CK, Chan KP, Chiang SW, Pang CP, Lam DS: The toxic and stress responses of cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) and human glial cells (SVG) in the presence of triamcinolone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:5293-5300
132. Yoeuruek E, Spitzer MS, Tatar O, Aisenbrey S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P: Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells. *Cornea* 2007; 26:977-982
133. Zander R: *Flüssigkeitstherapie*. 2. Aufl. Bibliomed Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Melsungen, 2009, S. 32-34, unter: http://www.bbraun.de/documents/Knowledge/3969050_Fluessigkeitstherapie_Zander_dt_05_09.pdf, abgerufen am 16.03.2013

Anlagen

Tab. 11: Deskriptive Statistiken, Mikrovilli

Mikrovilli	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Min	Max	Perzentil		
						25.	50. (Median)	75.
Nullserie	10	1,7	0,3	1,0	2,2	1,6	1,8	2,0
Balanced-Salt-Solution	10	1,6	0,3	1,0	2,0	1,4	1,6	1,9
Triamcinolon	20	0,8	0,7	0,0	2,6	0,4	0,7	1,2
Lucentis®	20	1,5	0,4	0,8	2,2	1,2	1,5	1,8
Avastin®	10	1,6	0,6	0,8	2,6	1,2	1,4	2,2

Tab. 12: Deskriptive Statistiken, Zellgrenzen

Zellgrenzen	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Min	Max	Perzentil		
						25.	50. (Median)	75.
Nullserie	10	1,9	0,4	1,2	2,4	1,6	2,0	2,2
Balanced-Salt-Solution	10	1,4	0,7	0,4	2,6	0,8	1,3	2,1
Triamcinolon	20	0,8	0,7	0,0	2,6	0,1	0,7	1,2
Lucentis®	20	1,5	0,6	0,8	2,4	1,0	1,7	2,0
Avastin®	10	1,6	0,7	0,6	3,0	1,0	1,6	2,0

Tab. 13: Deskriptive Statistiken, Zelloberfläche

Zelloberfläche	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Min	Max	Perzentil		
						25.	50. (Median)	75.
Nullserie	10	2,1	0,5	1,2	3,0	1,8	2,0	2,5
Balanced-Salt-Solution	10	1,8	0,6	0,6	2,6	1,4	1,7	2,5
Triamcinolon	20	0,9	0,7	0,0	2,2	0,2	0,9	1,4
Lucentis®	20	1,8	0,6	0,6	2,8	1,5	1,8	2,2
Avastin®	10	1,8	0,6	0,8	2,4	1,6	2,0	2,2

Tab. 14: Deskriptive Statistiken, Zellmuster

Zellmuster	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Min	Max	Perzentil		
						25.	50. (Median)	75.
Nullserie	10	1,9	0,5	1,0	2,6	1,7	2,1	2,3
Balanced-Salt-Solution	10	1,9	0,8	0,6	2,8	1,2	2,1	2,7
Triamcinolon	20	0,8	0,9	0,0	3,0	0,0	0,5	1,3
Lucentis [®]	20	1,6	0,8	0,0	2,8	1,1	1,6	2,4
Avastin [®]	10	1,8	0,7	0,8	3,0	1,2	1,9	2,4

Tab. 15: Deskriptive Statistiken, Gesamtdurchschnitt

Gesamt	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Min	Max	Perzentil		
						25.	50. (Median)	75.
Nullserie	10	7,7	1,5	5,0	9,8	6,3	8,1	8,5
Balanced-Salt-Solution	10	6,8	1,5	4,6	9,0	5,6	6,6	8,1
Triamcinolon	20	3,3	2,8	0,0	10,4	0,7	2,8	5,2
Lucentis [®]	20	6,4	2,1	2,6	9,2	4,9	6,9	8,3
Avastin [®]	10	6,9	2,3	3,2	10,4	4,7	6,9	8,6

Tab. 16: Deskriptive Statistiken, Einwirkdauer der Medikamente

Einwirkdauer	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Min	Max	Perzentil		
						25.	50. (Median)	75.
Nullserie	10	0	0	0	0	0	0	0
Balanced-Salt-Solution	10	91,50	2,506	85	94	91,00	92,00	93,00
Triamcinolon	20	91,35	1,725	90	96	90,00	90,50	92,75
Lucentis [®]	20	90,70	2,993	82	95	90,00	90,00	93,00
Avastin [®]	10	90,00	0	90	90	90,00	90,00	90,00

Thesen

1. Die Therapie des Neovaskularisationsglaukoms durch Eingriffe wie panretinale Laserkoagulationen, Netzhautkryokoagulationen, Zyklokryotherapie oder filtrierende Operationen kann sich besonders bei ausgeprägter Rubeosis iridis und reduziertem Funduseinblick schwierig gestalten.
2. Die Behandlung mit den antiangiogenen Substanzen Ranibizumab (Lucentis®) und Bevacizumab (Avastin®) ist zur Anwendung bei Neovaskularisationen an der Netzhaut durch für die Inhibition des VEGF bereits etabliert. Sie stellt beim Einsatz am vorderen Augensegment neben der kausalen Therapie eine zusätzliche Behandlungsoption dar.
3. Durch die Injektion der VEGF-Inhibitoren in die Vorderkammer steht das Hornhautendothel, welches die sensibelste Schicht der Cornea darstellt, im direkten Kontakt mit den antiangiogenen Substanzen. Daraus könnte eine Beeinflussung des Endothels resultieren.
4. Die Medikamente Ranibizumab (Lucentis®) (0,5 mg/0,05 ml) und Bevacizumab (Avastin®) (1,25 mg/0,05 ml) wurden in die Vorderkammer von enukleierten Schweineaugen injiziert, um den Einfluss dieser Substanzen auf das Hornhautendothel zu untersuchen. Als Vergleichsserie dienten zum einen unbehandelte Hornhäute und zum anderen Hornhautproben, welche mit Balanced Salt Solution (BSS) und dem Steroid Triamcinolonacetonid (2 mg/0,05 ml) konfrontiert wurden.
5. Anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen erfolgte die Beurteilung des Hornhautendothels nach einem etablierten Score. Dieser enthält die Kriterien Mikrovilli, Zellgrenzen, Zelloberfläche und Zellmuster.
6. Die Ultrastrukturen des Endothels der mit Ranibizumab (Lucentis®) und Bevacizumab (Avastin®) belasteten Hornhäute wiesen nur geringfügige Veränderungen auf, welche in ihrer Ausprägung den morphologischen Bildern unbehandelter und mit Balanced Salt Solution versetzter Hornhautproben entsprachen. Es zeigte sich beim Vergleich dieser Versuchsreihen untereinander kein signifikanter Unterschied. In der Versuchsreihe der

mit Triamcinolonacetonid belasteten Hornhäute traten deutliche Schädigungen der Endothelstrukturen auf, welche im Vergleich mit den anderen Versuchsreihen signifikant waren. Diese können durch das in der Lösung enthaltene Konservierungsmittel oder auch im Rahmen einer osmotischen Zerstörung der Zellstrukturen bedingt durch die Galenik des Medikamentes entstanden sein.

7. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die VEGF-Hemmern Ranibizumab (Lucentis®) (0,5 mg/0,05 ml) und Bevacizumab (Avastin®) (1,25 mg/0,05 ml) bei der Eingabe in die Vorderkammer keinen toxischen Einfluss auf das Hornhautendothel haben und zur Behandlung des rubeotischen Sekundärglaukoms im vorderen Augenabschnitt eingesetzt werden können. Eine Injektion von Triamcinolonacetonid (2 mg/0,05 ml) in das vordere Augensegment führt am Endothel der Hornhaut zu deutlichen Strukturverlusten und ist in dieser Konzentration für den direkten Einsatz in der Vorderkammer ungeeignet.
8. Die intrakamerale Injektion von Ranibizumab (Lucentis®) und Bevacizumab (Avastin®) bietet aufgrund der raschen antiangiogenen Wirkung am Zielgewebe eine gute Behandlungsalternative. Sie sollte jedoch aufgrund des hohen Metabolismus der Medikamente in der Vorderkammer additiv zur kausalen Therapie erfolgen, um eine kontinuierliche intraokulare Drucksenkung zu gewährleisten.
9. Im Vergleich zur intravitrealen Injektion stellt die Eingabe von Substanzen in die Vorderkammer ein Verfahren dar, welches aufgrund der direkten Sicht auf den Injektionsbereich mit einem geringeren Risiko für das Auftreten von Komplikationen infolge der Injektion einhergeht. Darüberhinaus kann die intrakamerale Injektion bei Ausgangssituationen mit einer Kontraindikation für die intravitreale Eingabe Anwendung finden.
10. Zur Etablierung der intrakameralen Injektion antiangiogener Substanzen als Therapie des Neovaskularisationsglaukoms sind klinische Studien notwendig.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen erstellt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Seiten wurden als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich, dass ich mich erstmalig einem Promotionsverfahren stelle und frühere Versuche nicht stattgefunden haben.

Münster, den

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name: Wilhelm
Vorname: Anke
Geburtsdatum/-ort: 5. November 1983, Greifswald
Anschrift: Friedrich-Ebert-Straße 164
48153 Münster
Familienstand: ledig

Schulbildung

1990-1997 Grundschule Greifswald
1997-1999 Gymnasium Alexander-von-Humboldt-Gymnasium; Greifswald
1999-2003 Gymnasium Klosterschule Rossleben; Rossleben
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

2003-2011 Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
Abschluss: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(Staatsexamen)

Hauptberufliche Tätigkeiten

seit 07/2012 Assistenzärztin an der Augenabteilung am St. Franziskus Hospital
Münster

Münster, den

Danksagung

Meinem Mentor, Herrn PD Dr. med. Th. Hammer danke ich herzlichst für die Vergabe des Dissertationsthemas und die konstruktive Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Dem damaligen Direktor der Cornea- & Gewebebank der Augenklinik der HELIOS Kliniken in Schwerin, Prof. Dr. med. F. Wilhelm, und seiner Mitarbeiterin Frau K. Bruhns bin ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten für die Experimente sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen zu großem Dank verpflichtet.

Bei den Mitarbeitern des Elektronenmikroskopischen Labors der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald Frau Dr. rer. nat. R. Sietmann, Frau Meuche und Herrn Fischer bedanke ich mich für die Hilfe bei der rasterelektronenmikroskopischen Präparation der Hornhäute.

Mein Dank gilt auch dem Schlachtbetrieb Möllin in Mecklenburg-Vorpommern für die regelmäßige Bereitstellung der Untersuchungsobjekte.

Für die statistische Bearbeitung der gewonnenen Ergebnisse danke ich Frau U. von Hehn von der medistat GmbH in Kiel ganz herzlich.

Bei der Formatierung der elektronischen Daten zur endgültigen Fertigstellung der Dissertation war mir Herr B. Eng. Ch. Kehrwald von dem Fachbereich für Elektrotechnik und Informationstechnik der Ernst-Abbe-Fachhochschule in Jena eine große Hilfe. Seine Unterstützung weiß ich sehr zu schätzen.

Für die Beratung bei der Korrektur der vorliegenden Arbeit und die konstruktive Kritik bin ich Frau Dr.med. C. Werschnik sehr dankbar.

Einen ganz besonderen Dank widme ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem lieben Andreas für die langjährige Unterstützung während der Bearbeitung dieser Arbeit. Auch in den fachlichen Gesprächen mit meinem Vater fand ich große Inspiration für die Dissertation.