

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität  
Tübingen**

**Abteilung Klinische Pharmakologie**

**Leiter: Professor Dr. M. Schwab**

**Untersuchungen zur Neuroprotektion beim traumatischen  
Optikusneuropathiemodell**

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

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

**vorgelegt von**

**Filomena Quotadamo**

**aus**

**Pforzheim**

**2009**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. H. Gleiter

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-P. Thier

**Für meine lieben Eltern  
Porzia und Francesco**



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Bedeutung der traumatischen Optikusneuropathie	1
1.1.1	Das Auftreten der TON	2
1.1.2	Die Geschichte der traumatischen Sehnervschädigung	2
1.2	Histologische Grundlagen	4
1.3	Anatomische Grundlagen	4
1.3.1	Anatomie des N. opticus	4
1.3.2	Anatomie des Canalis N. optici	6
1.4	Pathophysiologie der TON	7
1.4.1	Die direkte TON	8
1.4.2	Die indirekte TON	8
1.5	Pathomechanismen	14
1.6	Therapieansätze der TON	16
1.6.1	Chirurgische Dekompression der TON	16
1.6.2	Konservativ-medikamentöse Therapie der TON	17
1.6.2.1	Glukokortikoide und ihre neuroprotektive Wirkung	17
1.6.2.2	Wirkungsmechanismus der Glukokortikoide in der Zelle	20
1.6.2.3	Funktion und die Regulation des Calciumions in der Zelle	22
1.6.2.4	Der NMDA-Rezeptor abhängige Calciuminflux	23
1.6.2.5	Calciumkanalblocker und ihre neuroprotektive Wirkung	24
1.7	Studienziel	27
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1	Tiermodell	28
2.1.1	Durchführung der Sehnervkompression	29
2.1.2	Mikroläsionsapparatur	32
2.1.3	Perfusion	33
2.1.4	Das Ganzhäutchenpräparat: Whole-mounts	34
2.1.5	Kresylviolett färbung der whole-mounts	36

---

2.1.6	Histologisch-morphologische Auswertung der retinalen Ganglienzellschicht	36
2.2	Methylprednisolon	39
2.2.1	Portimplantation	39
2.2.2	Gruppeneinteilung und Protokoll der MP-Gabe	41
2.3	Flunarizin	42
2.4	Datenverarbeitung und statistische Auswertung	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1	Die histologische und histomorphometrische Umgestaltung der retinalen Ganglienzellschicht	46
3.2	Neurone der retinalen Ganglienzellschicht (RGL)	49
3.2.1	Neuronzahl und Neuronfläche der Kontrollgruppen	49
3.2.2	Neuronzahl und Neuronfläche von Methylprednisolon (MP)	57
3.2.3	Neuronzahl und Neuronfläche von Flunarizin (FLU)	65
3.2.4	Neuronzahl und Neuronfläche von Flunarizin (FLU) und Methylprednisolon (MP) im Vergleich	73
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	81
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
4.1	Die Schwierigkeit der Etablierung einer Standardtherapie für die TON und ihre Diagnostik	84
4.2	Das Tiermodell	85
4.2.1	Die Läsionsapparatur	85
4.2.1.1	Zeitpunkt der Perfusion	88
4.2.1.2	Wird die Netzhaut gleichmäßig geschädigt?	90
4.2.2	Histomorphometrische Auswertung	91
4.2.3	Histomorphometrische Evaluation	92
4.2.3.1	Die objektive Prüfung der Sehfunktion	94
4.2.3.2	Die Beurteilung der Ganzhäutchenpräparat-Färbung mit CV (Kresylviolett)	95

4.3	Gegenwärtiger Stand und neue Behandlungsansätze der traumatischen Optikusneuropathie	97
4.3.1	Die chirurgische Therapie der TON	97
4.3.2	Die konservativ-medikamentöse Therapie der TON	99
4.4	Neue Behandlungsansätze der TON	107
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>128</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>129</b>

## Darstellungsverzeichnis

- Abb. 1 Der anatomische Verlauf des N. opticus
- Abb. 2 Pathophysiologische Erklärungsmodelle nach *Osguthorpe Sofferman* (Osguthorpe und Sofferman 1988)
- Abb. 3 Sicht auf den Sehnerven
- Abb. 4 Positionierung der Basisplatte unter dem Sehnerven
- Abb. 5 Sehnervkompression
- Abb. 6 Schematische Darstellung der kalibrierten Sehnervkompression. Modifiziert nach *Gellrich* (Gellrich 1995)
- Abb. 7 Whole-mounts beider Netzhäute mit Kennzeichnung der Netzhautlappen L1 bis L5. Modifiziert nach *Zerfowski* 1999
- Abb. 8 Übersichtsvergrößerung (10fach) einer ungeschädigten linken Netzhaut mit Papillenregion am unteren linken Bildrand
- Abb. 9 40fache Vergrößerung derselben linken Netzhaut wie in Abb. 8
- Abb. 10 40fache Vergrößerung einer kompressionsgeschädigten rechten Netzhaut (entspr. Abb. 9)
- Abb. 11 Relative Neuronzahl nach NaCl- bzw. Cyclodextrin-Behandlung
- Abb. 12 Differenz der Neuronzahl (GF li.-GF re.) der NaCl- und Cyclodextrin-Gruppe
- Abb. 13 Relative Neuronfläche nach NaCl- bzw. Cyclodextrin-Behandlung
- Abb. 14 Differenz der Neuronfläche (GF li.-GF re.) der NaCl- und Cyclodextrin-Gruppe
- Abb. 15 Relative Neuronzahl nach Methylprednisolon- bzw. NaCl-Behandlung
- Abb. 16 Differenz der Neuronzahl (GF li.-GF re.) der MP- und NaCl-Gruppe
- Abb. 17 Relative Neuronfläche nach Methylprednisolon- bzw. NaCl-Behandlung
- Abb. 18 Differenz der Neuronfläche (GF li.-GF re.) der MP- und NaCl-Gruppe
- Abb. 19 Relative Neuronzahl nach Flunarizin- bzw. Cyclodextrin-Behandlung

- Abb. 20* Differenz der Neuronzahl (GF li.-GF re.) der FLU- und Cyclodextrin-Gruppe
- Abb. 21* Relative Neuronfläche nach Flunarizin- bzw. Cyclodextrin-Behandlung
- Abb. 22* Differenz der Neuronfläche (GF li.-GF re.) der FLU- und Cyclodextrin-Gruppe
- Abb. 23* Relative Neuronzahl nach Flunarizin- bzw. Methylprednisolon-Behandlung
- Abb. 24* Differenz der Neuronzahl (GF li.-GF re.) der FLU- und MP-Gruppe
- Abb. 25* Relative Neuronfläche nach Flunarizin- bzw. Methylprednisolon-Behandlung
- Abb. 26* Differenz der Neuronfläche (GF li.-GF re.) der FLU- und MP-Gruppe
- Abb. 27* Zusammenfassung der Neuronzahl R/L-Quotienten aller Substanzen
- Abb. 28* Zusammenfassung der Neuronfläche R/L-Quotienten aller Substanzen
- Abb. 29* Erklärungsmodell für die stärkere Schädigung zentraler Sehnerv- bzw. Netzhautanteile durch Kompression
- Abb. 30* Schematische Darstellung der Retinaschichten

**Tabellenregister**

Tab. 1	Unterteilung des Nervus opticus mit jeweiliger Länge, Blutversorgung und Besonderheiten (Frenkel und Spoor 1988)
Tab. 2	Zusammenfassung der Pathogenese, klinischen Befunde und Behandlung der TON, modifiziert nach <i>Lesse!</i> (Lesse! 1991)
Tab. 3	Systemische Wirkungen der Glukokortikoide
Tab. 4	Gruppeneinteilung
Tab. 5	Neuronzahlen von Kontrollgruppe NaCl und Cyclodextrin
Tab. 6	Statistische Auswertung der Neuronzahlen der traumatisierten rechten Netzhäute von NaCl und Cyclodextrin
Tab. 7	Neuronfläche von Kontrollgruppe NaCl und Cyclodextrin
Tab. 8	Statistische Auswertung der Neuronfläche der traumatisierten rechten Netzhäute von NaCl und Cyclodextrin
Tab. 9	Neuronzahlen von Methylprednisolon und NaCl
Tab. 10	Statistische Auswertung der Neuronzahlen der traumatisierten rechten Netzhäute von Methylprednisolon und NaCl
Tab. 11	Neuronfläche von Methylprednisolon und NaCl
Tab. 12	Statistische Auswertung der Neuronfläche der traumatisierten rechten Netzhäute von Methylprednisolon und NaCl
Tab. 13	Neuronzahl von Flunarizin und Cyclodextrin
Tab. 14	Statistische Auswertung der Neuronzahlen der traumatisierten rechten Netzhäute von Flunarizin und Cyclodextrin
Tab. 15	Neurofläche von Flunarizin und Cyclodextrin
Tab. 16	Statistische Auswertung der Neuronfläche der traumatisierten rechten Netzhäute von Flunarizin und Cyclodextrin
Tab. 17	Neuronzahl von Flunarizin und Methylprednisolon
Tab. 18	Statistische Auswertung der Neuronzahlen der traumatisierten rechten Netzhäute von Flunarizin und Methylprednisolon
Tab. 19	Neuronfläche von Flunarizin und Methylprednisolon
Tab. 20	Statistische Auswertung der Neuronfläche der traumatisierten rechten Netzhäute von Flunarizin und Methylprednisolon

Tab. 21 Unterschiedliche Merkmale der Apoptose und Nekrose  
(Padosch u. Vogel 2001)

**Abkürzungen**

BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor, Brain Derived
Crush	Quetschung
CV	Kresylviolett
EPO	Erythropoietin
FLU	Flunarizin
GF	Gesichtsfeld
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
li	links
MP	Methylprednisolon
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury Study
NGF	neurotrophic growth factor
N. opticus	Nervus opticus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT3	Neurotrophin-3
QWIN	Softwareeigenname der Firma Leica
re	rechts
RGC	retinale Ganglienzellen
RGL	retinale Ganglienzellschicht
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
SCI	spinales Trauma, spinal cord injury
TONL	traumatic optic nerve lesion
TON	traumatische Optikusneuropathie
Whole-mount	Ganzhäutchenpräparat
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung der traumatischen Optikusneuropathie

Die traumatische Optikusneuropathie (TON) ist eine akut visusbedrohende Erkrankung, bei welcher es zu einer Schädigung des N. opticus kommt (Schmidbauer 1998). Es wird unterschieden zwischen einer direkten Optikus-schädigung z.B. durch Einwirkung spitzer Gegenstände auf den N. opticus und einer indirekten. Die direkten Optikusverletzungen entstehen durch partielle oder vollständige Sehnervabrisse, Durchtrennungen oder Defektverletzungen. Die indirekten Optikusschädigungen treten durch Kompressionen, Kontusionen oder Scherkraftverletzungen auf, die über die umgebenden Knochenstrukturen auf den Sehnerv übertragen werden (Lessel 1989). Die Visusminderung kann sofort oder verzögert einsetzen und kann temporär aber auch permanent bis hin zur Avulsion des Sehnerven reichen (Frenkel und Spoor 1988).

An der Diagnose und Therapie sind alle kopfchirurgischen Disziplinen in enger Zusammenarbeit beteiligt. Dies stellt eine große Herausforderung für alle Beteiligten dar, denn es gilt das visuelle System nicht zu beeinträchtigen (Gellrich 1999). Abhängig von dem Allgemeinzustand des Patienten variieren die verschiedenen Möglichkeiten der Diagnostik. Zum einen kann sie beim wachen ansprechbaren Patienten über eine klinische Untersuchung erfolgen. Bei sedierten oder inhibierten Patienten ist das Vorgehen erschwert, weil sie neuroophthalmologisch nicht zu untersuchen sind. Bei den sedierten Patienten liegt aufgrund der Morphingabe eine Beeinträchtigung der Pupillomotorik vor, die die neuroophthalmologische Untersuchung unmöglich macht. Zu dem ist der Augenhintergrund meist wegen Blutungen nicht einsehbar und entzieht sich somit der Diagnostik. Dies hat zur Folge, dass Afferenzschäden des peripheren visuellen Systems erst einige Tage nach dem Unfallereignis diagnostiziert werden (Gellrich et al. 1997).

Seit der Veröffentlichung über Früherkennung und Behandlung der indirekten TON von *Barkan* und *Barkan* im Jahre 1928 gab es keine neuen Erkenntnisse (Barkan und Barkan 1928). Es werden zum Teil noch die so genannten "wait and see" Ansätze angewandt, die nicht mehr länger tragbar sind (Gellrich et al. 1997).

### 1.1.1 Das Auftreten der TON

Bei kopfverletzten Patienten mit Mittelgesichts- oder Schädelbasisfrakturen tritt nicht selten eine Schädigung der Sehbahn ein. In über einem Drittel aller Gesichtsschädelfrakturen werden Augenverletzungen beschrieben, wovon ca. 3% zu einer Erblindung führen (Holt und Holt 1983). *Al-Qurainy et al.* gibt die Inzidenz der traumatischen Optikusneuropathie bei Mittelgesichtsfrakturen mit 2,5% an (Al-Qurainy et al. 1991). Eine Verletzung des N. opticus ist nach der des N. olfactorius und des N. facialis die dritthäufigste Hirnnervenverletzung (Behrens-Baumann und Chilla 1984). In der Regel ist die traumatische Sehnervschädigung (**T**raumatic **O**ptic **N**erve **L**esion, TONL) ein akut eintretendes Krankheitsbild. Ca. 20% aller frontobasalen Verletzungen weisen eine Sehbahnschädigung auf, wobei häufig der intrakanalikuläre Abschnitt des N. opticus beteiligt ist (Beuthner 1974). Eine Schädigung des visuellen Systems tritt häufig nach frontalen (72%) oder frontotemporalen (12%) Verletzungen ein (Barkan und Barkan 1928, Kline et al. 1984).

### 1.1.2 Die Geschichte der traumatischen Sehnervschädigung

Einige Autoren behaupten Hippokrates lieferte die erste Beschreibung einer indirekten traumatischen Optikusneuropathie vor 2400 Jahren (Anand et al. 1991, Jorissen und Feenstra 1992) als er schrieb: „dimness of vision occurs in injuries to the brow, and is less noticeable the more recent the wound, but as the scar becomes old so the dimness increases“. Dabei beschrieb er

wahrscheinlich einen Katarakt oder ein Glaukom. Dass Hippokrates Kontakt zu einem sogar in der Ophthalmologie seltenen Krankheitsbild hatte, ist kaum vorstellbar (Berestka und Rizzo 1994).

2% aller geschlossenen Schädel-Hirn-Traumen sind mit einer Verletzung des visuellen Systems vergesellschaftet (Osguthorpe und Sofferman 1988), dies entspricht 200 Verunfallte pro 100.000 Personen in der Bevölkerung pro Jahr (Berestka und Rizzo 1994). Somit relativiert sich die Annahme, dass Hippokrates tatsächlich mit Patienten, die an einer indirekten traumatischen Optikusneuropathie litten, konfrontiert war (Bilyk und Joseph 1994).

Stellvertretend für die Literatur des 19. Jahrhunderts stehen Forschungsergebnisse über Störungen des visuellen Systems von *Berlin* (Berlin 1879). Dabei konzentrieren sich die Untersuchungen über mögliche Pathomechanismen auf die Sektion von Verstorbenen (Berestka und Rizzo 1994). Durch die Erfindung des Ophthalmoskops im letzten Jahrhundert konnten die hinteren Augenabschnitte eingesehen werden. Somit wurde die Feststellung der Papillenabblassung als morphologisches Korrelat einer Sehnervschädigung durch *Nuhn* 1845 ermöglicht (Osguthorpe und Sofferman 1988). *Pringles* Veröffentlichung aus dem Jahre 1922 berichtete von der ersten operativen Dekompression des N. opticus, die in zwei Fällen über einen orbitalen Zugang durchgeführt wurde (Pringle 1922).

Die frontotemporale Kraniotomie als operativer Zugang wurde während der beiden Weltkriege etabliert, da sich die Fälle von Amaurose häuften. Hierbei handelt es sich um ein intrakranielles Vorgehen. Der transethmoideale Zugang, der auf *Sewall* zurückgeht, wird auch heute benutzt (Sewall 1926, Sewall 1928). Dieser ist in den Fällen sinnvoll, bei denen ein intrakranielles Vorgehen nicht benötigt wird und somit die mit der Anhebung des Lobus frontalis verbundene Morbidität für die Patienten reduziert wird (Niho et al. 1970). Im Gegensatz zu Japan, wurden in Europa und USA Dekompressionen des N. opticus seltener beschrieben. *Fukado* berichtet im Rahmen seiner Studien über 700

Dekompressionen in einem Institut (Fukado 1981). Über den geeigneten Zeitpunkt einer Dekompression des N. opticus herrscht keine einheitliche Meinung.

## **1.2 Histologische Grundlagen**

Aus entwicklungsgeschichtlicher Sicht zählt der informationsverarbeitende und lichtempfindliche Abschnitt des Auges zu einem in den Gesichtsschädelbereich verlagerten Teil des zentralen Nervensystems (Gellrich et al.1996). Die Retina ist ein gut zugänglicher Teil des zentralen Nervensystems mit einer gut definierten zytologischen Architektur (Isenmann 2003). Die Rezeptorzellen und die Bipolarzellen stellen die beiden ersten Verschaltungsebenen in der Retina dar und zeigen bei Erregung durch einen Lichtreiz eine Änderung des Membranpotentials an. Die retinale Ganglienzelle (RGC) ist die dritte Verschaltungsstelle und der Ort, an dem erstmalig Aktionspotentiale entstehen. Diese werden über Axone der RGC im Sehnerv nach zentral fortgeleitet. Nach Austritt aus dem Bulbus sind die Axone myelinisiert. Die Myelinscheide wird im zentralen Nervensystem von den Oligodendrogliazellen formiert. An der Schädelbasis durchtritt der N. opticus die Grenze vom Gesichts- zum Hirnschädel (Eysel 1994).

## **1.3 Anatomische Grundlagen**

### **1.3.1 Anatomie des N. opticus**

Der zweite Hirnnerv (N. opticus) ist kein peripherer Nerv, sondern eine Hirnbahn und die Retina ist eine spezialisierte Struktur des Gehirns, die sich auf die Informationsverarbeitung der Lichtreize spezialisierte (Steinsapir 1999). Der N. opticus verdient eine besondere Beachtung, weil er in der Traumatologie, in der onkologischen und plastisch-rekonstruktiven Chirurgie die „Achillesferse“

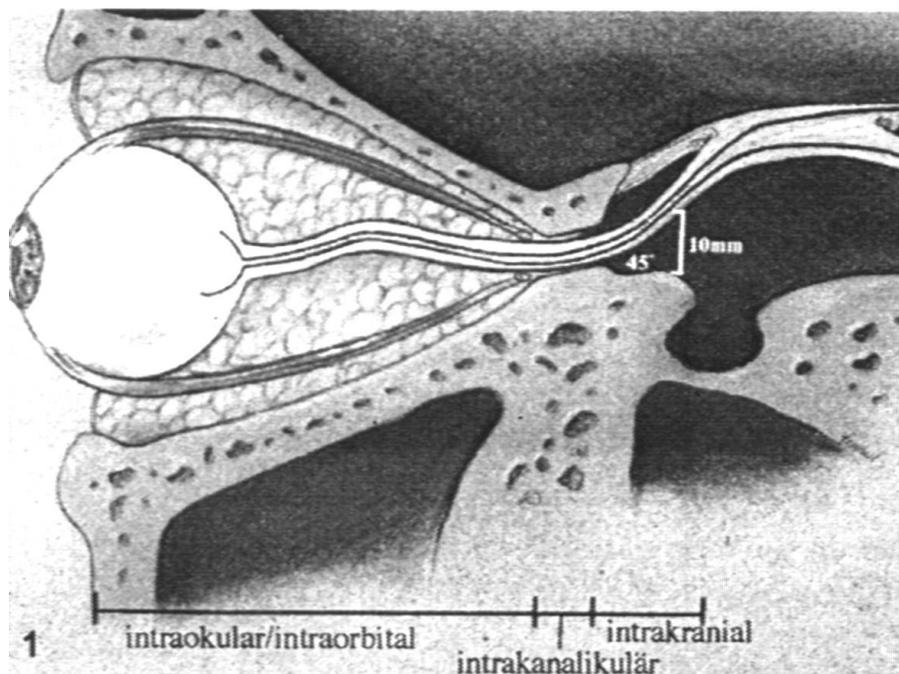
des peripheren visuellen Systems darstellt (Raveh und Vuillemin 1988). Die Durchschnittslänge des Sehnervs beträgt vom Chiasma opticum bis zum Bulbus 4 cm. Dabei lässt sich der Nerv in vier Abschnitte einteilen (siehe Tab. 1 und Abb. 1).

**Tab. 1 Unterteilung des Nervus opticus mit jeweiliger Länge, Blutversorgung und Besonderheiten (Frenkel und Spoor 1988)**

<b>Abschnitt</b>	<b>Länge</b>	<b>Blutversorgung</b>	<b>Besonderheiten</b>
<b>intraokulär</b>	ca. 1mm	Choroidea, CiliargefäÙe	-
<b>intraorbital</b>	ca. 20-30 mm	Dura, A. centralis retinae	S-förmig verlaufend
<b>intrakanalikulär</b>	ca. 4-9 mm	Piale GefäÙe aus A. carotis interna	Über die Dura fest mit dem Periost verwachsen
<b>intrakraniell</b>	ca. 10-16 mm	A. carotis interna, A. cerebri anterior, A. communicans anterior	Anstieg von 45° vom Foramen opticum bis zum Chiasma opticum

Mit Austritt aus dem Bulbus werden die Axone des N. opticus myelinisiert. Die Myelinscheide wird von der Plasmamembran der Oligodendrogliazellen gebildet. Der intraorbitale Anteil des N. opticus wird von allen drei Hirnhäuten, der Dura mater, Arachnoidea und der Pia mater, ummantelt und im orbitalen Weichgewebismantel eingebettet (Osguthorpe 1985). Nach Eintritt des N. opticus in den Canalis nervi optici beschränkt sich sein Schutzmantel auf die Meningen und die den Sehnerv begleitende A. ophthalmica (Lang 1981). Zwischen der Dura mater und der Arachnoidea erstreckt sich der Subduralraum. Der Subarachnoidalraum wird durch die Arachnoidea und Pia mater

begrenzt. Beide Räume kommunizieren mit den ihnen entsprechenden intrakraniellen Räumen. Der Subduralraum ist nicht von physiologischer Wichtigkeit und tritt nur in pathologischen Situationen, wie z.B. nach traumatischen Einblutungen in Erscheinung (Wolf 1976).



**Abb. 1** Der anatomische Verlauf des N. opticus

### 1.3.2 Anatomie des Canalis N. optici

Die Anatomie des Canalis opticus ist ausgiebig erforscht worden. Gewisse Aspekte müssen hier dargestellt werden, um ein besseres Verständnis bezüglich der indirekten TON zu gewährleisten. Die Länge des knöchernen Sehnervkanals beträgt 10 mm (Lang 1981). Während die weiteste Stelle am knöchernen Foramen opticum eine mittlere Weite von 0.62 mm aufweist, beträgt sie an der schmalsten Stelle an der lateralen Wand des Os sphenoidale nur 0.2 mm (Osguthorpe 1985). Über den Canalis opticus, der sich in der Ala minor des Os sphenoidale befindet und nicht mit orbitalen Fettpolstern ausgestattet ist, erreicht der N. opticus das Gehirn (Pomeranz et al.1999).

Dieser intrakanalikuläre Anteil des Nerven ist aufgrund seiner anatomischen Beschaffenheit durch Traumata besonders gefährdet (siehe 1.4 Pathophysiologie). Als weitere Strukturen verlaufen im Canalis opticus die A. ophthalmica, Verlängerungen der meningealen Häute und postganglionäre Fasern des sympathischen Plexus der A. carotis (Kline 1984, Dul 1993, Pomeranz et al. 1999).

#### 1.4 Pathophysiologie der TON

Ätiologisch wird das direkte vom indirekten Sehnervtrauma unterschieden (Lessel 1989). Laut *Steinsapir* wird die TON als der Verlust der visuellen Fähigkeiten, verursacht durch deformierende Kräfte auf den Sehnerv, definiert (Steinsapir 1999). Zu einem direkten Trauma kommt es durch Kontakt des Sehnerven mit einem Objekt z. B. einer Kugel oder einem Sinus-Endoskop. Das direkte Sehnervtrauma weist eine radiologisch nachvollziehbare Kompression durch knöcherne Fragmente, penetrierende Fremdkörper oder Fraktur des Sehkanals auf. Im Gegensatz dazu liegt ein indirektes Trauma vor, wenn die deformierende Kraft über die Schädelknochen oder Bulbusrotationen indirekt auf den Sehnerv übergeht. Laut der Veröffentlichung von *Kline et al.* kann bei dem indirekten Sehnervtrauma eine Unterscheidung in eine anteriore und eine posteriore Form aufgezeigt werden (Kline et al. 1984). Die indirekte TON liefert kein röntgenologisches Korrelat einer Verletzung des orbitalen, intrakanalikulären oder intrakraniellen N. opticus (Gossman et al. 1992).

Die Verletzungen des N. opticus können auf der Basis der Anatomie nach klinisch klaren Kriterien unterschieden werden (Steinsapir und Goldberg 1994). Eine der praktischen Methoden einen Patienten bezüglich seiner vermuteten TON zu klassifizieren, ist es den Unfall als direkte TON, anteriore indirekte TON, posteriore indirekte TON und chiasmatische Schädigung zu kategorisieren (Bilyk und Joseph 1994).

### **1.4.1 Die direkte TON**

Verschiedene Verletzungsmechanismen (siehe *Abb. 2*) führen dazu, dass die unterschiedlichsten anatomischen Segmente des Sehnerven betroffen werden. Der intraokuläre und intraorbitale Anteil des N. opticus kann auf direkte Verletzung wie durch spitze Gegenstände oder Schussverletzungen etc. betroffen sein (Luxenberger et al. 1998). Dennoch ist die direkte TON nicht häufig, trotz des einfachen Verletzungsmusters. Dies lässt sich durch die anatomischen Gegebenheiten des Verlaufs des intraorbitalen Anteils des N. opticus, der charakterisiert ist durch die Bewegungsfreiheit und dem S-förmigen Verlauf des Nerven in der Orbita, dem ihm umgebenden orbitalen Weichgewebismantel und den extraokulären Muskeln, erklären (Kline et al. 1984, Bilyk und Joseph 1994). Dies ist mit dem intrakraniellen Anteil zu vergleichen, der aufgrund seiner Motilität im Schädel sehr selten in ein Trauma involviert wird (Kline 1984).

### **1.4.2 Die indirekte TON**

Es wird bei der indirekten TON eine anteriore von einer posterioren Form unterschieden. Bei der seltenen anterioren Variante der TON ist der intraokuläre Anteil des N. opticus oder der Teil des Nerven vor Eintritt der A. centralis retinae betroffen (Hedges 1981). Ophthalmoskopisch lassen sich Veränderungen erkennen, wie zum Beispiel ein Verschluss der A. centralis retinae mit einer ödematösen Retina, eine abgeblasste Papille und einem kirschroten Fleck in der Makula (Kline 1984). Die Therapiemöglichkeiten sind limitiert. Im Falle von Verletzungen muss eine klinische Untersuchung im Sinne einer Exploration des Bulbus gefordert werden, da Bulbusrupturen und Avulsion der extraokulären Muskeln mit diesem Krankheitsbild assoziiert sind (Bilyk und Joseph 1994).

Die posteriore Variante ist die häufigste indirekte TON. Die Mechanismen, die zu dieser führen, sind gegenwärtig nicht ausreichend aufgeklärt. Die makroskopisch sichtbaren Veränderungen der TON resultieren aus den mikroskopisch kleinen Verletzungen des N. opticus und seiner umgebenden Strukturen (Steinsapir und Goldberg 1994), verursacht durch (s. *Abb. 2*):

- Kompression durch Schockwellen (elastische Verformung)
- Fraktur des Canalis opticus mit knöcherner Kompression des N. opticus
- Kontusion
- Hämorrhagie/Hämatom
- Ödem
- Kallusbildung

Andere mögliche Mechanismen, einschließlich der Lipidperoxidation von freien Radikalen, zellulärer Azidose, erhöhtes intrazelluläres Calcium und Bradykinin spielen ebenfalls eine Rolle (siehe 1.5).

Der N. opticus ist im knöchernen Kanal in seiner Bewegungsfreiheit eingeschränkt, weil die Dura mit der Periorbita verbunden ist. Folglich kann sich jede Krafteinwirkung des perikanalikulären Bereiches ungehindert auf den Sehnerven übertragen. Während der Subarachnoidalraum um den intraorbitalen Anteil des Sehnerven relativ weit ist, wird der intrakanalikuläre Anteil sehr straff von den Sehnervenscheiden ummantelt. Zusätzlich zeigen laserinterferometrische Untersuchungen, dass sich die Gewalteinwirkungen im Bereich des knöchernen Kanals konzentrieren und sogleich ein Druckmaximum aufbauen (Schmidbauer et al. 1998, Gellrich 1998), wenn die deformierenden Kräfte auf die Mittelgesichts-, Supraorbital- und Stirnregion einwirken (Zerfowski 1999). Dies kann zu elastischen Verformungen oder auch zu Frakturen des Canalis opticus führen (Barkan und Barkan 1928).

Die Frakturen, die den Sehnerven verletzen können, ereignen sich im Canalis opticus, im Orbitadach, an der Hinterwand des Os ethmoidale und am

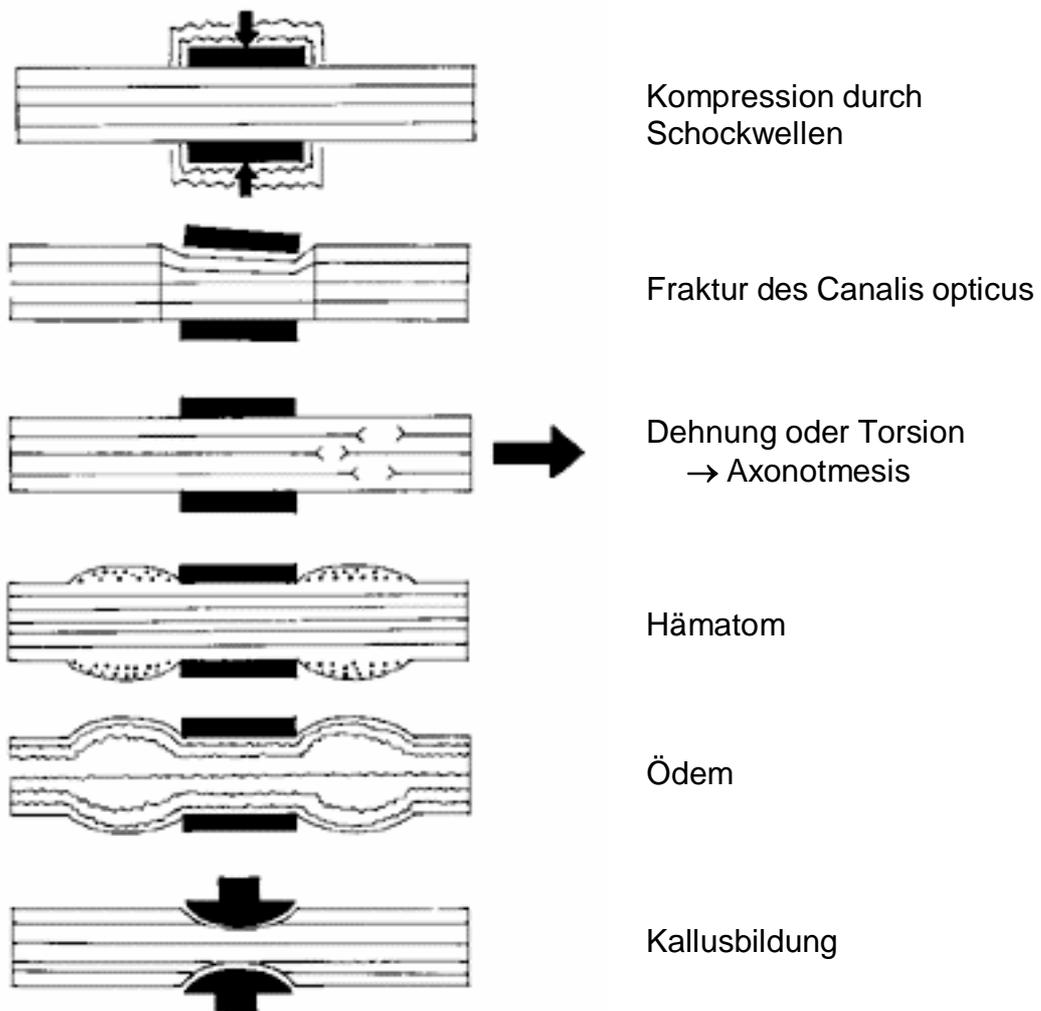
Processus clinoideus anterior. Frakturen und Fragmentdislokationen im knöchernen Kanal sind jedoch extrem selten (Jorissen und Feenstra 1992). Die meisten Traumata führen nur zu einer elastischen Verformung, ohne jegliche Hinweise auf eine Fraktur (Osguthorpe und Sofferman 1988).

Durch bindegewebige Adhäsionen, welche die Dura mit dem knöchernen Canalis nervi optici verbinden, erfährt der N. opticus eine Fixierung mit seiner umgebenden Struktur, dem Canalis opticus, und ist folglich im Falle einer elastischen Verformung des Sehkanals einer erhöhten Traumatisierung ausgesetzt (Frenkel und Spoor 1988).

Pathophysiologisch liegt bei einer Kontusion des Sehnerven eine Axonotmesis und Wallersche Degeneration, aber auch eine Störung der Gefäßversorgung mit anschließender Thrombosierung, Infarzierung und Hämatombildung vor (Zerfowski 1999). Die Kontusion ist histologisch definiert als struktureller Umbau neuronalen Gewebes. Charakteristisch hierfür ist die Extravasation von Blut und der Zelltod (Prepared by the Ad Hoc Committee of the Congress of Neurological Surgeons 1966). *Walsh* zählte die Kontusion zu den primären Schädigungsmechanismen der indirekten TON, welche von Scherkräften auf den Sehnerven übertragen werden (Walsh 1966).

Die hämorrhagische Infarzierung des Sehnerven erfolgt meist im Bereich des Canalis nervi optici. Die Hämorrhagie findet im Sehnerv selbst oder in seinen Nervenscheiden statt und kann nach intradural, subdural oder subarachnoidal erfolgen. Dadurch wird der Visusverlust verursacht oder stellt eine Begleiterscheinung dessen dar (Kline 1984). *Pringle* führte 137 post mortem Untersuchungen durch, in denen er Blut in den Sehnervscheiden identifizierte und postulierte, dass die Kompression verursacht durch das Blut Sehnervschäden hervorrufe. Danach operierte er drei Patienten, die ein geschlossenes Schädel-Hirn-Trauma erlitten hatten und befreite den Sehnerv von den Einblutungen, doch es stellte sich keine Visusverbesserung ein (Pringle 1922).

Eine sekundäre Kompression mit nachfolgender Ischämie kann durch ein Sehnervödem mit Schwellung innerhalb des Sehnervkanals verursacht sein (Walsh 1966), wobei es keinesfalls erwiesen ist, dass ein Ödem eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der TON einnimmt. Hinweise deuten daraufhin, dass die Astrozytenschwellung innerhalb des N. opticus nach einem Trauma weniger ausgeprägt ist als im Gehirn (Maxwell 1991). Die Kallusbildung nach Frakturheilung, eine sekundäre Traumafolge, stellt mögliche Ursache für eine retardierte Visusverschlechterung nach längerer Latenz dar (Zerfowski 1999). Ob nun der intrakanalikuläre Anteil des Sehnerven infolge einer Überdehnung oder einer Kontusion eines knöchernen Fragmentes geschädigt wird, das Resultat ist dasselbe. Alle pathophysiologischen Mechanismen können zu einer potentiell reversiblen Amaurose führen, die durch mikrovaskuläre Spasmen, Hämorrhagie und Ödeme gekennzeichnet wird (Osguthorpe 1988).



**Abb. 2** Pathophysiologische Erklärungsmodelle nach *Osguthorpe und Sofferman*  
(Osguthorpe und Sofferman 1988)

**Tab. 2 Zusammenfassung der Pathogenese, klinischen Befunde und Behandlung der TON, modifiziert nach Lesse! (Lesse! 1991)**

<b>Art der TON</b>	<b>Pathogenese</b>	<b>Klinische Befunde</b>	<b>Behandlung</b>
<b>Direkte</b>	Ein Objekt penetriert die Orbita und verletzt direkt den N. opticus: komplette oder teilweise Durchtrennung des Sehnerv; Sehnervkontusion; Kompression durch Hämorrhagie oder Fremdkörper	Initial variables Visusstadium mit nachfolgender Visusverschlechterung. Eintrittspforte kann klein sein. Entstehung eines orbitalen Kompartment-Syndroms bei orbitaler Hämorrhagie. Im CT vergrößerte Sehnervscheide sichtbar	Entfernung des Fremdkörpers falls Visusverschlechterung eintritt. Durchführung einer lateralen Kanthotomie und Kantholyse falls ein orbitales Kompartment-Syndrom vorliegt. Sehnervscheidenschlitzung bei Hämatom oder Ödem
<b>Anteriore indirekte</b>	Schädigung des anterioren Segmentes des Sehnervs gewöhnlich an der Lamina cribrosa verursacht durch Rotation oder Verschiebung des Bulbus mit einem Finger oder anderen Objekten selten	Papillenödem; retinales Ödem; Komplette oder unvollständige Avulsion des N. opticus; Okklusion der A. centralis retinae	Behandlung der Okklusion der A. centralis retinae. Exploration des Bulbus auf okkulte Bulbusruptur oder Avulsion der extraokulären Muskeln
<b>Posteriore indirekte</b>	Häufigste Form der indirekten TON. Meist durch eine frontale oder eine das Mittelgesicht betreffende Krafteinwirkung. Die Schädigung kann ohne von außen schwerwiegend zu wirken, gravierend sein.	Keine ophthalmoskopischen Zeichen einer Schädigung sichtbar. Afferenter Pupillendefekt. Sofortiger Visusverlust ist gewöhnlich. Verspäteter oder progressiver Visusverlust ist sehr untypisch. Mittelgesichtsfrakturen und Bewusstlosigkeit sind mit dieser art der Verletzung vergesellschaftet. Im CT sichtbare Fraktur des Canalis opticus korreliert nicht mit der Schwere der TON	Kontrovers: Beobachtung. Megadosissteroidtherapie, Dekompression des Sehnervkanals. Weitere Erläuterung siehe 1.7 Therapieansätze

Der Sehverlust tritt sofort nach dem Trauma ein, wobei klinisch nicht unterschieden werden kann, welche Läsionsmechanismen den Hauptanteil zur Visusminderung beigetragen haben. Die traumatische Optikusschädigung ist die Summe diverser Läsionsmechanismen, teils mechanischer, teils vaskulärer, teils biochemischer Art (Schmidbauer 1998). Bei der indirekten posterioren TON liegt ein Sehnervschaden in Abwesenheit fundoskopischer Veränderungen vor (Kline 1984, Bilyk und Joseph 1994).

## 1.5 Pathomechanismen

Die primäre Schädigung entsteht durch das direkte Trauma auf den Sehnerven, d.h. durch Läsionen der Axone im Augenblick des Traumas über Scherkräfte. Die Therapie ist hier erschwert und eine Heilung nicht möglich (Walsh 1966, Spoor 1990). Die sekundären Schädigungen des Sehnerven zeigen sich erst einige Zeit nach dem Trauma. Hier setzen die therapeutischen Angriffspunkte an. Ein schnelles und adäquates Einschreiten könnte die sekundären Schäden abwenden oder zumindest entschärfen (Spoor und McHenry 1996). Unter sekundäre Schädigungen versteht man ein Kontusionsödem und Vasospasmen, die eine Schwellung des Sehnerven im knöchernen Kanal nach sich ziehen und somit eine sekundäre Ischämie mit Anstieg der freien Radikale zur Folge haben (Walsh 1966). Infolgedessen ist die TON eine Summe vieler Schädigungsmechanismen. Basierend auf Ergebnissen nach Rückenmarkstraumata folgt eine Auflistung der sekundären Verletzungsmechanismen (Kline et al. 1984, Steinsapir und Goldberg 1994).

Primäre Verletzungsmechanismen des N. opticus:

- Kompression
- Kontusion
- Konkussion
- Defektverletzung, z.B. aufgrund von scharfen Gegenständen  
Abriss

Sekundäre Verletzungsmechanismen des N. opticus:

- Vaskulär bedingte Änderungen
- Blutflussminderung
- Einblutungen, Hämatom

Biochemische Änderungen:

- Arachidonsäurefreisetzung
- Entstehung freier Radikale
- Lipidperoxidation
- örtliche Konzentrationszunahme von Neurotransmittern z.B. Glutamat
- Ödem
- Unterbindung der Zirkulation mit einer Ischämieverstärkung im
- Sinne eines Kompartment-Syndroms

Die Ursache der verzögerten Neuronendegeneration, die den sekundären Verletzungsmechanismen entsprechen, sind biochemische Pathomechanismen. Diese Reaktionsvorgänge wurden Arbeiten über Pathomechanismen nach spinalen Traumata entnommen. Da der N. opticus im Gegensatz zum Rückenmark aus reiner weißer Substanz besteht und eine nach außen verlagerte Hirnbahn darstellt, lassen sich nicht prinzipiell alle bei Rückenmarkstraumata erschienenen Pathomechanismen auf den Sehnerv übertragen, gelten aber in geringer Modifikation auch für die TON (Simpson et al. 1991). Eine bedeutende Rolle dabei spielt die Wirkung der freien Radikale, die während einer Ischämie freigesetzt werden. Von weiterer entscheidender Bedeutung im Rahmen der Neuronendegeneration ist einerseits der intrazelluläre Calciumanstieg und die Freisetzung der exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), andererseits die der Kinine Bradykinin und Kallidin. Die zellvermittelten Entzündungsvorgänge scheinen zudem einen neuronalen Untergang zu fördern (Steinsapir und Goldberg 1994). Teilweise lässt sich die neuroprotektive Wirkung der Glukokortikoide nach einem ZNS-Trauma unter anderem auch der Inhibition

dieser zellvermittelten Entzündungsreaktionen zuschreiben (Simpson et al. 1991).

## 1.6 Therapieansätze der TON

### 1.6.1 Chirurgische Dekompression der TON

Das Ziel der chirurgischen Intervention liegt in der mechanischen Entlastung des N. opticus, besonders des intrakanalikulären Anteils des Sehnerven. Kontrovers diskutiert wird nicht nur das Ausmaß des chirurgischen Eingriffs (Sofferman 1981), sondern auch die Art des operativen Zuganges (Jorissen und Feenstra 1992). Der genaue Zeitpunkt der Dekompression im Hinblick auf einen Benefit für den Verunfallten ist bis in die heutige Zeit immer noch unklar. Eine eindeutige Indikation zur chirurgischen Dekompression ist dann gegeben, wenn ein retrobulbäres Hämatom die Schädigungsursache darstellt. Hier ist eine notfallmäßige laterale Kanthotomie zur Entlastung des N. opticus angezeigt (Gellrich 1999). Aber schon *Barkan* und *Barkan* wiesen im Jahre 1928 auf eine frühestmögliche Dekompression hin (Barkan und Barkan 1928). Für Verwirrung in der internationalen Literatur sorgt die Veröffentlichung von *Fukado* aus dem Jahre 1981, in der erfolgreiche Dekompressionen noch 90 Tage nach dem schädigenden Trauma beschrieben werden (Fukado 1981). Zu Recht wird der Aussagewert dieser Arbeit angezweifelt (Steinsapir und Goldberg 1994), dennoch zeigt diese die noch bis zum heutigen Tage bestehenden Mängel der meisten Studien auf:

- Fehlen deutlicher Ein- und Ausschlusskriterien
- Verschiedenartige Dokumentation der morphologischen und funktionellen Traumafolgen
- Nichtvergleichbarkeit der Kollektive

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass bis heute keine klar definierten, bindenden Therapierichtlinien, sondern nur Empfehlungen zur Behandlung der traumatischen Optikusneuropathie existieren. Über den Stellenwert der chirurgischen Dekompression der TON besteht noch keine deutliche Aussage. Schon *Steinsapir* und *Seiff* schrieben 2002, dass jeder behandelnde Arzt individuelle Entscheidungen mit dem Patienten im Hinblick auf das weitere Procedere nach der TON treffen müssen (Steinsapir und Seiff 2002).

## **1.6.2 Konservativ-medikamentöse Therapie der TON**

### **1.6.2.1 Glukokortikoide und ihre neuroprotektive Wirkung**

Basierend auf klinischen und tierexperimentellen Studien nach Rückenmarkstrauma ist momentan Methylprednisolon beim Menschen das einzige therapeutische Agens, das für die akute Behandlung traumatischer Rückenmarksverletzungen zugelassen ist. In der Literatur werden initiale Dosierungen von 30 - 60 mg/kg i.v. 5 min nach dem Trauma angegeben (Behrmann 1994 und Koc 1999). Des Weiteren kann zudem eine kontinuierliche Gabe von 5.4 mg/kg/h für 24 h folgen (Rabchevsky 2002). Eine Verdoppelung dieser Dosis bringt paradoxerweise keinen neuroprotektiven Effekt, sondern eher ein Fortschreiten der Lipidperoxidation und des Gewebeschadens (Young 1993b). Das therapeutische Zeitfenster von MP beträgt 8 Stunden. Die NASCIS I und II (**N**ational **A**cute **S**pinal **C**ord **I**njury **S**tudy) sind die einzigen randomisierten doppelblind kontrollierten Studien, die eine akzeptierte Richtlinie in der Therapie der traumatischen Rückenmarksverletzungen liefern (Molloy 2002). In den USA kann ein Arzt in ein Gerichtsverfahren involviert werden, wenn er nicht das Protokoll, das sich aus der NASCIS Studie ableitet, befolgt. Da der N. opticus eine Bahn des zentralen Nervensystems darstellt, können einige Überlegungen bezüglich der Behandlung des spinalen Rückenmarkstrauma (SCI: **S**pinal **C**ord **I**njury) übernommen werden. Jedoch

liegen wichtige Unterschiede zwischen dem Rückenmark und dem N. opticus vor. Das Rückenmark besteht aus grauer und weißer Substanz, während der N. opticus, wie schon erwähnt, sich nur aus weißer Substanz zusammensetzt, mit seinen Zellkörpern und den Ganglienzellen in der Retina. Bei Trauma des N. opticus ist primär nur eine Schädigung der weißen Substanz zu erwarten (Steinsapir und Seiff 2002). Unterdessen wird die graue Substanz sekundär über Glutamat in der Retina geschädigt (Steinsapir und Goldberg 2000).

Dem SCI und der TON liegen zwei kombinierte Faktoren zugrunde. Zum einen die primäre Schädigung, die mechanisch und direkt erfolgt, zum anderen die sekundäre Schädigung, die mit einer gewissen Latenz eintritt und im Wesentlichen ein metabolisches Geschehen in den neuronalen Zellen darstellt. Es zeigt sich das Bild eines Insults (Benzel 1990). Die sekundäre Schädigung gilt es zu verhindern. Die sekundäre Schädigung, die durch Lipidperoxidation und durch Calcium aktivierte Phospholipasen entsteht, führt zum raschen Zelltod. Die zugrundegegangenen Zellen schütten calciumbindende Substanzen aus, welche eine Reduktion des extrazellulären Calciums und zeitgleich eine protektive Wirkung auf die überlebenden Neuronen zur Folge hat (Yoon 1999, Kim 1999).

Der neuroprotektive Effekt der Glukokortikoide beruht auf einem anti-inflammatorischen, antiödematösen und antioxidierenden Effekt. Zugleich ist eine Vermeidung eines Vasospasmus, eine Reduktion von Nervenzellnekrosen und eine Hemmung der gliofibrösen Vernarbung des traumatischen N. opticus bewiesen (Hall und Braughler 1982).

Das in dieser Studie verwendete synthetisch hergestellte Glukokortikoid Methylprednisolon verhindert die durch freie Radikale mediierte Lipidperoxidation und ermöglicht die neuronale Regeneration. Aufgrund der Stöchiometrie muss für jedes produzierte freie Radikal ein Molekül Glukokortikoid verabreicht werden. So lässt sich die Megakortikosteroidtherapie von 30 mg/kg/KG und 5,4 mg/kg/KG über 24 h erläutern. Die Therapie sollte nicht später als acht Stunden

nach dem Trauma erfolgen, denn eine Studie von *Young* und *Bracken* zeigt nicht nur einen Erhalt des Zustandes des Verunfallten, sondern auch eine Verschlimmerung des Zustandes, wenn die Verabreichung des Methylprednisolon acht Stunden posttraumatisch stattfand (Young und Bracken 1992). Allerdings herrscht immer noch Unklarheit in der internationalen Literatur, nicht nur bezüglich der Wahl des Wirkstoffes und dessen Applikationsart, sondern auch im Hinblick auf Therapiebeginn und -dauer (Spoor 1990).

Ein weiterer Effekt ist die direkt vasodilatierende Wirkung auf zerebrale Gefäße (Demopoulos 1982). Glukokortikoide sind sehr potente antiinflammatorisch wirkende Substanzen. Sie blockieren die Chemotaxis, die Phagozytose und die Freisetzung von proteolytischen Enzymen. Die Bildung der Arachidonsäure, einem der Schlüsselmediatoren in der Entzündungsreihe, wird verhindert, indem die Synthese von Lipocortin induziert und folglich die Aktivität der Phospholipase A2 geblockt wird (Simpson 1991).

Die Glukokortikoidtherapie mit Methylprednisolon hemmt die Entzündung im ZNS, indem sie eine T-Zell-Apoptose induziert und somit die Expression von Zytokinen und die Leukozytenmigration stoppt (Diem 2003). Eine ungewollt induzierte Apoptose von Chondrozyten und Epithelzellen durch Glukokortikoide wurde ebenso unter der Therapie festgestellt (Nakazawa et al. 2002). Es liegen ebenfalls Studien von *Steinsapir* und *Goldberg* vor, dass Methylprednisolon den axonalen Verlust nach Gabe dieser Substanz verschlimmert (Steinsapir und Goldberg 2000). In einem Brief an den Editor der *Ophthalmic Plastic Reconstructive Surgery* wurde eine Formulierung von *Steinsapir* und *Seiff* veröffentlicht, die wie folgt besagt: „...it is no longer acceptable to argue that withholding corticosteroid treatment in future clinical studies of traumatic optic neuropathy is unethical“ (Steinsapir und Seiff 2002). Die Anwendung von Glukokortikoiden bei Gehirn- und Rückenmarkstrauma basiert auf der positiven Auswirkung dieser Medikamentengruppe auf Ödeme und Tumoren des Gehirns (Steinsapir und Goldberg 1998).

### 1.6.2.2 Wirkungsmechanismus der Glukokortikoide in der Zelle

Die Gruppe der Glukokortikoide besitzt ein breites Wirkungsspektrum (siehe Tab. 3). Wie für andere Steroidhormone ist auch für die Gruppe der Glukokortikoide ein Wirkmechanismus über zytosolische Membranrezeptoren belegt. Somit beeinflussen die Glukokortikoide die Genexpression durch Interaktion mit intrazellulären Rezeptoren, die als Ligand-abhängiger Transkriptionsfaktor agieren (Diem und Hobom und Maier 2003).

Die Ligand-abhängige Modulation der Transkription wurde genomisch steroidale Wirkung genannt (Falkenstein et al. 2000). An diesem zytosolischen Rezeptor ist eine niedrige Steroiddosis, wie sie endogen im Organismus oder auch unter einer niedrigdosierten Steroidtherapie erreicht wird, ausreichend, um eine Interaktion zu ermöglichen (Gold et al 2001). Der Hormon-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern und heftet sich dort an Kernrezeptoren. Dieser neugebildete Steroid-Kernrezeptor-Komplex bindet an die DNA und löst die Bildung der m-RNA aus, welche die Synthese von Proteinen und Enzymen bewirkt. Dieser genomische Mechanismus zeigt die Latenz der Glukokortikoidwirkung, die mehrere Stunden betragen kann. Die Glukokortikoide führen zu einer Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub>, und folglich ist die Freisetzung der Arachidonsäure blockiert. Die Arachidonsäure stellt die Vorstufe der Prostaglandine und der Leukotrienen dar. Somit werden diese Produkte nicht gebildet. Ferner erfahren die Makrophagen und die Entzündungsmediatoren eine Hemmung. Die Histaminfreisetzung und die Antigen-Antikörper-Reaktion werden nicht blockiert, wohl aber die dadurch veranlassten infektiösen und allergischen Reaktionen. Es lassen sich jedoch nicht alle Wirkungen der Glukokortikoide über eine DNA-vermittelte Induktion der Eiweißsynthese erklären.

In kürzlich veröffentlichten experimentellen Studien zeigte sich offensichtlich ein dosisabhängiger Mechanismus. Eine hochdosierte Glukokortikoidbehandlung, wie sie bei neurologisch-autoimmunen Prozessen verabreicht wird, ergab einen andersartigen Wirkmechanismus nicht gleich dem genomischen. Dieser

sogenannte nicht-genomische, schnelle Steroideffekt wird über Interaktion mit biologischen Membranen vermittelt, d.h. Einlagerung der Glukokortikoide in die Zellmembran, was eine erhebliche Änderung der physiko-chemischen Eigenschaften dieser im Sinne größerer Stabilität bei zeitgleicher reduzierter Fluidität bedeutet. Dieser schnelle Steroideffekt verläuft parallel zum Anstieg der Plasmakonzentration der Glukokortikoide (Gold et al. 2001).

Die genomischen Effekte der Glukokortikoide (Gäbler 1995; Opderbecke und Weißauer 2001):

- Hemmung der Radikalbildung: Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid
- Hemmung der Zytokinproduktion: Interleukine, Tumor-Nekrose-Faktor alpha, Growth factors
- Hemmung des Eikosanoidstoffwechsels: Prostaglandine, Leukotriene
- Hemmung anderer Systeme: Kallikrein-Kinin- und Komplementsystem, Synthese proteolytischer Enzyme, Freisetzung von C-reaktivem Protein

Die nicht-genomischen Effekte der Glukokortikoide (Gäbler 1995; Opderbecke und Weißauer 2001):

Zelluläre Membranen:

- Änderungen der physikochemischen Eigenschaften der Zellmembran
- Verminderung der Membrandurchlässigkeit für Kationen
- Wirkungen auf Membranlipide

Zellulärer Energiestoffwechsel:

- Erhöhung des mitochondrialen Protonenlecks
- Wirkung auf ATP-verbrauchende Vorgänge
- Reduktion der ATP-Bildung

**Tab. 3 Systemische Wirkungen der Glukokortikoide**

	<b>Wirkungsmechanismus</b>	<b>Folgeerscheinung</b>
<b>Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel</b>	Glukoneogenese aus Aminosäuren gesteigert Eiweißkatabole Wirkung	Steroiddiabetes Atrophie der Muskulatur und der Haut
<b>Fettstoffwechsel</b>	Lipolyse gesteigert	Hyperlipidämie
<b>Blut und Knochenmark</b>	Leukozytenzahl abnehmend	Immunsuppressiva
<b>Nervensystem</b>	Euphorische und dyseuphorische Wirkung	Depression
<b>Herz-Kreislaufsystem</b>	Vasokonstriktion, Na <sup>+</sup> Retention	Herzminutenvolumen gesteigert

### 1.6.2.3 Funktion und die Regulation des Calciumions in der Zelle

Im Ruhezustand befindet sich die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration intrazellulär bei 0,1 µM. Diese Konzentration wird mit Hilfe der durch ATP-getriebenen Ca<sup>2+</sup>-Pumpen und Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauscher ständig niedrig gehalten. Ein hoher Ca<sup>2+</sup>-Spiegel besitzt eine zytotoxische Wirkung auf die Zelle, demzufolge zeigt der Calciumspiegel nur einen kurzfristigen Anstieg in Form von Spikes. Durch den exzitatorischen, extrazellulär befindlichen Neurotransmitter Glutamat kann ein plötzlicher Anstieg des intrazellulären Calciums stattfinden. Intrazellulär liegt das Calcium als Speicherform im sarkoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien vor, die durch Ionenpumpen die cytosolische Calcium-

konzentration konstant bei 0,1  $\mu\text{m}$  halten. In einer Studie im Jahre 2000 wurde postuliert, dass der Calciuminflux auf einen umgekehrten Wirkmechanismus des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers zurückzuführen ist, d.h.  $\text{Ca}^{2+}$  wird als Antwort auf die ATP-Verarmung in das Axon gepumpt. Die Calcium-Homöostase wird durch drei Hormone, das Vitamin-D-Hormon, das Parathormon und das Calcitonin gesteuert (Menge 2000).

#### **1.6.2.4 Der NMDA-Rezeptor abhängige Calciuminflux**

Ein akutes ZNS-Trauma veranlasst die Freisetzung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat, was einen  $\text{Ca}^{2+}$ - Influx in die benachbarten Zellen verursacht, der wahrscheinlich zum Zelltod führt. Es resultiert eine Zerstörung des Nervengewebes (Garcia 2003). Das Glutamat liegt in solchen Situationen in supraphysiologischer Konzentration vor (Akins und Atkinson 2002, Pauwels 1990). Die morphologischen Zeichen einer durch Glutamat induzierten Neurotoxizität und ihrer darauf folgenden Nekrose zeigen sich in einer Schwellung des Zellkörpers und der Mitochondrien, einer Lyse der Zellmembran und einer irregulären Kondensation des Heterochromatins (Joo 1999).

Der Calciuminflux durch die NMDA-Rezeptor medierte Kanäle ist in der Ischämiephase weniger schädlich als derjenige während der Reperfusionphase. Der NMDA-Rezeptor ist ein Rezeptor, an den Neurotransmitter wie Glutamat binden. Dieser gehört zu den ionotropen Glutamatrezeptoren. Glutamat ist eine der wichtigsten exzitatorisch wirkenden Aminosäuren im ZNS der Vertebraten. Zusätzlich ist Glutamat in einigen neurodegenerativen und neurologischen Erkrankungen wie der cerebralen Ischämie, dem Schlaganfall, beim Trauma, bei der Epilepsie, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson involviert (Pauwels 1990).

Die exzitatorische Aminosäure Glutamat aktiviert unter anderem den NMDA-Rezeptor, der nach dem selektiven Agonisten N-Methyl-D-Aspartat benannt

wird. Die Leitfähigkeit des NMDA-Rezeptors wird spannungsabhängig durch eine physiologische extrazelluläre Magnesiumkonzentration bei negativen Membranpotentialen blockiert. Im geöffneten Zustand ist der NMDA-Rezeptor für die Ionen  $K^+$  und  $Na^+$  aber vor allem für die Calciumionen durchlässig. Beim Ruhepotential der Zelle, - 70 mV, wird der NMDA-Rezeptor durch Glutamat zwar aktiviert, dennoch bleibt dieser verschlossen. Erst bei ausreichender postsynaptischer Depolarisierung der Zellmembran und zeitgleicher prä-synaptischer Freisetzung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat wird eine Öffnung der NMDA-Rezeptoren erzielt. Durch die Depolarisierung wird der bestehende Magnesiumblock gelöst. Dann kann Calcium in die Zelle strömen. Dieser Prozess spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Induktion von synaptischer Plastizität, z.B. beim Lernen und Gedächtnis.

#### **1.6.2.5 Calciumkanalblocker und ihre neuroprotektive Wirkung**

Das Calcium-Ion spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Ischämie (Zapater 1997). *Shimazawa et al.* (1995) demonstrierten die durch Flunarizin gesteigerte zerebrale Perfusion und die Inhibition der kortikalen Hypoperfusion (Shimazawa 1995). Die Forschung auf dem Gebiet der Calciumkanalblocker läutet eine neue Ära ein. Die Calciumkanalblocker sind sehr weit in der medizinischen Praxis verbreitet. Sie finden ihren Einsatz bei kardiovaskulären, pulmonalen und neurologischen Erkrankungen (Barnes 1985).

Einer der Calciumkanalblocker, das Flunarizin ein Diphenylpiperazin, ist ein gemischter T- und L-Typ Kanalblocker und ein Natriumkanal-Antagonist (Ragsdale 1991). Somit kann Flunarizin als ein „Weitspektrum“ Calciumkanalblocker betrachtet werden, denn seine Wirkung beschränkt sich nicht nur auf das kardiovaskuläre System, sondern auch auf die Neuronen im ZNS und die chromaffinen Zellen der Nebenniere (Zapater 1997). Es wird nicht nur für kardiovaskuläre und neurologische Erkrankungen, sondern auch für die Migräneprophylaxe eingesetzt (Diener 1994). Zusätzlich besitzt Flunarizin eine

antikonvulsive Wirkung bei Mensch und Tier (Barnes 1994). Es reduziert die Dauer der periodisch wiederkehrenden Hemiplegie in der Kindheit (Andermann 1994). Flunarizin wurde als Inhibitor der Calmodulin-Aktivität identifiziert (Lugnier 1984).

Flunarizin ist eine lipophile Substanz mit einer hohen Penetration in das zerebrale Gewebe. Es besitzt eine niedrige Affinität für das periphere Gewebe (Yarangumeli 2003). Seine Halbwertszeit liegt bei 17 Tagen und seine anti-Migräne-Effekte stellen sich erst nach zwei Monaten ein. Da es zu der Substanzfamilie der Diphenylpiperazine gehört, weist Flunarizin auch anti-histaminische Züge auf. Nebeneffekte wie Sedation, Apathie und Gewichtszunahme sind berichtet worden und diese treten deutlicher in Erscheinung in Kombination mit Alkoholabusus und zentral wirkenden Beruhigungsmitteln (Yarangumeli 2003). Es antagonisiert den intrazellulären Calciumanstieg über eine nicht-selektive Aktion am Calciumkanal (Zapater 1997). Als Neuroprotektion wird es beim zerebralen Infarkt und bei der zerebralen Hämorrhagie eingesetzt.

Flunarizin stellt aber nicht immer einen Benefit für die Patienten dar, besonders während einer Dauermedikation bei älteren Patienten zeigt sich eine Assoziation von Flunarizin mit extrapyramidalen Störungen, die sich durch die Medikation verschlimmerten oder sogar induziert wurden (Chousa 1986). Sie gleichen den Störungen bei Morbus Parkinson und können durch Dosisreduktion reduziert werden. In einer Veröffentlichung von Devoto konnte gezeigt werden, dass Flunarizin den Dopamin-Uptake inhibiert (Devoto 1991). In tierexperimentellen Studien demonstrierte Ryck einen neuroprotektiven Effekt des Flunarizins bei zerebralen Schädigungen. Die von der exzitatorischen Aminosäure Glutamat ausgehende Neurotoxizität konnte auch von Flunarizin verhindert werden (Ryck 1989).

Flunarizin zeigt eine signifikante Neuroprotektion und Senkung der Morbidität bei einer Dosis von 0,5 mg/kg. Die Neuroprotektion konnte nur mit einer Dosis

von 0,5 mg/kg erzielt werden, nicht aber höher oder niedrig dosierter. Die Mortalität erfuhr keine Senkung (Zapater 1997). Weiter wurde berichtet, dass Flunarizin, ein Klasse IV Calciumkanalblocker, effektiver in der Prophylaxe als in der Nachbehandlung sei (Berger 1998).

## 1.7 Studienziel

Basierend auf den Arbeiten von *Gellrich* (Gellrich 1996) wurde ein Tiermodell etabliert, das den Pathomechanismus der traumatischen Optikusneuropathie widerspiegeln sollte. *Zerfowski* lieferte 1999 eine Modifikation des Kompressionstraumamodells an der Ratte mit der Möglichkeit einer standardisierten und stets reproduzierbaren Variante, an welcher die verschiedenen Therapieansätze experimentell geprüft werden können. Hierbei soll insbesondere die Stärke des vorgestellten Modells in der exakten Kalibrierung der Schädigung und der histomorphologischen Bewertung der als whole-mounts aufgezogenen Netzhäute des geschädigten rechten N. opticus liegen.

Mit einem aussagekräftigen klinischen Studienformat ist in nächster Zeit nicht zu rechnen. Vielmehr stützen sich die meisten Therapieansätze auf zahlenmäßig geringe Patientenkollektive, die hinsichtlich ihrer Ätiologie und Stärke der traumatischen Sehnervenverletzung nicht unterschieden werden können. Umso entscheidender ist die experimentelle Studie am Tiermodell. Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit wurde das Versuchsprotokoll von *Zerfowski*, in welchem er eine tendenzielle Regenerationsfähigkeit retinaler Ganglienzellen unter Methylprednisolon in der Dosierung 285 mg/kg KG/48 h und unter der Flunarizin-Dosis von 25 mg/kg KG über 30 Tage (750 mg) experimentell nachwies, aufgegriffen, mit dem Ziel den neuroprotektiven Effekt des in der Megadosis (285 mg/kg KG/48h) applizierten Methylprednisolons und des Flunarizins (750 mg) zu evaluieren. Zusätzlich soll der Einfluss beider Substanzen auf die ausgewählten Zielgrößen „retinale Ganglienzellzahl“ und „retinale Ganglienzellfläche“ histomorphometrisch ermittelt werden.

Laut Literatur sollte sich eine histomorphologische Stabilisierung im Rahmen der überlebenden funktionsfähigen retinalen Ganglienzellen in ihrer Anzahl und ihrer Fläche zeigen (Gellrich et al. 1997).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiermodell

Das von *Zerfowski* modifizierte Tiermodell spiegelt den Pathomechanismus der traumatischen Sehnervschädigung wider. Die Funktionsverbesserung des visuellen Systems, d.h. eine Visusverbesserung durch Erhaltung der neuronalen Ganglienzellen und ihrer nach zentral projizierenden Axone, stellt die Zielgröße in jedem Tiermodell der TON dar.

Die bestmögliche Messgröße stellt folglich die Funktionstestung des visuellen Systems dar. Der Nachweis einer histomorphologischen Besserung als Folge einer Therapie sollte zusätzlich gewährleistet sein, um eventuell auftretende zentralnervöse Kompensationsmechanismen zu erkennen. Dieses Tiermodell der kalibrierten Sehnervschädigung ist reproduzierbar und kontrolliert durchführbar und lässt einen quantifizierbaren Zusammenhang zwischen der Funktion und Morphologie erkennen. Es liegt also ein histomorphometrisch, reproduzierbares und elektrophysiologisches Modell der TON vor. Somit können die Ergebnisse auf klinische Fragestellungen übertragen werden.

Für die Modellversuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Deutschland) mit einem Gewicht von 250-350 g eingesetzt. Sie wurden in zwei Gruppen zu je 9 Tieren und zwei weiteren zu je 11 Tieren in Makrolon-Edelstahlgitter-Käfigen (A4, Fa. Ehret, Emmendingen) gehalten. Für die Versuchstiere wurde ein artifizierlicher 12 h-Tag-und-Nacht-Rhythmus eingehalten. Freier Zugang zu Trockennahrung und Wasser waren vorhanden. Die Raumtemperatur betrug circa 20° C und die Luftfeuchtigkeit überschritt die vorgeschriebenen 60-67% p nicht.

Nach Erteilung der Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen wurden alle Versuche nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

### 2.1.1 Durchführung der Sehnervkompression

Nach Gewichtsbestimmung der Tiere folgte die intraperitoneale Anästhesie, die sich aus einer Ketamindosis von 10 mg/kg KG (CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) und einer Xylazindosis (Rompun<sup>®</sup>, Bayer Vital, Deutschland) die 0,3 ml/kg KG einer 0,2%igen Lösung beträgt (~ 8,3 mg/kg KG) zusammensetzte. Die Dauer der Anästhesie betrug 45-60 min. Bei zu geringer Narkosetiefe konnte eine weitere Dosis Ketamin/Xylazin intraperitoneal verabreicht werden.

Die Ratte wurde in Bauchlage auf den Operationstisch gelegt und mit einer rektalen Temperatursonde versehen, die der Kontrolle der Körperwärme diente. Um einer Keratitis vorzubeugen, wurde in jedes Auge direkt in den Bindehautsack ein wenig Bepanthen<sup>®</sup> Roche Augensalbe (Roche Nicholas GmbH, Deutschland) gegeben. Vor der Schnittführung wurde das Fell zwischen beiden Augen mit Paraffin benetzt. Der Schnitt wurde median-sagittal zwischen beiden Augen in einer Länge von 2,5 cm geführt und der rechte Supraorbitalrand dargestellt. Im Anschluss daran fixierte man den Schädel der Ratte in der stereotaktischen Apparatur durch zwei Ohrdorne, die im Meatus acusticus externus zu liegen kamen. Durch eine Aufbißschiene, die hinter die oberen mittleren Incisivi positioniert wurde, wurde die Bewegung der Ratte während der Operation unterbunden. Für die nachfolgenden Operationsschritte war der Einsatz eines Mikroskops (einer Leica MZ 95) erforderlich.

Dieser von *Sievers et al.* 1984 beschriebene, hier modifizierte, supraorbitale Zugang wurde zur Präparation des rechten N. opticus verwendet (Sievers et al. 1984). Der linke N. opticus blieb zur späteren intraindividuellen Kontrolle unversehrt. Die im nasenseitigen Augenwinkel retrobulbär liegende Hardersche

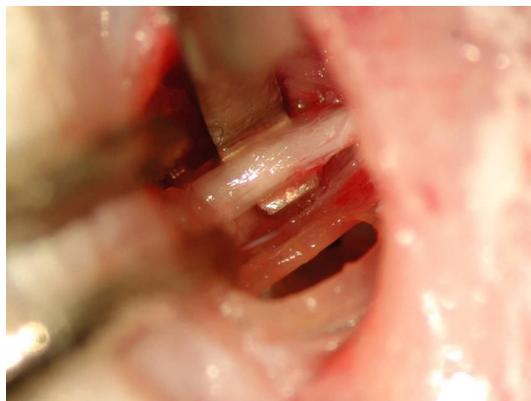
Drüse, die teilweise von dem geraden oberen, mittleren und seitlich gelegenen Augenmuskeln umgeben ist, sowie auch der N. supratrochlearis und seine ihn begleitenden Blutgefäße, wurden zu Gunsten der besseren Darstellung und des einfacheren Zugangs zum N. opticus vollständig reseziert. Nach stumpfem Entfernen der Harderschen Drüse zeigten sich die äußeren Augenmuskeln. Die Hardersche Drüse ist eine lipid- und porphyrinhaltige Drüse. Sie ist in einen komplexen hormonellen Regelkreis involviert, deren Aufgabe noch nicht geklärt ist (Sakai 1981, Payne 1994). So ist das spätere problemlose und genaue Positionieren der Mikroläsionsapparatur ohne störendes Gewebe gewährleistet.

Der rechte Bulbus wurde mit Hilfe eines über einen Metallarm am Operationstisch befestigten kleinen Retraktors behutsam zur Seite geschoben. Die nun freiliegenden äußeren Augenmuskeln konnten stumpf getrennt und gespreizt werden. Die den Sehnerv umgebende Muskulatur (M. retractor bulbi) wurde nun mit einer Pinzette achtsam vom N. opticus durch eine craniale Längsinzision abgelöst und durch den Retraktor separiert. Wiederholt wurde der rechte Bulbus mit sanftem Hub der zwei Retraktoren ein wenig zur Seite gedrängt, zeitgleich verlief der Sehnerv unangetastet zwischen den Augenmuskeln. Bei all diesen Manipulationen musste darauf geachtet werden, den Sehnerv und seine Hüllen nicht zu verletzen (siehe *Abb. 3*)

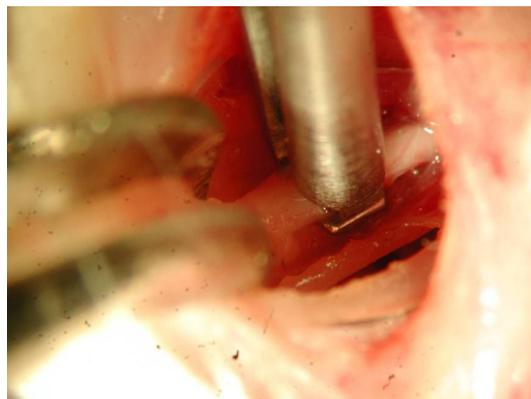
Nun konnte die Basisplatte der Mikroläsionsapparatur mit Hilfe des Mikromanipulators in den präparierten Retrobulbärraum dorsolateral um den Sehnerv herum eingeführt und unter diesem platziert werden (siehe *Abb. 4*). Nach der Positionierung der Basisplatte wurde ein 5 g schwerer Stempel auf den Sehnerv über Schienen geführt und diesen für eine Dauer von 6 min belassen (siehe *Abb. 6*). Das Sistieren der Perfusion war an dem Abblassen der Iris und des Fundus zu erkennen. Durch vorsichtiges Anheben des Stempels konnte anschließend die Basisplatte mikromanipulatorisch aus dem Operationssitus entfernt werden. Der Verschluss der Hautinzision erfolgte durch eine fortlaufende Naht. Zur Vermeidung einer postoperativen Hypothermie wurde das Tier im Käfig unter eine Wärmelampe gelegt.



**Abb. 3** Sicht auf den Sehnerven



**Abb. 4** Positionierung der Basisplatte unter dem Sehnerven

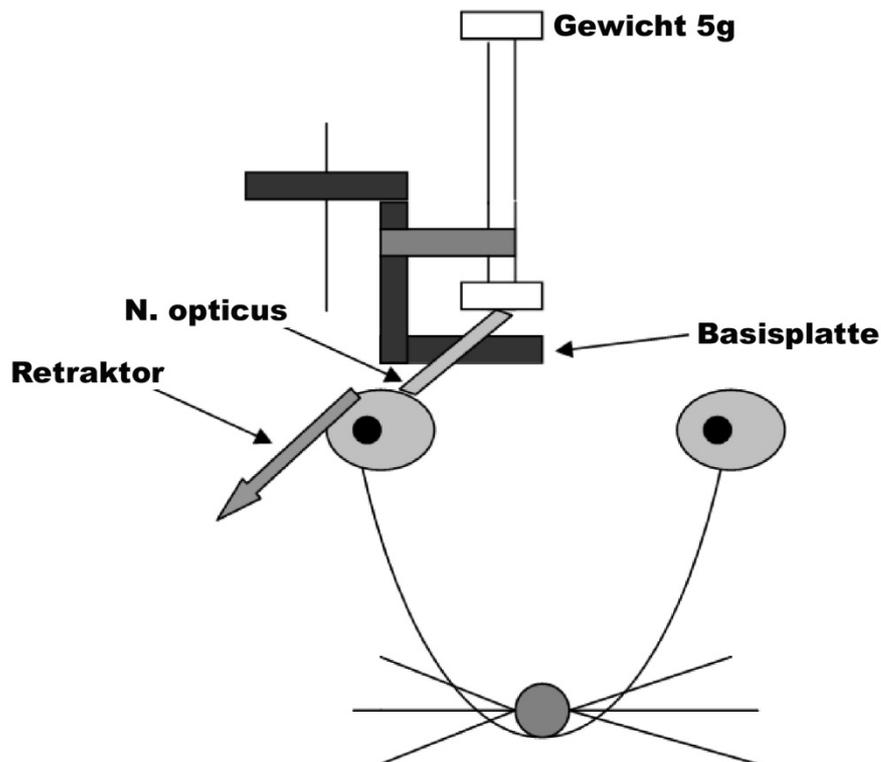


**Abb. 5** Sehnervkompression

### 2.1.2 Mikroläsionsapparatur

Durch diese nach *Gellrich* (1995) modifizierte Mikroläsionsapparatur wurde erstmals ein rascher, standardisierter und somit jederzeit reproduzierbarer Crush des Sehnervs möglich (Gellrich 1995). Die Stempelapparatur besitzt eine 1 mm breite und eine 1,5 mm lange Basisplatte, die mikromanipulatorisch kaudal des N. opticus platziert werden konnte. Schienengeführt konnte ein Metallstempel mit einer Eigenmasse von 5 g und einer 1mm<sup>2</sup> quadratisch großen Stempelunterfläche auf den Sehnerv geführt werden, der auf der Basisplatte der Apparatur positioniert lag und infolgedessen eine standardisierte Kompression erfährt. Das Stempelgewicht ist nach *Zerfowski* (1999) durch weitere Gewichtsaufsätze auf 10, 15 und 20 g variabel (Zerfowski 1999).

Die Durchführung aller Experimente wurde mit einem Stempelgewicht von 5 g und einer sechsminütigen Kompressionszeit realisiert. Damit die Mikroläsionsapparatur zu keiner Zeit für die Präparation ein Hindernis darstellt, ist diese über einen Metallarm (Metallvorrichtung) mit einem Gestell am Präparationstisch befestigt und erlaubt eine genaue Fixierung. Da während der Präparation die Fixierung des Tierschädels konstant bleibt und genügend Platzfreiheit vorherrscht, ist ein effektives und schnelles Arbeiten am Präparationssitus möglich (siehe *Abb. 6*).



**Abb. 6** Schematische Darstellung der kalibrierten Sehnervkompression. Modifiziert nach Gellrich 1995

### 2.1.3 Perfusion

Nach einer 30-tägigen Überlebenszeit der Tiere kam es zu einer lichtmikroskopisch erfassbaren Stabilisation der neuronalen Degeneration, die nach einer 30-tägigen Überlebenszeit der Tiere gewährleistet ist (Gellrich 1991). Anschließend fand die Perfusion der Tiere zur Fixation des N. opticus und der Retina statt.

Es folgte die erneute Gewichtsbestimmung des Tieres, danach wurde die Anästhesie mit Diethylether (Merck, Darmstadt) in einem Glaskäfig vollzogen. In tiefer Anästhesie und Analgesie eröffnete man den Bauchraum des Tieres, um im darauf folgenden Schritt die Durchblutung der Aorta abdominalis und der Vena cava inferior kurz oberhalb der Abzweigung der linken Arteria und Vena renalis durch Abklemmen zum Stillstand zu bringen. In die Aorta ascendens

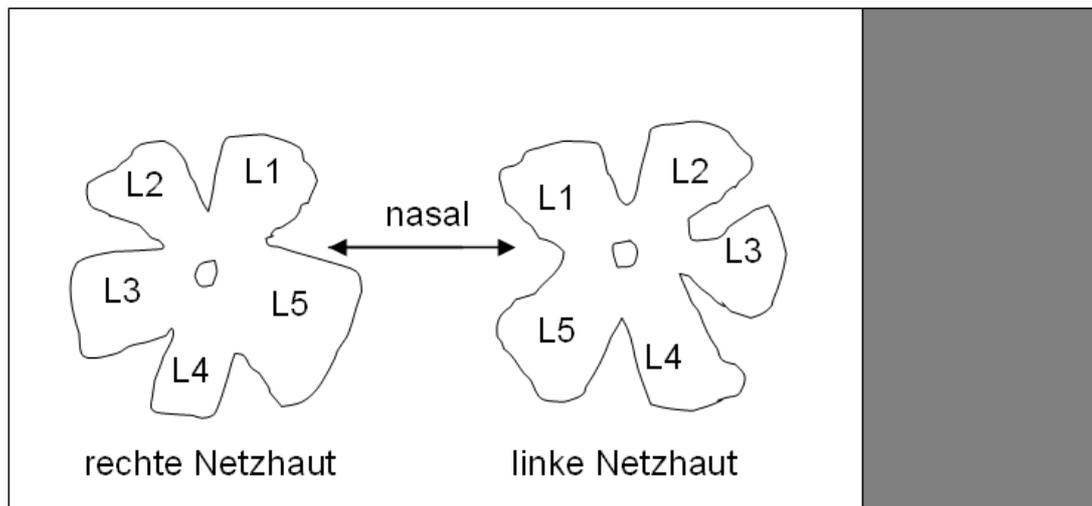
wurde transventrikulär über die linke Herzkammer ein Metallkatheter, der die Funktion eines arteriellen Zugangs besaß, gelegt und an dieser Stelle mit einer Klammer fixiert. Der venöse Abfluss wurde durch Inzision der beiden Venae jugulares ermöglicht. Beginnend mit einer 15 min dauernden Perfusion von 150 ml Heparin-Kochsalz-Lösung und 1,5 ml Heparin-Natrium (Heparin-Natrium Braun „Multi“, 10000 I.E. / ml, Melsungen) und anschließender 10 min Perfusion mit 100 ml einer neutral gepufferten 4,5%igen Formaldehydlösung (Roti<sup>®</sup>-Hisofix, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) wurde die in vivo Fixierung erreicht.

Die räumliche Anordnung der ausgebreiteten Netzhäute wurde durch je einen Knoten (Nahtmaterial: Prolene<sup>®</sup>, blau monofil 6/0, Ethicon, Norderstedt) nasal der Plica semilunaris conjunctivae gesichert, um daraufhin die Bulbi mit einem anhängenden Teil des intraorbitalen N. opticus zu entnehmen. Anschließend legte man die Bulbi zur Nachfixierung für eine Zeitspanne von 24 Stunden in eine 37%ige säurefreie Formaldehydlösung (Microscopy, Merck, Deutschland). Die Cornea wurde kreisförmig herausgeschnitten und die Linse sowie der Glaskörper entfernt. Später erfolgte eine weitere 24stündige Nachfixierung.

#### **2.1.4 Das Ganzhäutchenpräparat: Whole-mounts**

Die Ora serrata der nachfixierten Bulbi wurde unter dem Mikroskop von dem darunter befindlichen Gewebe getrennt. Anschließend wurde die Retina vorsichtig, ohne jegliche Schäden an dieser zu verursachen, als Ganzhäutchenpräparat (whole-mounts) vom Bulbus abgelöst. Die Retina wurde schließlich von dem Sehnerv mit einem Schnitt durch ein feines Skalpell befreit. An den zuvor angelegten Knoten verlief nun eine Inzision von der Cornea-Sklera-Grenze bis unmittelbar vor die Papille. Nun war es möglich die räumliche Orientierung auch nach Entfernung der blauen Knoten und der restlichen Gewebe beizubehalten. Um eine flach ausgebreitete Retina zu erhalten, wurden noch vier weitere radiäre Inzisionen, zusätzlich zu der bestehenden, nasalen, vorgenommen.

Schließlich wurde das Ganzhäutchenpräparat vollständig von der noch bestehenden Papille durch ein Skalpell (Aesculap, Größe 11, Tuttlingen/Germany) mit spitzer Klinge entfernt. Die paarweise Anordnung der Retinae eines Tieres auf einem beschichtetem Objektträger (Superfrost® Plus, Deutschland) wurde durchgeführt und durch die Einhaltung der nasalen Markierungsschnitte war die räumliche Orientierung jederzeit nachvollziehbar. Die Nervenfaserschicht wurde nach oben zeigend auf die Objektträger aufgezogen (siehe *Abb. 7*).



**Abb. 7** Whole-mounts beider Netzhäute mit Kennzeichnung der Netzhautlappen L1 bis L5. Modifiziert nach *Zerfowski* (Zerfowski 1999)

Es folgt der Schritt der Fixierung der Netzhäute auf dem Objektträger. Die Nagernetzhäute wurden zuerst mit einem Cellulose Nitrat Filter (Sartorius, Göttingen) überdeckt. Ein weiteres grobporiges Filterpapier (Rota, Düren) und ein unbeschichteter Objektträger wurden anschließend draufgelegt. Nun wurden die Objektträger mit einem Gewicht von 40 g über 24 Stunden beschwert und in einer Feuchtkammer, die ein Formalin-Alkohol-Gemisch von 10 ml Formalin (Microscopy, Merck, Karlsruhe) und 90 ml Ethanol 96% (Merck, Karlsruhe) enthielt, aufbewahrt.

### **2.1.5 Kresylviolett-färbung der whole-mounts**

Zur Herstellung der Kresylviolettlösung wurden 1 g Kresylviolett (Certistain<sup>®</sup>, Diagnostika Merck, Darmstadt), 0,25 g Natriumacetat (pro analysis<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt) in Aqua dest. gelöst, 3,1 ml Eisessig (pro analysis<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt) zugegeben und mit 1 Liter Aqua destillata aufgefüllt. Darauf folgend wurde der gesamte Ansatz mit dem noch verbliebenen Aqua dest. und mit dem Eisessig (pro analysis<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt) aufgefüllt. Um den Farbstoff restlos zu lösen, wurde die Lösung durch aufsteigende Erwärmung bis auf 60°C erhitzt. Danach erfolgte eine Filtrierung des Färbegemisches.

Als Fixierflüssigkeit kam eine Eisessig-Alkohol-Lösung, bestehend aus 3 ml Eisessig und 97 ml Ethanol zum Einsatz. Durch den Eisessig wurde das Eindringen des Alkohols in der Fixierungsphase ermöglicht. Die Objektträger wurden nach Entfernen der Filterpapiere dort für 30 min eingebettet. Die Retinapräparate wurden 2 Minuten lang in der Kresylviolettlösung belassen, nachdem sie mit Aqua dest. gespült worden sind. In der Folgezeit wurde eine Wässerung der Objektträger in Aqua dest. vorgenommen und danach in aufsteigender Alkoholreihe (70% Ethanol, zwei Mal 96% Ethanol, Isopropanol) entwässert und ausgewaschen. Schließlich folgte eine zweimalige 5 minütige Behandlung in Xylol und eine Eindeckung mit Eukitt (Labonord; Mönchengladbach). Anschließend wurden die Retinapräparate mit Aqua dest. gespült.

### **2.1.6 Histologisch-morphologische Auswertung der retinalen Ganglienzellschicht**

Mit Hilfe des motorisierten Forschungsmikroskop DM RXA2 und der eigens hierfür entwickelten Software der Firma Leica (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim/Deutschland), konnte die computergesteuerte Auswertung (Intel P4, 2 GHz Prozessor, 21“ FST Farbmonitor, Microsoft Windows 2000,

Service Pack 3) der kresylviolett-gefärbten whole-mounts durchgeführt werden. Die Makroprogrammiersprache Quips enthielt zwei Messroutinen. Nach manueller Einstellung des N. opticus wurde jede Retina zunächst computergesteuert bei 10facher Vergrößerung vermessen. Nachfolgend wurden bei 40facher Vergrößerung auf einer radiären Achse von der Papilla nervi optici zur Pars plana auf jedem der 5 Netzhautlappen je 3 Gesichtsfelder automatisch angefahren. Die aufgenommenen Gesichtsfelder (GF) befanden sich im Abstand von 1,2 mm (zentrales GF), 2,4 mm (intermediäres GF) und 3,6 mm (peripheres GF) von der Papilla nervi optici entfernt. Die automatisch vom Mikroskop gewählten Gesichtsfelder wurden mit der hoch auflösenden (2,9 Mega Pixel Auflösungsvermögen, 12 Bit A/D Wandlung) Schwarz/Weisskamera DC 30 F (Leica GmbH, Deutschland) aufgenommen. Um eine kontrastreichere Bildaufnahme zu erreichen, kamen weiter ein panchromatischer Grünlichtfilter (32 nm) sowie ein Tageslichtfilter (32 nm) zum Einsatz.

Die vorgegebene und stets eingehaltene Belichtungszeit betrug 50 ms. Ziel war es individuell bestmögliche Bildqualität hervorzubringen, wobei man sich verschiedenster Hilfsmittel, darunter der Gammaregler, der Apertur- und Leuchtfeldblende sowie der Belichtungsintensität, behalf. Unter manuellem Einsatz des Leica IM1000 Multifokus-Moduls entstanden die Bildaufnahmen. Dieses Modul ermöglicht die Berechnung von Bildern mit erweiterter Schärfentiefe aus der Kombination mehrerer Bilder mit lokal unterschiedlichen Schärfereichen. Die Bilddatenbank IM1000 diente als Archiv aller Bilder. Entsprechend der zweiten Routine konnte die Bildbearbeitungs- und Analysesoftware Leica QWin (Softwareeigename der Firma Leica) alle Neurone in der Ganglienzellschicht der Netzhaut flächenmäßig erfassen und zählen. Das umfangreiche Datenmaterial wurde in Microsoft® Excel XP Professional 2001 gespeichert.

Zunächst wählt das Programm mit Hilfe eines Detektionsverfahrens die Zellen für die Binärbildverarbeitung und die Messung aus. Die Detektion gibt die Grenzen der zu messenden Zellen an und erstellt folgend ein Binärbild. Die von

der Routine verwendete Funktion der Wasserscheidenberechnung verstärkte die Darstellung der Zellgrenzen. Die erfolgt durch Erweiterung der dunklen Bereiche, die von helleren Pixeln umgeben sind (Minima), sodass die hellsten Grenzen zwischen allen Minima dargestellt werden. Im Eingabebild befinden sich nun eindeutig markierte Regionen für jeden Minimumwert. Danach mussten einige Stellen in jedem Bild mit den Bildwerkzeugen in einer bestimmten Reihenfolge nachbearbeitet werden,

- 1.) „dunkelstes Hintergrundteilchen auswählen“,
- 2.) „Zellen trennen“,
- 3.) „Zellen zusammenfügen“ oder
- 4.) „Zellen löschen“,

denn der Computer erkannte nicht jede Zellüberlappung oder jede Zellberührung. Die Zellzählung und die Flächenberechnung jedes Gesichtsfeldes erfolgten nach vollendeter Bearbeitung.

In QWin (Softwareeigennamen der Firma Leica) herrschen zwei örtliche Grenzen, die sich in einem roten Bildrahmen und in einem blauen Messrahmen zeigen. Alle Bildprozeduren erfolgen innerhalb dieser beiden Grenzen. In dem Feld des roten Bildrahmens werden die Ganglienzellen detektiert und im Bereich des blauen Messrahmens werden sie vermessen. Nur grün markierte Zellen, die sich noch in ihrer ganzen Ausdehnung im blauen Messrahmen befinden, gehen in die Messung ein. Somit werden die erarbeiteten Daten vor Fehlern geschützt, die auftreten, wenn die Zellen nicht in ihrer vollständigen Größe im Messrahmen liegen.

In einer Veröffentlichung von *Perry* wurden die verschiedenen Zellen in der Retina in Neurone und Gliazellen gemäß den Kriterien identifiziert (Perry 1981). 50% der Axonprojektionen nach zentral haben ihren Ursprung in der retinalen Ganglienzellschicht (Perry 1981, Linden 1987). Mit einer Fläche von  $\geq 80 \mu\text{m}^2$  sind die Neurone im Durchschnitt größer als die verbleibenden Zellen, die

amakrinen Zellen. Die Neurone zählen zu den retinalen Ganglienzellen. Die amakrinen Zellen stellen die restlichen 50% der Neurone dar, die keine Axone nach zentral entsenden und folglich im Fall einer Sehnervschädigung in ihrer Größe und Funktion erhalten bleiben (Perry 1981, Linden 1987). Laut *Gellrich* könnte durch eine Unterscheidung nach zentralem, intermediärem und peripherem Auswertungsbereich, eventuelle Unterschiede in der Neuronendegeneration aufgrund der verschiedenen Entfernungen der Mutterzelle zur Läsionsstelle, d.h. unterschiedlicher Axonlängen, erfasst werden (Gellrich 1995).

## **2.2 Methylprednisolon**

### **2.2.1 Portimplantation**

Für die Methylprednisolonversuchsreihe musste ein intravenöser Zugang gelegt werden, der über 48 Stunden im Versuchstier verweilt. Die Implantation des Portsystems (V-A-P™ Rat-O-Port™; Access™ Technologies, IL U.S.A.) wurde 1 bis 2 Tage vor Kompression des N. opticus in einer Narkose durchgeführt. Die Narkose wurde mit 10 mg/kg KG i.p. (Ketanest® S 5 mg, Parke-Davis, Deutschland) erreicht und zusätzlich das in der Veterinärmedizin oft verwendete Sedativum Xylazin in einer Dosierung von 0,3 ml/kg KG einer 2%igen Lösung intraperitoneal (ca. 8,3 mg/kg KG) (Rompun®, Bayer, Deutschland) verabreicht.

Nach einer Teilrasur im Nacken, am oberen Rücken und an der linken Seite des Halses, begann die Schnittführung von 1 cm Länge am Hals und entsprach in ihrem distalen Verlauf dem M. sternocleidomastoideus, der bei der Ratte nicht so deutlich erscheint wie beim Menschen. Zur Darstellung der Vena jugularis musste der Muskel von ventral gelöst und nach dorsal-lateral gezogen werden. Die Vena jugularis ist nun nur von etwas Weichgewebe und Fett bedeckt. Die Jugularvene wurde unter 6facher Vergrößerung über einen Abschnitt von 0,5 bis 1 cm präpariert, ihre Seitenäste abgebunden und anschließend mit einem

Faden der Stärke 4x0 am proximalen und distalen Ende der Jugularvene jeweils eine Schlinge gelegt.

Folgend wurde am Rücken ein Schnitt medial zwischen den Schulterblättern gesetzt und durch stumpfes Aufspreizen eine subkutane Tasche für das Portreservoir geschaffen. Desgleichen wurde durch stumpfes Aufspreizen von dieser Tasche aus ein Kanal zum zervikalen Schnitt geschaffen, durch diesen später der verkürzte Schlauch nach Einbringen des Ports gelenkt wurde.

Der nachstehende Operationsschritt erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops bei schwacher Vergrößerung. Eine Phlebotomie der Jugularvene ermöglichte den zuvor angespülten Katheterschlauch über die Vene kardialwärts vorzuschieben. Im ersten Schritt wurde die distal befindliche Schlaufe zur Katheterfixierung angezogen, die proximale im zweiten Schritt zur Unterbindung der proximalen V. jugularis. Zur Verhinderung des ungewollten Zurückgleitens des Schlauches, wurde der Faden, der die proximale Schlaufe bildet und die Fixierung des Katheterschlauches darstellt, zusätzlich über eine Schlauchretention verknotet. Das Schlauchsystem wurde auf seine freie Durchgängigkeit getestet. Der Verschluss der zwei Hautinzisionen wurde mit Einzelknopfnähten erreicht.

Die Basisplatte des Ports erfuhr keine Fixierung durch eine Naht. Die Sicherstellung der Durchgängigkeit des Portssystems erfolgte durch eine Injektion einer heparin- und vancomycinhaltigen NaCl-Lösung. Die Entfernung des Ports geschah spätestens am 2. Tag nach der letzten Methylprednisolongabe in einer kurzen Operation, um Irritationen und Infektionen der Haut durch Aufkratzen zu vermeiden. Die Implantation des Ports wurde wie auch dessen Entfernung in einer Ketamin-Xylazin-Narkose durchgeführt.

### 2.2.2 Gruppeneinteilung und Protokoll der MP-Gabe

Die Methylprednisolongruppe (n=9) wurde mit der Kontrollgruppe NaCl (n=11) verglichen. Die Kompression des N. opticus wurde nach dem Modellversuch (siehe 2.1.1) bei allen Tieren am rechten Sehnerven mit einem Gewicht von 5 g über 6 min vorgenommen. Das Methylprednisolon (MP) (Urbason<sup>®</sup>, Hoechst, Deutschland) wurde in Form einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml i.v. verabreicht. 15 min nach dem Sehnervtrauma bekam die Therapiegruppe Methylprednisolon MP<sub>post</sub> (n= 9) eine *loading dose* von 45 mg/kg KG. Das subkutane Portsystem diente zur i.v.-Injektion und dieses wurde vor jeder Injektion mit 0,1 ml NaCl angespült. Danach wurde die Methylprednisoloninjektion durchgeführt. Anschließend wurde das Portsystem mit einer NaCl-Lösung durchgespült, die 100 IU/ml Heparin (Liquemin<sup>®</sup> N, Hoffmann-La Roche, Deutschland) und 1 mg/ml Vancomycin (Vancomycin CP Lilly<sup>®</sup> 500, Lilly, Deutschland) als Bestandteile aufwies. Die Erhaltungsdosen von 30 mg/kg KG wurden 2, 4, 6, 12, 18, 24, 36, und 48 Stunden nach dem künstlich gesetzten Trauma verabreicht. Somit summiert sich die Methylprednisolongabe auf die Gesamtdosis von 285 mg/kg KG/48 Stunden. Die Gesamtdosis sowie Injektionsabstände wurden dem Protokoll von *Zerfowski* entnommen (Zerfowski 1999). In der Therapiegruppe Methylprednisolon verstarben zwei Tiere unmittelbar nach dem operativen Eingriff und gingen somit nicht mehr in die histomorphometrische Auswertung ein.

Die Kontrollgruppe NaCl (n=11) erhielt 15 min nach Setzen eines gleichartigen Sehnerventraumas eine Injektion Äquivalolumina physiologischer Kochsalzlösung i.v. über das Portsystem. Danach wurden weitere Gaben nach 2, 4, 6, 12, 18, 24, 36, und 48 Stunden gemäß den Intervallen des Methylprednisolonprotokolls vorgenommen.

Die 30-tägige Überlebenszeit dieser Ratten, die Perfusion, sowie die Weiterverarbeitung der entnommenen Bulbi entsprachen dem Modellversuch (siehe

2.1.3, 2.1.4, 2.1.5, 2.1.6). Die Auswertung der Netzhäute wurde mit der Analysesoftware Leica QWin vorgenommen.

### 2.3 Flunarizin

Die Flunarizingruppe (n=9) wurde mit der Kontrollgruppe Cyclodextrin (n=11) verglichen. Folgende Versuchsreihe mit Flunarizin (FLU), sowohl das künstlich gesetzte Trauma, als auch die Dosierung beruht auf dem geprüften Protokoll von *Zerfowski* (Zerfowski 1999). Die durch den Calciumantagonisten Flunarizin (Sigma, Deutschland) erreichbare Neuroprotektion wurde anhand des Sehnervenkompressions-Modells am rechten Sehnerven (siehe 2.1.1) in einer Dosierung von 25 mg/kg KG über 30 Tage (FLU<sub>25</sub>) untersucht. Da Flunarizin eine geringe Hydrophilie aufweist, wurde es in einem wässrigen Gemisch von Cyclodextrin (Fa. Sigma, Deutschland) in Lösung gebracht. Bei unserer FLU<sub>25</sub>-Gruppe handelte es sich um eine 25%ige Lösung von Cyclodextrin. Die Gesamtdosis von Flunarizin und des Lösungsvermittlers Cyclodextrin wurden dem Protokoll von *Zerfowski* entnommen (Zerfowski 1999). Alle Tiere der Therapiegruppe Flunarizin FLU<sub>25</sub> (n=9) bekamen 15 min nach der Sehnervenkompression eine subkutane Injektion des Flunarizin-Cyclodextrin-Gemisches, eine weitere nach 12 h, darauf folgende Injektionen alle 12 h über 48 h lang. Danach erhielten alle Ratten täglich 1 Injektion Flunarizin in der Dosierung 25 mg/kg KG s.c. bis zur Perfusion nach 30 Tagen (siehe 2.1.3). Die Gesamtdosis betrug 750 mg. Zwei der Tiere in dieser Therapiegruppe erlitten der postoperativen Infektion und konnten somit nicht mehr in die Wertung eingebracht werden.

Als Kontrollgruppe (n=11) dienten 11 Versuchstiere, die nach der künstlich gesetzten Sehnervenkompression (siehe 2.1.1) in den entsprechenden Intervallen ein gleiches Volumen von Cyclodextrin in 25%iger Lösung s.c. injiziert bekamen.

Die Perfusion und Weiterverarbeitung der Retinae entsprach dem Modellversuch und die histologisch-morphometrische Auswertung wurde mit der Software von Leica QWin (Eigename der Software der Firma Leica) vorgenommen (siehe 2.1.3, 2.1.4, 2.1.5, 2.1.6).

## **2.4 Datenverarbeitung und statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit freundlicher Hilfestellung von Fr. Dr. Herberts vom Institut für Biometrie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Nach der Zählung und Flächenberechnung aller markierten Zellen durch die Analysesoftware Leica QWin, konnten die Daten nachfolgend in Microsoft<sup>®</sup> Excel XP Professional 2001 gesichert werden. Mit Hilfe der Statistikprogramme JMP<sup>®</sup> 5 (SAS Institute Inc.; Cary, NC, USA) und BIAS. 8.3 fand die Auswertung statt.

Neurone mit einer Fläche  $\geq 80 \mu\text{m}^2$  zählen zu den retinalen Ganglienzellen. Für jede Ratte wurde intraindividuell die Anzahl der degenerierten Ganglienzellen, sowie die Fläche der Ganglienzellen durch Subtraktion der Ganglienzellzahl/-fläche des rechten Bulbus von der Ganglienzellzahl/-fläche des linken Bulbus errechnet. Diese Differenz ermöglicht den interindividuellen Vergleich innerhalb einer Gruppe und zwischen den verschiedenen Gruppen. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden von jedem Versuchstier der vier Versuchsgruppen die Neuronzahl aller 15 Gesichtsfelder paarweise gegenübergestellt. Die beiden Therapiegruppen wurden mit ihren jeweiligen festgelegten Kontrollgruppen validiert. Folglich wurde z.B. in der Flunarizingruppe das Gesichtsfeld 1, das vereint mit den Gesichtsfeldern 4, 7, 10, 13 das zentrale Gesichtsfeld bildet, mit dem Gesichtsfeld 1 der Cyclodextringruppe beurteilt. Das zweite Gesichtsfeld der Flunarizingruppe wurde wiederum mit dem Gesichtsfeld 2 der Cyclodextringruppe verglichen. Dies wurde bis zur Erlangung des Gesichtsfelds 15 der beiden zu vergleichenden Gruppen durchgeführt. Es wurde jeweils die Differenz  $\text{GNZ li} - \text{GNZ re}$  gebildet, die zum weiteren Vergleich inmitten

der Gruppen unabkömmlich ist. Dieses Auswertungsverfahren wurde auch in Hinsicht auf die Neuronfläche der Versuchsgruppen übertragen.

Die Varianzanalyse stellt einen Test dar, der die Mittelwerte von mehreren unabhängigen, normal verteilten Datengruppen vergleicht. Hier soll die Streuung zwischen den Stichproben herausgearbeitet werden. Die Normalverteilung ist eine stetige Verteilung, deren Dichte die Form einer Glocke hat. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% ( $p \leq 0.05$ ) festgesetzt. Um zwischen den Behandlungsgruppen und den Kontrollgruppen einen Vergleich aufzustellen, wurde der Shapiro-Wilk-Test angewandt. Der Shapiro-Wilk-Test untersucht die die Abweichung der empirischen Verteilungsfunktion einer Normalverteilung. Die Zielgrößen sind einerseits die Differenz der Ganglienzellzahl links-rechts, andererseits die Differenz der Zellgröße (Fläche) links-rechts in Abhängigkeit des Gesichtsfelds GF der Lappen und der Behandlung. Der Test von Shapiro und Wilk zeigte, dass eine Normalverteilung der hier vorliegenden Daten nicht abgelehnt werden konnte. Ein häufig verwendeter Signifikanztest ist der Student-t-Test. Er kommt zum Einsatz, wenn es um die Betrachtung stetiger Zielgrößen geht. Ein weiterer Signifikanztest für die statistische Auswertung ist der Welch Test. Dieser Test findet Anwendung, wenn beim Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben die Varianzen nicht gleich sind und dadurch der Student-t-Test nicht angewendet werden kann. Dieser Test ist eine Näherungslösung, da es für ungleiche Varianzen keine exakte Lösung gibt.

Folgende Bedingungen müssen für den Welch Test erfüllt sein:

- die Meßwerte sind Stichproben aus Grundgesamtheiten mit normal verteilten oder annähernd normal verteilten Zufallsgrößen
- die Standardabweichung in den Grundgesamtheiten, ist nicht – wie z.B. beim Student-t-Test – gleich.

Bei ungleicher Standardabweichung wurde folglich der Welch Test, bei gleicher Standardabweichung der Student-t-Test durchgeführt worden.

Sofern nicht zu Beginn eine neurotoxische Wirkung eines hier angewandten Therapieansatzes auf die retinalen Ganglienzellen ausgeschlossen werden kann, ist eine zweiseitige Fragestellung angemessen.

Folgende Hypothesen sind zu formulieren:

- a) H<sub>0</sub>: Es gibt keinen Unterschied zwischen der MP bzw. FLU und NaCl bzw. Cyclodextrin bezüglich den zu prüfenden Zielgrößen „Neuronzahl“ und „Neuronfläche“.
- H<sub>1</sub>: Es gibt einen Unterschied zwischen der MP bzw. FLU und NaCl bzw. Cyclodextrin bezüglich den zu prüfenden Zielgrößen „Neuronzahl“ und „Neuronfläche“.
- b) H<sub>0</sub>: Es gibt keinen Unterschied zwischen der MP und FLU bezüglich den zu prüfenden Zielgrößen „Neuronzahl“ und „Neuronfläche“.
- H<sub>1</sub>: Es gibt einen Unterschied zwischen der MP und FLU bezüglich den zu prüfenden Zielgrößen „Neuronzahl“ und „Neuronfläche“.

Ziel der Studie war es, die Nullhypothese zu verwerfen. Weitere Variablen wurden deskriptiv ausgewertet.

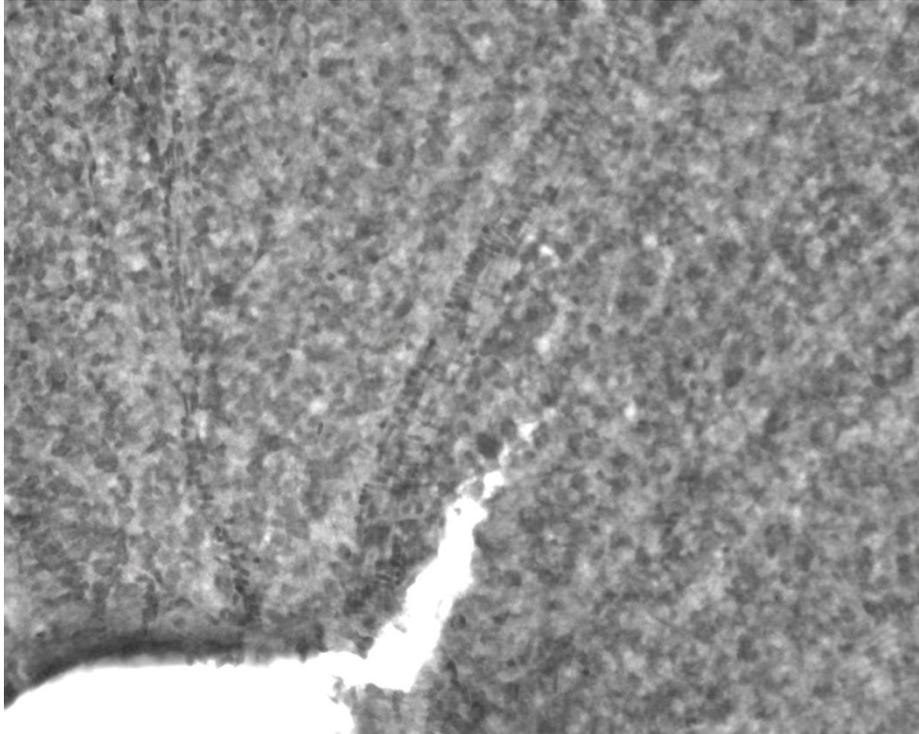
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die histologische und histomorphometrische Umgestaltung der retinalen Ganglienzellschicht

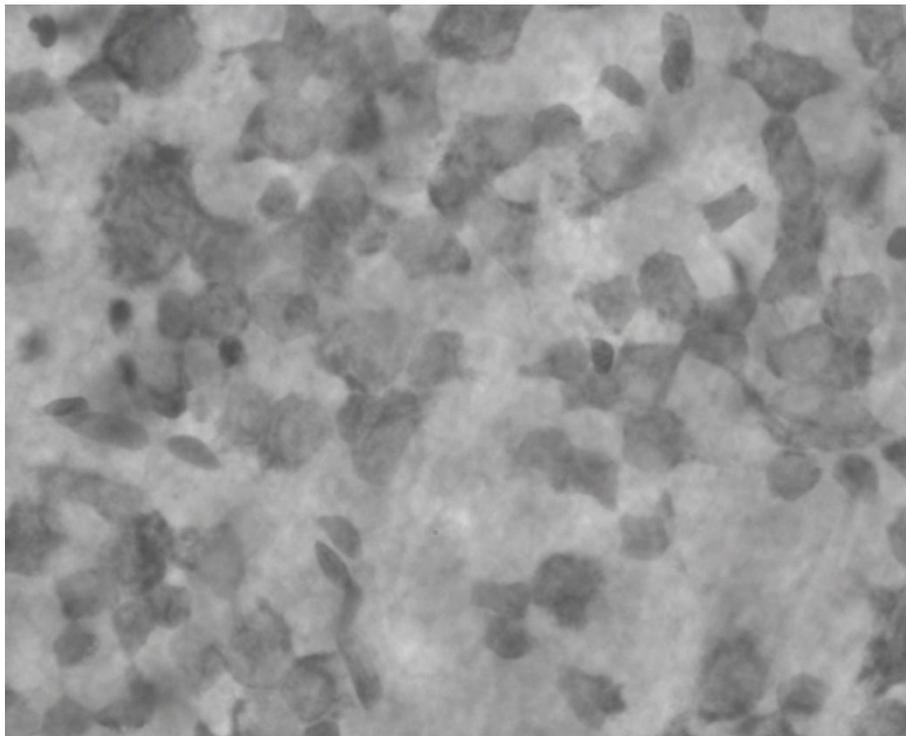
Die Netzhäute wurden zunächst in 10facher Vergrößerung gescreent, um nachfolgend die Gesichtsfelder in 40facher Vergrößerung aufzunehmen und histomorphometrisch auszuwerten. Die Ganglienzellen wurden nach den Kriterien von *Perry* bestimmt und besitzen eine Größe von  $\geq 80\mu\text{m}^2$  (Perry 1981). Exemplarisch zeigen die Abbildungen eine intakte nicht geschädigte Netzhaut und im Vergleich die Umgestaltung der retinalen Ganglienzellschicht nach einem Sehnervcrush. In *Abb. 8* und *Abb. 9* ist die unversehrte radiäre Struktur der Retina einerseits in 10facher andererseits in 40facher Vergrößerung vor einem Sehnervtrauma dargestellt. Die *Abb. 10* zeigt dementsprechend die Auflösung der radiären Struktur und die traumatisch induzierte Neuronenzahlreduktion. Die Tabelle 4 weist die Tiergruppen und ihre Behandlung auf.

**Tab. 4 Gruppeneinteilung**

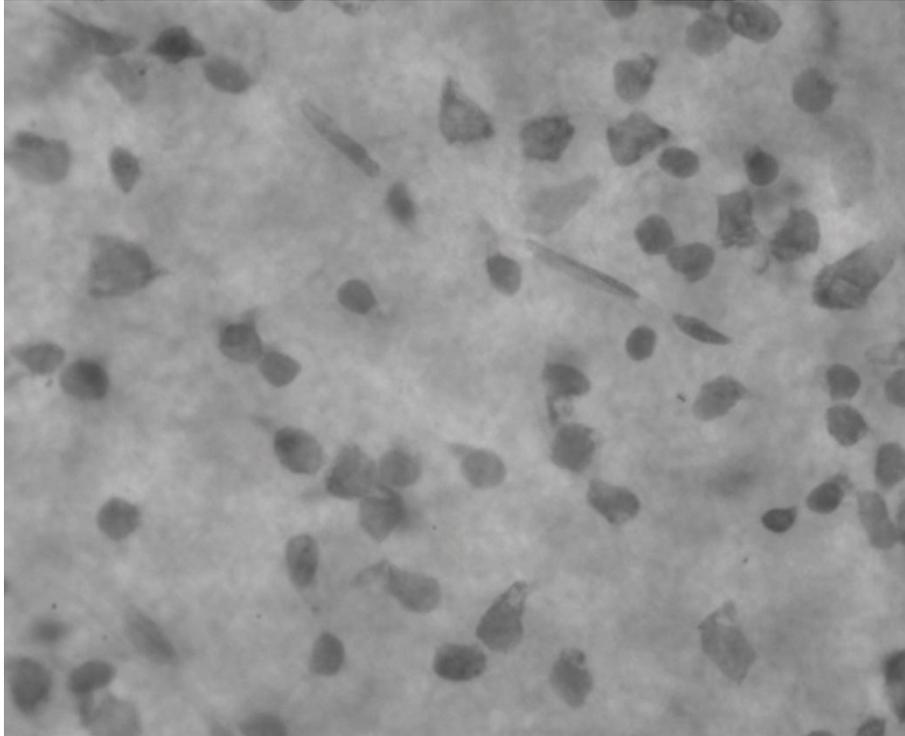
Versuchsgruppe	Anzahl
<b>NaCl (Kontrollgruppe)</b> Äquivalumina einer NaCl-Lösung	11
<b>Cyclodextrin (Kontrollgruppe)</b> Äquivalumina einer Cyclodextrinlösung	11
<b>Flunarizin (FLU)</b> Flunarizin 25 mg/kg KG+Cyclodextrin	9
<b>Methylprednisolon (MP)</b> Methylprednisolon 285 mg/kg KG/48h	9



**Abb. 8**    Übersichtsvergrößerung (10fach) einer ungeschädigten linken Netzhaut mit Papillenregion am unteren linken Bildrand



**Abb. 9**    40fache Vergrößerung derselben linken Netzhaut wie in Abb. 8



**Abb. 10** 40fache Vergrößerung einer kompressionsgeschädigten rechten Netzhaut (entspr. Abb. 9)

Die Netzhäute wurden zu 5 Lappen präpariert und jedem Lappen wurden 3 Gesichtsfelder zugeteilt, die wiederum zu zentralen, intermediären und peripheren Gesichtsfeldern (GF) zusammengefasst wurden. Somit formen die Gesichtsfelder 1; 4; 7; 10; 13 das zentrale Gesichtsfeld (Zone 1), die Felder 2; 5; 8; 11, 14 das intermediäre Gesichtsfeld (Zone 2) und die Gesichtsfelder 3; 6; 9; 12; 15 das periphere Gesichtsfeld (Zone 3).

## **3.2 Neurone der retinalen Ganglienzellschicht (RGL)**

### **3.2.1 Neuronzahl und Neuronfläche der Kontrollgruppen**

Das stumpfe Trauma des N. opticus bewirkt eine Schädigung der retinalen Ganglienzellen. Dabei werden die Neurone abhängig von ihrer Lage zur Papilla nervi optici in Mitleidenschaft gezogen. Der hier zugrunde liegende physikalische Mechanismus ist durch einen elastisch verformbaren Zylinder zu erklären. Aus diesem Grund werden die zentralen, intermediären und peripheren Gesichtsfelder zusätzlich separat ausgewertet.

#### **Neuronzahl in der NaCl- und Cyclodextrin-Gruppe (Cyclo)**

Die Untersuchungsgruppen, die nach der künstlich gesetzten Sehnervenkompression (s. 2.1.1) Cyclodextrin (s. 2.3) bzw. NaCl (s. 2.2.2) injiziert bekommen haben, dienen als Kontrollgruppen, da Methylprednisolon in NaCl und Flunarizin in Cyclodextrin gelöst wird. Die morphometrische Auswertung erfolgt semiautomatisch mittels der Quips Routine von Leica (s. 2.1.6). Die Tab. 5 präsentiert eine Übersicht der absoluten Neuronzahl der gesamten rechten und linken Netzhaut sowie differenziert nach zentralen, intermediären und peripheren Gesichtsfeldern. Die dazu gehörende relative Neuronzahl wird durch den R/L-Quotienten angegeben. Für die Signifikanzprüfung kommt der parametrische Zweistichproben-t-Test für den Vergleich der Mittelwerte unverbundener Stichproben aus der normal verteilten Grundgesamtheit mit gleichen Varianzen zur Anwendung. Bei ungleichen Varianzen wird der abgewandelte t-Test, der Welch-Test heißt, verwendet (s. Tab. 6).

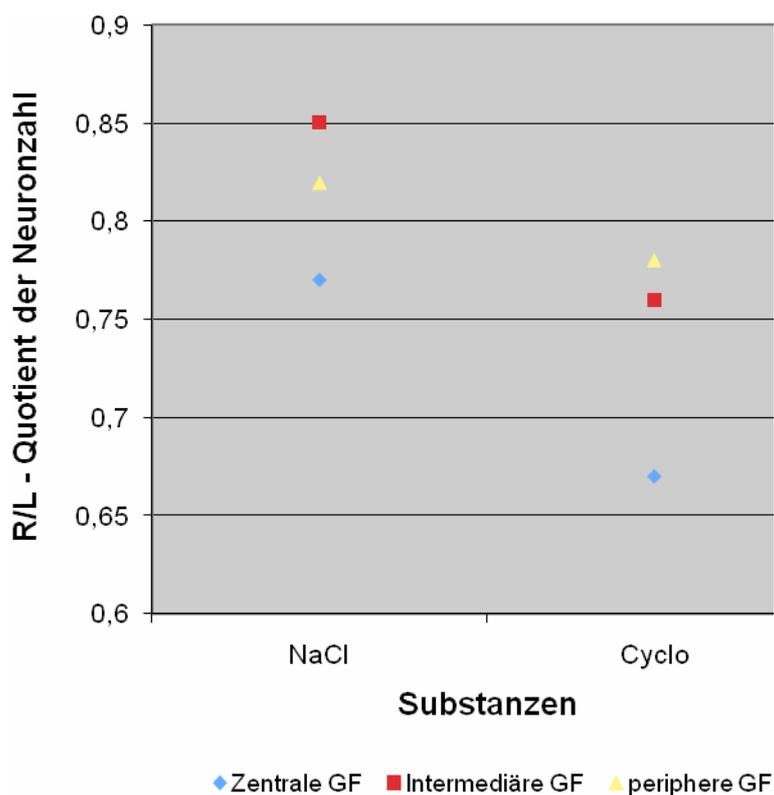
Tab. 5 Neuronzahlen von Kontrollgruppe NaCl und Cyclodextrin

	NaCl		R/L- Quotient	Cyclodextrin		R/L- Quotient
	Netzhaut Neuronzahl			Netzhaut Neuronzahl		
	rechts	links	rechts	links		
<b>Lage der GF</b>						
- zentral	4207	5447	0.77	4227	6226	0.67
- intermediär	3991	4717	0.85	3809	4958	0.76
- peripher	3258	3985	0.82	3234	4166	0.78
<b>Gesamt- Neuronzahl</b>	11456	14149	0.81	11270	15350	0.73

Tab. 6 Statistische Auswertung der Neuronzahlen der traumatisierten rechten Netzhäute von NaCl und Cyclodextrin

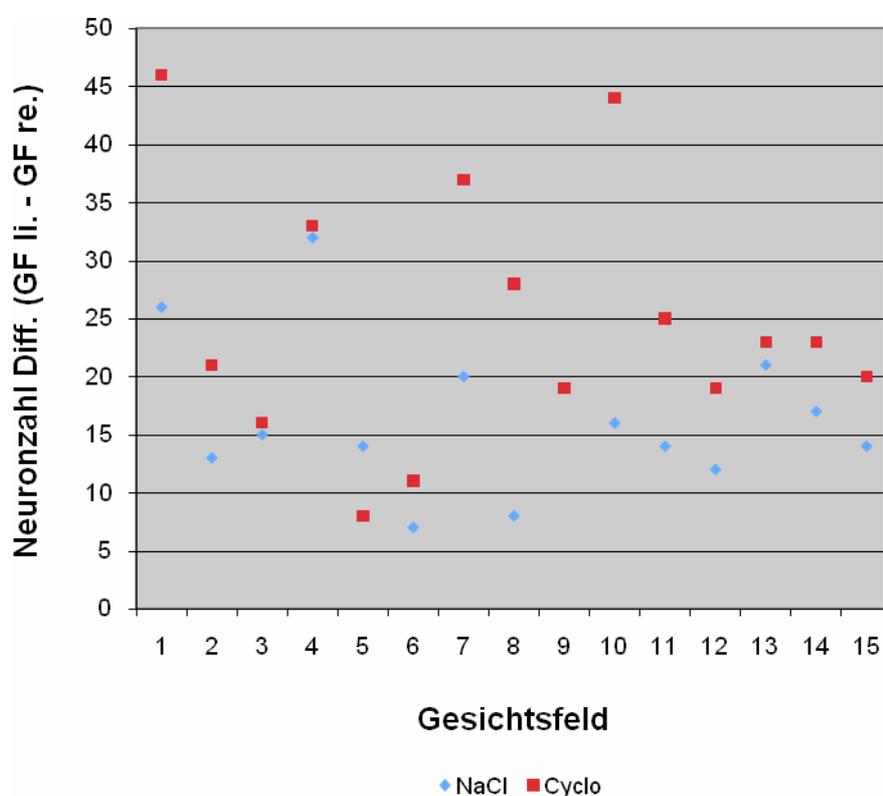
	Gesamtneuronzahl		GF-zentral		GF-intermediär		GF-peripher	
	NaCl	Cyclo	NaCl	Cyclo	NaCl	Cyclo	NaCl	Cyclo
<b>Xquer</b>	69.5	68.4	76.6	76.8	72.8	69.6	59.2	58.8
<b>s</b>	± 9.3	± 9.3	± 3.7	± 5.2	± 8.1	± 4.4	± 4.0	± 7.0
<b>t-Test</b>	p = 0.74							
<b>Welch´s t-Test</b>			p = 0.95		p = 0.47		p = 0.92	

Die semiautomatische Auswertung zeigt keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die absolute Gesamtneuronzahl der rechten Netzhaut der Gruppe mit NaCl und der Gruppe mit Cyclodextrin ( $p=0.74$ ). Die absolute Neuronzahl, differenziert nach Lage der Gesichtsfelder in Abhängigkeit vom Abstand zur Papilla nervi optici, zeigt zwischen der NaCl- und Cyclodextrin-Gruppe ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (GF-zentral:  $p=0.95$ ; GF-intermediär:  $p=0.47$ ; GF-peripher:  $p=0.92$ ). Daneben wird deutlich, dass die Neuronzahl der beiden Gruppen von zentral nach peripher hin abnimmt. Die relative Gesamtneuronzahl des Cyclodextrin (R/L-Quotient: 0.73) ist im Vergleich zu NaCl (R/L-Quotient: 0.81) niedriger, d.h. dass innerhalb der Cyclodextrin-Gruppe zwischen dem rechten traumatisierten N. opticus und dem linken nicht-traumatisierten Sehnerven im Vergleich um 8% mehr Neurone zugrunde gegangen sind als in der NaCl-Gruppe.



**Abb. 11** Relative Neuronzahl nach NaCl- bzw. Cyclodextrin-Behandlung

Die graphische Gegenüberstellung der relativen Neuronzahl in *Abb. 11* präsentiert bei Betrachtung der R/L-Quotienten der zentralen Gesichtsfelder (NaCl: 0.77 / Cyclodextrin: 0.67) einen um 10% stärkeren Neuronenuntergang bei Cyclodextrin hin. Ferner stellt sich bei Cyclodextrin die Reduktion der Neuronzahl im intermediären GF um 9% (NaCl: 0.85 / Cyclodextrin: 0.76) und im peripheren GF um 4% (NaCl: 0.82 / Cyclodextrin: 0.78) höher dar. Im Vergleich aller Gesichtsfelder liegt somit die größere relative Neuronzahlminderung bei Cyclodextrin vor.



**Abb. 12** Differenz der Neuronzahl (GF li.-GF re.) der NaCl- und Cyclodextrin-Gruppe

In *Abb. 12* ist eine Aufstellung der Neuronzahl vs. des Gesichtsfeldes zu sehen (siehe 3.1). Das zentrale Gesichtsfeld (1; 4; 7; 10; 13) in der Cyclodextrin-Gruppe präsentiert im Kurvenverlauf ausgeprägte Neuronzahldifferenzen, so

dass eine niedrigere Anzahl überlebender Neuronzellen angenommen werden kann. Die errechneten R/L-Quotienten verdeutlichen den Neuronuntergang in der Cyclodextrin-Gruppe (NaCl: 0.77 / Cyclo: 0.67). Anhand der Kurvenverläufe sind die Neuronzahldifferenzen im intermediären Gesichtsfeld (2; 8; 11; 14) in der Cyclodextrin-Gruppe ebenfalls höher als in der NaCl-Gruppe. Eine Ausnahme liefert das GF 5 in der Cyclodextrin-Gruppe mit einer niedrigeren Neuronzahldifferenz. Diese Tatsache trägt aber nicht zur Erhöhung des R/L-Quotienten bei (NaCl: 0.85 / Cyclo: 0.76). Das periphere Gesichtsfeld in der Cyclodextrin-Gruppe (3; 6; 12; 15) offenbart auch hier erkennbare Unterschiede in der Höhe der Differenzenausprägung. Nur im Gesichtsfeld 9 gleichen sich beide Versuchsgruppen im Bezug auf die Neuronzahldifferenzen. Auch hier bestätigt der R/L-Quotient (NaCl: 0.82 / Cyclo: 0.78) den Sachverhalt.

### **Neuronfläche in der NaCl- und Cyclodextrin-Gruppe**

Da das mechanisch gesetzte Sehnervtrauma (s. 2.1.1) nicht nur eine Schädigung der retinalen Ganglienzellanzahl, sondern auch eine Verkleinerung der retinalen Ganglienzellfläche mit sich bringt, wird in dieser Arbeit zudem die Fläche der retinalen Ganglienzellen histomorphometrisch (siehe 2.1.6) untersucht. Die zentralen, intermediären und peripheren Gesichtsfelder werden des Weiteren separat ausgewertet. In der nachfolgenden Tab. 7 findet eine Zusammenstellung der Ergebnisse der absoluten Neuronflächen rechter und linker Netzhäute sowie in Abhängigkeit von der Distanz der ausgezählten Gesichtsfelder zur Papilla nervi optici statt. Die errechnete relative Neuronfläche wird anhand des R/L-Quotient angegeben. Für die Signifikanzprüfung kommt der parametrische Zweistichproben-t-Test für den Vergleich der Mittelwerte unverbundener Stichproben aus der normal verteilten Grundgesamtheit mit gleichen Varianzen zur Anwendung. Bei ungleichen Varianzen wird der abgewandelte t-Test, der Welch-Test heißt, verwendet (s. Tab. 8).

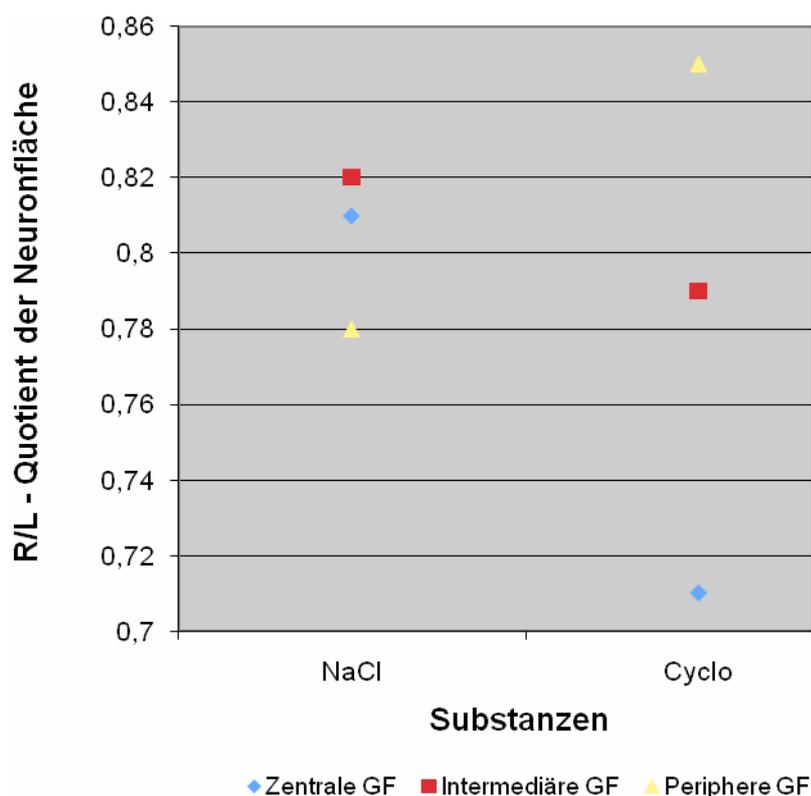
Tab. 7 Neuronfläche von Kontrollgruppe NaCl und Cyclodextrin

	NaCl		R/L- Quotient	Cyclodextrin		R/L- Quotient
	Netzhaut Neuronfläche in $\mu\text{m}^2$			Netzhaut Neuronfläche in $\mu\text{m}^2$		
	rechts	links		rechts	links	
<b>Lage der GF</b>						
- zentral	75.8	94.1	0.81	61.8	86.5	0.71
- intermediär	77.6	94.9	0.82	64.7	80.9	0.79
- peripher	74.8	95.5	0.78	67.8	79.5	0.85
<b>Gesamt- Neuronfläche</b>	228.2	284.5	0.8	194.3	246.9	0.78

Tab. 8 Statistische Auswertung der Neuronfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) der traumatisierten rechten Netzhäute von NaCl und Cyclodextrin

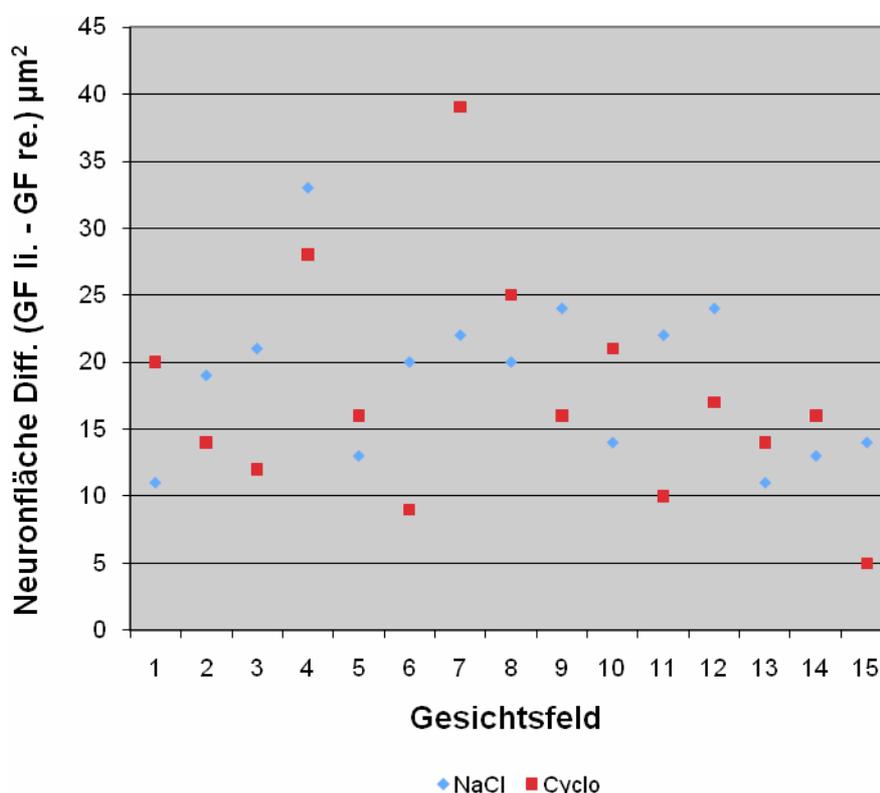
	Gesamtneuronfläche		GF-zentral		GF-intermediär		GF-peripher	
	NaCl	Cyclo	NaCl	Cyclo	NaCl	Cyclo	NaCl	Cyclo
<b>Xquer</b>	75.9	64.5	75.6	61.6	77.4	64.4	74.6	67.6
<b>s</b>	$\pm 3.6$	$\pm 5.2$	$\pm 4.6$	$\pm 3.1$	$\pm 1.5$	$\pm 4.8$	$\pm 4.1$	$\pm 6.2$
<b>Welch´s t-Test</b>	p < 0.001		p < 0.001		p = 0.002		p = 0.07	

Die semiautomatische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die absolute Gesamtneuronfläche der rechten Netzhaut in der NaCl- und in der Cyclodextrin-Gruppe ( $p < 0.001$ ), wobei die NaCl-Gruppe größere Neuronflächen aufweist. Die absolute Neuronfläche, differenziert nach Lage der Gesichtsfelder in Abhängigkeit vom Abstand zur Papilla nervi optici, lässt zwischen der NaCl- und Cyclodextrin-Gruppe im zentralen GF ( $p < 0.001$ ) sowie im intermediären GF ( $p = 0.002$ ) ebenfalls einen signifikanten Unterschied erkennen. Auch hier sind die gemessenen Neuroflächen in der NaCl-Gruppe höher. Die Neuronfläche im peripheren GF weist keinen signifikanten Unterschied auf ( $p = 0.07$ ). Allerdings ist die relative Gesamtneuronfläche in der Cyclodextrin-Gruppe im Vergleich zur NaCl-Gruppe um 2% kleiner (R/L-Quotient: 0.78 bzw. 0.8) d.h. dass die Neuronfläche fast in gleicher Größenordnung zugrunde gegangen ist unter Berücksichtigung des Verhältnisses der Neuronfläche des rechten traumatisierten N. opticus zum linken nicht-traumatisierten Sehnerven der Cyclodextrin- bzw. NaCl-Gruppe.



**Abb. 13** Relative Neuronfläche nach NaCl- bzw. Cyclodextrin-Behandlung

In Abb. 13 wird graphisch die Abhängigkeit der relativen Neuronfläche (R/L-Quotient) von der Distanz der ausgezählten Gesichtsfelder zur Papille sowie von der Behandlung dargestellt. Das zentrale Gesichtsfeld der Cyclodextrin-Gruppe verzeichnet den niedrigsten R/L-Quotienten von 0.71 und ergibt somit die stärkste Reduzierung der relativen Neuronfläche. Gegenüber der NaCl-Gruppe (R/L-Quotient: 0.81) erfolgt die Neuronflächenverringerung um 10%. Im intermediären GF bietet die NaCl- im Vergleich zur Cyclodextrin-Gruppe eine um 3% niedrigere Neuronflächenreduzierung. Wohingegen im peripheren Gesichtsfeld der Cyclodextrin-Gruppe die relative Neuronfläche am geringsten (R/L-Quotienten: 0.85) vermindert erscheint. Zum Vergleich ist die Neuronflächenreduktion in der NaCl-Gruppe (R/L-Quotienten: 0.78) um 7% höher.



**Abb. 14** Differenz der Neuronfläche (GF li.-GF re.) der NaCl- und Cyclodextrin-Gruppe

Die *Abb. 14* zeigt eine Aufstellung der Neuronfläche vs. des Gesichtsfeldes auf (siehe 3.1). Im aufgeführten Kurvenverlauf stellt das zentrale Gesichtsfeld (1; 7; 10; 13) in der Cyclodextrin-Gruppe höhere Neuronflächendifferenzen dar, so dass daraus eine geringere Neuronfläche in dieser Gruppe resultiert. Die errechneten R/L-Quotienten des zentralen Gesichtsfelds verdeutlichen die höhere Reduzierung der relativen Neuronfläche in der Cyclodextrin- (0.71) im Vergleich zur NaCl-Gruppe (0.81). Die Neuronflächendifferenzen des intermediären Gesichtsfeldes (5; 8; 14) in der Cyclodextrin-Gruppe liegen ebenfalls höher. Sonderfälle liefern die GFs 2 und 11 der Cyclodextrin-Gruppe mit einer ersichtlich niedrigeren Neuronflächendifferenz als in der NaCl-Gruppe. Diese Tatsache trägt zur Annäherung der R/L-Quotienten (NaCl: 0.82 / Cyclo: 0.79) bei. Das periphere Gesichtsfeld der Cyclodextrin-Gruppe (3; 6; 9; 12; 15) offenbart hier niedrigere Neuronflächendifferenzen d.h., dass im peripheren GF der NaCl-Gruppe eine deutliche Reduzierung der Neuronflächen stattgefunden hat. Der R/L-Quotient (NaCl: 0.78 / Cyclo: 0.85) bestätigt diese Feststellung.

### **3.2.2 Neuronzahl und Neuronfläche von Methylprednisolon (MP)**

#### **Neuronzahl in der Methylprednisolon- und NaCl-Gruppe**

Nach der künstlich gesetzten Sehnervenkompression (s. 2.1.1) folgt die Methylprednisolongabe nach Protokoll, wobei NaCl als Kontrollgruppe dient (s. 2.2.2). Die morphometrische Auswertung erfolgt semiautomatisch mittels der Quips Routine von Leica (s. 2.1.6). Die Tab. 9 zeigt eine Übersicht der absoluten Neuronzahl der gesamten rechten und linken Netzhaut sowie differenziert nach zentralen, intermediären und peripheren Gesichtsfeldern. Die relativen Neuronenzahl werden durch bilden des R/L-Quotienten errechnet. Für die Signifikanzprüfung kommt der parametrische Zweistichproben-t-Test für den Vergleich der Mittelwerte unverbundener Stichproben aus der normal verteilten Grundgesamtheit mit gleichen Varianzen zur Anwendung. Bei ungleichen

Varianzen wird der abgewandelte t-Test, der Welch-Test heißt, verwendet (s. Tab. 10).

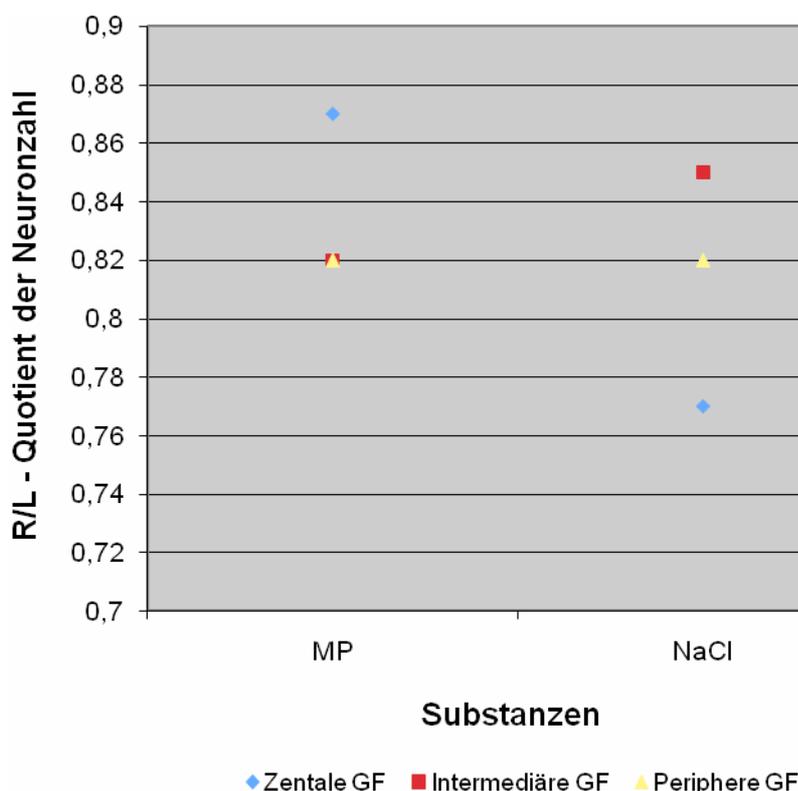
**Tab. 9 Neuronzahlen von Methylprednisolon und NaCl**

	MP		R/L-	NaCl		R/L-
	Neuronzahl		Quotient	Neuronzahl		Quotient
	rechts	links		rechts	links	
<b>Lage der GF</b>						
- zentral	3902	4437	0.87	4207	5447	0.77
- intermediär	3236	3908	0.82	3991	4717	0.85
- peripher	2665	3253	0.82	3258	3985	0.82
<b>Gesamt-Neuronzahl</b>	9803	11598	0.84	11456	14149	0.81

**Tab. 10 Statistische Auswertung der Neuronzahlen der traumatisierten rechten Netzhäute von Methylprednisolon und NaCl**

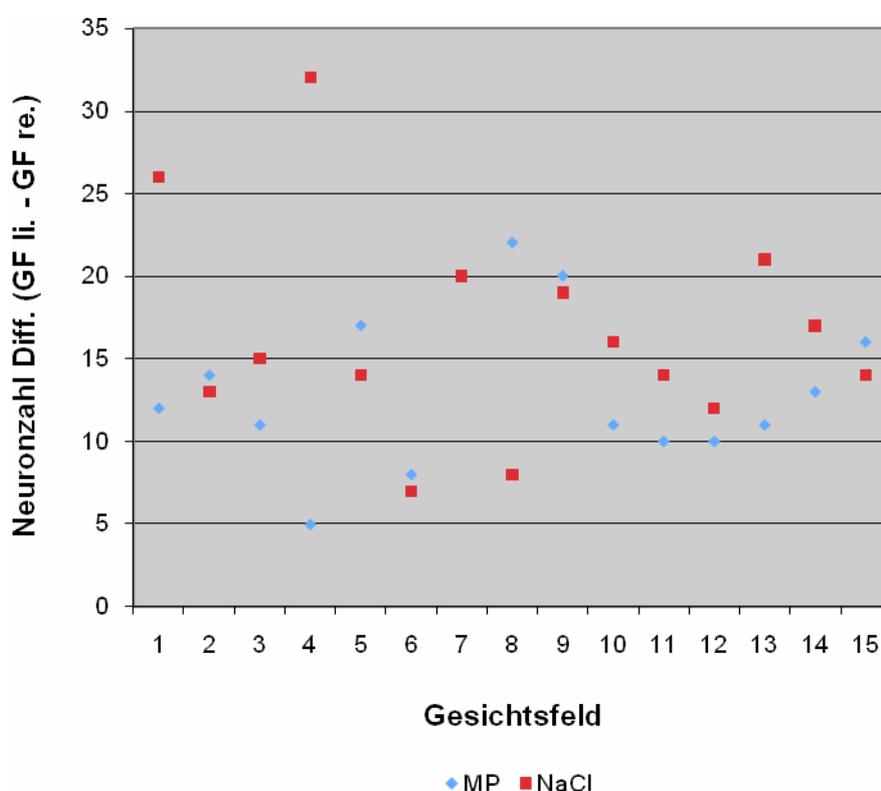
	Gesamtneuronzahl		GF-zentral		GF-intermediär		GF-peripher	
	MP	NaCl	MP	NaCl	MP	NaCl	MP	NaCl
<b>Xquer</b>	72.7	69.5	86.6	76.6	72.0	72.8	59.4	59.2
<b>s</b>	± 12.5	± 9.3	± 3.4	± 3.7	± 2.8	± 8.1	± 7.8	± 4.0
<b>Welch's t-Test</b>	p = 0.74		p = 0.002		p = 0.84		p = 0.96	

Die semiautomatische Auswertung zeigt keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die absolute Gesamtneuronzahl der rechten Netzhaut zwischen der NaCl- und Methylprednisolon-Gruppe ( $p=0.44$ ). Weiterhin werden signifikant mehr Neurone in der MP-Gruppe im zentralen GF ( $p=0.002$ ) gefunden. Im Gegensatz dazu besteht kein signifikanter Unterschied im intermediären GF ( $p=0.84$ ) und im peripheren GF ( $p=0.96$ ). Außerdem wird anhand der Tab. 9 erkennbar, dass die Neuronzahl der beiden Gruppen von zentral nach peripher hin abnimmt. Die relative Gesamtneuronzahl in der MP-Gruppe (R/L-Quotient: 0.84) ist im Vergleich zur NaCl-Gruppe (R/L-Quotient: 0.81) geringfügig höher, d.h. dass innerhalb der MP-Gruppe zwischen dem rechten traumatisierten N. opticus und dem linken nicht-traumatisierten Sehnerven im Vergleich zur NaCl-Gruppe 3% weniger Neurone zugrunde gegangen sind.



**Abb. 15** Relative Neuronzahl nach Methylprednisolon- bzw. NaCl-Behandlung

Bei dieser graphischen Gegenüberstellung der R/L-Quotienten in *Abb. 15* zeigt sich bei Betrachtung der zentralen Gesichtsfelder ein um 10% niedriger Neuronenuntergang in der MP- (R/L-Quotient: 0.87) als in der NaCl-Gruppe (R/L-Quotient: 0.77). Im intermediären Gesichtsfeld besteht nur eine 3%ig höhere Neuronzahlreduzierung in der MP- (R/L-Quotient: 0.82) als in der NaCl-Gruppe (R/L-Quotient: 0.85). Hingegen ist die Reduzierung der Neuronen im peripheren Gesichtsfeld bei beiden Substanzen mit einem R/L-Quotienten von 0.82 identisch.



**Abb. 16** Differenz der Neuronzahl (GF li.-GF re.) der MP- und NaCl-Gruppe

Die *Abb. 16* zeigt eine Aufstellung der Neuronzahl vs. des Gesichtsfeldes der MP- und NaCl-Gruppe dar. Anhand der Kurvenverläufe sind die Neuronzahldifferenzen im zentralen Gesichtsfeld deutlich (GF 1; 4; 10; 13). Das bedeutet, dass in der MP-Gruppe eine geringere Reduzierung der Neuronzahl

im zentralen Gesichtsfeld auftritt. Dies steht auch im Einklang mit dem errechneten R/L-Quotienten (MP: 0.87 / NaCl: 0.77). Im intermediären Gesichtsfeld sind die Differenzen weniger ausgeprägt (GF 2, 5, 11, 14). Nur im Gesichtsfeld 8 ist ein eindeutiger Unterschied zu erkennen. Hier legt die MP-Gruppe einen höheren Neuronniedergang dar. Dieser Umstand reicht aus, um Einfluss auf den R/L-Quotient (MP: 0,82 / NaCl: 0,85) zugunsten der NaCl-Gruppe zu nehmen. Im peripheren Gesichtsfeld (GF 3; 6; 9; 12; 15) sind keine Unterschiede zu verzeichnen. Dies wird mit dem gleichen R/L-Quotienten (MP: 0,82 / NaCl: 0,82) bestätigt.

### **Neuronfläche in der Methylprednisolon- und NaCl-Gruppe**

Das mechanisch gesetzte Sehnervtrauma (s. 2.1.1) zieht nicht nur eine Schädigung der retinalen Ganglienzellanzahl nach sich, sondern bringt auch eine Verkleinerung der retinalen Ganglienzellfläche mit sich. In dieser Arbeit wird deshalb die Fläche der retinalen Ganglienzellen histomorphometrisch (siehe 2.1.6) untersucht. Die zentralen, intermediären und peripheren Gesichtsfelder werden des Weiteren separat ausgewertet. In der folgenden Tab. 11 findet eine Zusammenstellung der Ergebnisse der absoluten Neuronflächen rechter und linker Netzhäute sowie in Abhängigkeit von der Distanz der ausgezählten Gesichtsfelder zur Papilla nervi optici statt. Die errechnete relative Neuronfläche wird anhand des R/L-Quotient angegeben. Für die Signifikanzprüfung kommt der parametrische Zweistichproben-t-Test für den Vergleich der Mittelwerte unverbundener Stichproben aus der normal verteilten Grundgesamtheit mit gleichen Varianzen zur Anwendung. Bei ungleichen Varianzen wird der abgewandelte t-Test, der Welch-Test heißt, verwendet (s. Tab. 12).

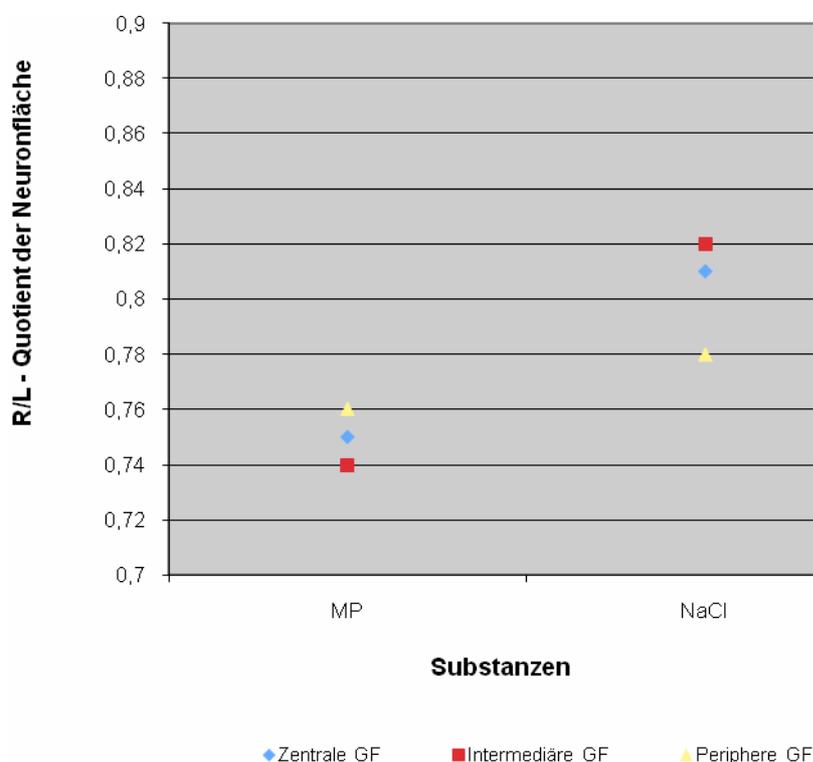
Tab. 11 Neuronfläche von Methylprednisolon (MP) und NaCl

	MP		R/L- Quotient	NaCl		R/L- Quotient
	Netzhaut Neuronfläche in $\mu\text{m}^2$			Netzhaut Neuronfläche in $\mu\text{m}^2$		
	rechts	links		rechts	links	
<b>Lage der GF</b>						
- zentral	67.5	90.1	0.75	75.8	94.1	0.81
- intermediär	66.5	89.5	0.74	77.6	94.9	0.82
- peripher	65.5	85.2	0.76	74.8	95.5	0.78
<b>Gesamt- Neuronfläche</b>	199.5	264.8	0.75	228.2	284.5	0.80

Tab. 12 Statistische Auswertung der Neuronfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) der traumatisierten rechten Netzhäute von Methylprednisolon (MP) und NaCl

	Gesamtneuronfläche		GF-zentral		GF-intermediär <sup>2</sup>		GF-peripher	
	MP	NaCl	MP	NaCl	MP	NaCl	MP	NaCl
<b>Xquer</b>	66.5	75.9	67.4	75.6	66.4	77.4	65.6	74.6
<b>s</b>	$\pm 2.7$	$\pm 3.6$	$\pm 2.3$	$\pm 4.6$	$\pm 3.1$	$\pm 1.5$	$\pm 3.0$	$\pm 4.1$
<b>Welch's t-Test</b>	p < 0.001		p = 0.01		p < 0.001		p = 0.005	

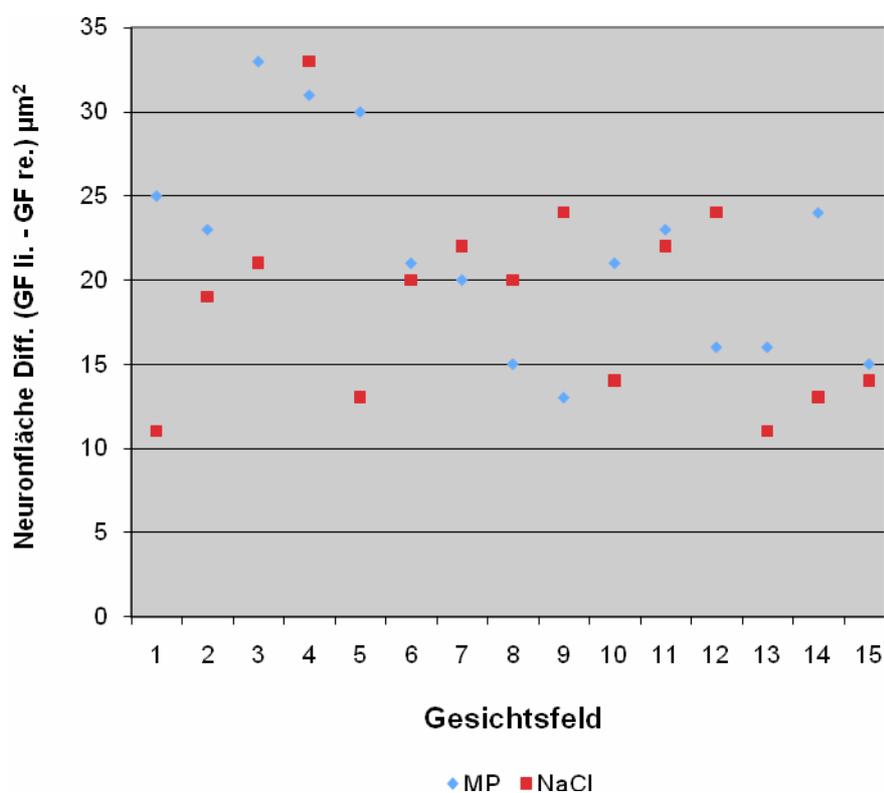
Die semiautomatische Auswertung weist eine signifikant niedrigere absolute Gesamtneuronfläche der rechten Netzhaut in der MP-Gruppe auf ( $p < 0.001$ ). Weiterhin werden signifikant geringere absolute Neuronfläche im zentralen GF ( $p = 0.01$ ), im intermediären GF ( $p < 0.001$ ) und im peripheren GF ( $p = 0.005$ ) in der MP-Gruppe gefunden. Die relative Gesamtneuronfläche der MP-Gruppe (R/L-Quotient: 0.75) ist um 5% niedriger ausgefallen als in der NaCl-Gruppe (R/L-Quotient: 0.8), d.h. dass innerhalb der MP-Gruppe zwischen dem rechten traumatisierten N. opticus und dem linken nicht-traumatisierten Sehnerven die Neuronfläche im Vergleich zur NaCl-Gruppe abgenommen hat.



**Abb. 17** Relative Neuronfläche nach Methylprednisolon- bzw. NaCl-Behandlung

Bei dieser graphischen Gegenüberstellung der relativen Neuronfläche (R/L-Quotienten) in *Abb. 17* stellt sich bei Untersuchung zentraler Gesichtsfelder

eine um 6% höhere Neuronflächenreduzierung in der MP- (R/L-Quotient: 0.75) als in der NaCl-Gruppe (R/L-Quotient: 0.81) dar. Im intermediären Gesichtsfeld lässt sich in der MP-Gruppe eine Neuronflächenreduktion um 8% (R/L-Quotient MP: 0.74 / NaCl: 0.82) und im peripheren Gesichtsfeld lediglich um 2% (R/L-Quotient MP: 0.76 / NaCl 0.78) gegenüber der NaCl-Gruppe beobachten.



**Abb. 18** Differenz der Neuronfläche (GF li.-GF re.) der MP- und NaCl-Gruppe

Die Abb. 18 veranschaulicht die Aufstellung der Neuronfläche vs. des Gesichtsfeldes (siehe 3.1). Im Kurvenverlauf des zentralen Gesichtsfeldes der MP-Gruppe (1; 10; 13) sind höhere Neuronflächendifferenzen im Gegensatz zur NaCl-Gruppe zu sehen. Die Gesichtsfelder 4 und 7 zeigen eine niedrigere Differenz auf. Diese Beobachtung deutet auf eine kleinere Neuronfläche bei MP im zentralen GF nach Sehnervtrauma hin und wird durch R/L-Quotienten NaCl: 0.81 und MP: 0.75 gestützt. Das intermediäre Gesichtsfeld (2; 5; 11; 14) der

Methylprednisolongruppe veranschaulicht wie schon zuvor im zentralen GF höhere Neuronflächendifferenzen. Im Gesichtsfeld 8 herrscht eine gegensätzliche Sachlage. Diese Tatsache trägt zur Annäherung der R/L-Quotienten (NaCl: 0.82 / MP: 0.74) bei. Die Methylprednisolongruppe präsentiert im peripheren Gesichtsfeld (3; 6; 15) höhere Neuronflächendifferenzen. Im Gesichtsfelder 9 und 12 allerdings niedrigere Werte. Dies spiegelt sich in den errechneten R/L-Quotienten NaCl: 0.78 und MP: 0.76 wieder.

### **3.2.3 Neuronzahl und Neuronfläche von Flunarizin (FLU)**

#### **Neuronzahl in der Flunarizin- und Cyclodextrin-Gruppe**

Nach der künstlich gesetzten Sehnervenkompression (siehe 2.1.1) folgt die Gabe des Calciumantagonisten Flunarizin nach Protokoll, wobei Cyclodextrin als Kontrollgruppe dient (s. 2.3). Die morphometrische Auswertung erfolgt semiautomatisch mittels der Quips Routine von Leica (s. 2.1.6). Die Tab. 13 zeigt eine Übersicht der absoluten Neuronzahl der gesamten rechten und linken Netzhaut sowie differenziert nach zentralen, intermediären und peripheren Gesichtsfeldern. Die relativen Neuronenzahl werden durch bilden des R/L-Quotienten errechnet. Für die Signifikanzprüfung kommt der parametrische Zweistichproben-t-Test für den Vergleich der Mittelwerte unverbundener Stichproben aus der normal verteilten Grundgesamtheit mit gleichen Varianzen zur Anwendung. Bei ungleichen Varianzen wird der abgewandelte t-Test, der Welch-Test heißt, verwendet (s. Tab. 14).

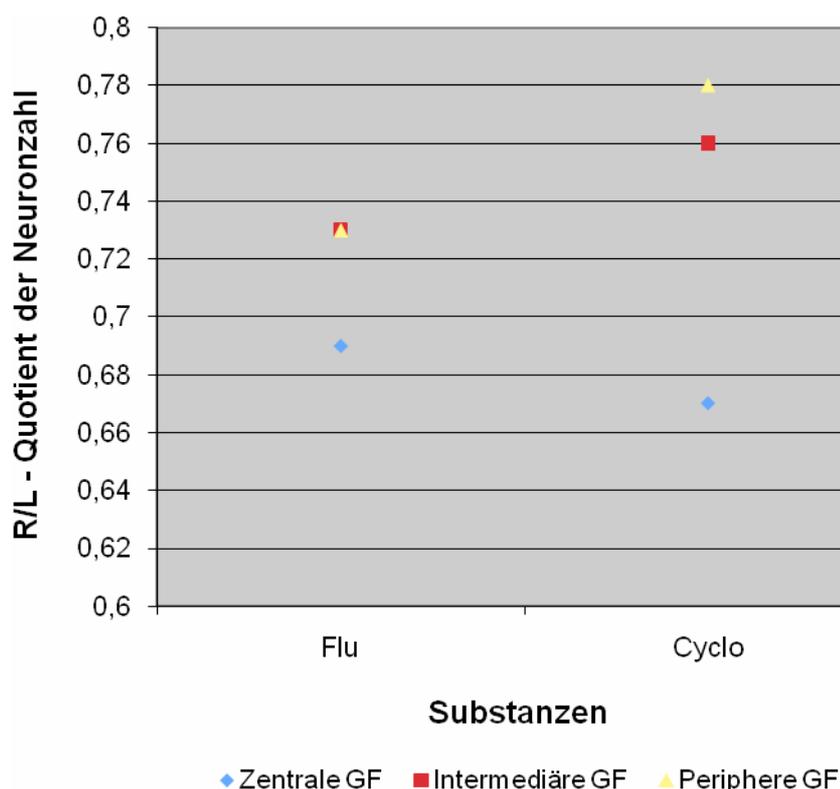
Tab. 13 Neuronzahl von Flunarizin (FLU) und Cyclodextrin (Cyclo)

	FLU		R/L- Quotient	Cyclo		R/L- Quotient
	Netzhaut Neuronzahl			Netzhaut Neuronzahl		
Lage der GF	rechts	links		rechts	links	
- zentral	3210	4621	0.69	4227	6226	0.67
- intermediär	2780	3811	0.73	3809	4958	0.76
- peripher	2324	3199	0.73	3234	4166	0.78
<b>Gesamt- Neuronzahl</b>	8314	11631	0.71	11270	15350	0.73

Tab. 14 Statistische Auswertung der Neuronzahlen der traumatisierten rechten Netzhäute von Flunarizin (FLU) und Cyclodextrin (Cyclo)

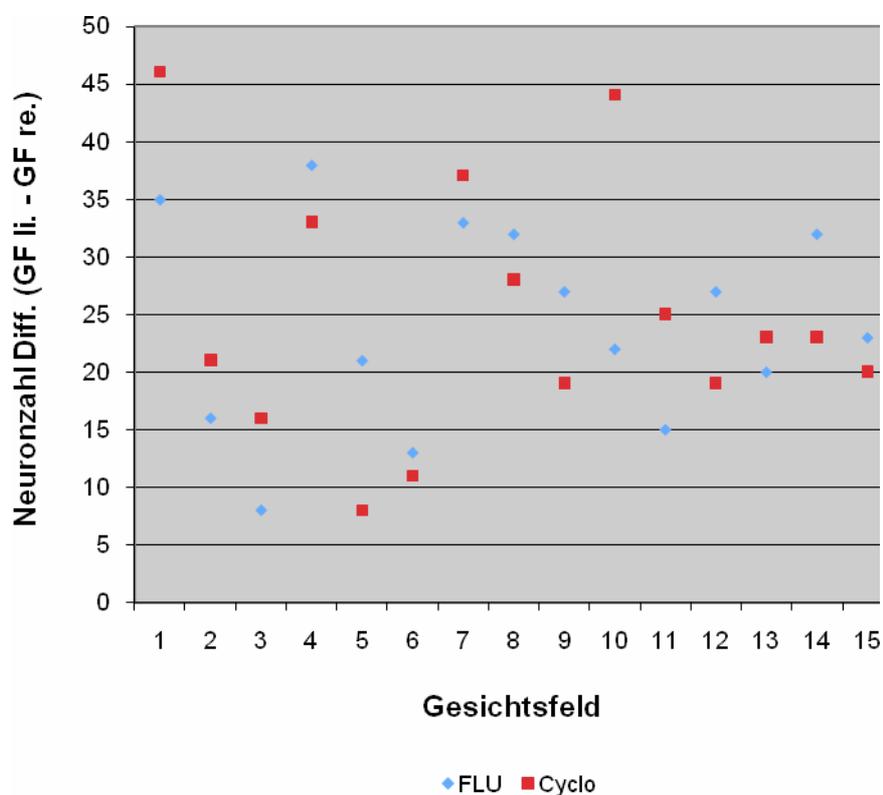
	Gesamtneuronzahl		GF-zentral		GF-intermediär		GF-peripher	
	FLU	Cyclo	FLU	Cyclo	FLU	Cyclo	FLU	Cyclo
<b>Xquer</b>	61.5	68.4	71.2	76.8	61.6	69.6	51.8	58.8
<b>s</b>	± 9.3	± 9.3	± 2.2	± 5.2	± 5.3	± 4.4	± 6.1	± 7.0
<b>Welch's t-Test</b>	p = 0.05		p = 0.08		p = 0.03		p = 0.13	

Die semiautomatische Auswertung zeigt in der FLU-Gruppe signifikant niedrigere absolute Gesamtneuronzahl der Netzhaut im Vergleich zur Cyclodextrin-Gruppe ( $p=0.05$ ). Die absolute Neuronzahl, differenziert nach Lage der Gesichtsfelder in Abhängigkeit vom Abstand zur Papilla nervi optici weist keinen signifikanten Unterschied zwischen der FLU- und der Cyclodextrin-Gruppe im zentralen GF ( $p=0.08$ ) und peripheren GF ( $p=0.13$ ) auf. Allerdings sind die absoluten Neuronzahlen im intermediären GF in der FLU-Gruppe signifikant niedriger als in der Cyclodextrin-Gruppe ( $p=0.03$ ). Zudem wird anhand der Tab. 13 ersichtlich, dass die absoluten Neuronzahlen der beiden Gruppen von zentral nach peripher hin abnehmen. Die relative Gesamtneuronzahl der FLU-Gruppe (R/L-Quotient: 0.71) ist im Vergleich zur Cyclodextrin-Gruppe (R/L-Quotient: 0.73) geringfügig niedriger, d.h. dass innerhalb der FLU-Gruppe zwischen dem rechten traumatisierten N. opticus und dem linken nicht-traumatisierten Sehnerven im Vergleich zur Cyclodextrin-Gruppe 2% mehr Neurone zugrunde gegangen sind.



**Abb. 19** Relative Neuronzahl nach Flunarizin- bzw. Cyclodextrin-Behandlung

Die graphische Gegenüberstellung der relativen Neuronzahl in *Abb. 19* legt bei Betrachtung der R/L-Quotienten der zentralen Gesichtsfelder (FLU: 0.69 / Cyclodextrin: 0.67) einen um 2% geringeren Neuronenuntergang in der FLU-Gruppe dar. Im Gegensatz dazu findet im intermediären Gesichtsfeld (FLU: 0.73 / Cyclo: 0.76) eine um 3% und im peripheren GF (FLU: 0.73 / Cyclo: 0.78) eine um 5% höhere Reduktion der Neuronzahl in der FLU-Gruppe statt.



**Abb. 20** Differenz der Neuronzahl (GF li.-GF re.) der FLU- und Cyclodextrin-Gruppe

In *Abb. 20* wird die Aufstellung der Neuronzahl vs. des Gesichtsfeldes zusammengestellt. Anhand des Diagrammverlaufs sind die Ergebnisse der Neuronzahldifferenzen in den überwiegenden zentralen Gesichtsfeldern (1; 7; 10; 13) in der FLU-Gruppe niedriger. Infolgedessen ist nach dem gesetzten Sehnervtrauma zentral eine höhere Anzahl überlebender Neuronzellen

feststellbar. Die erhobenen R/L-Quotienten (FLU: 0.69 / Cyclo: 0.67) stützen dieses Ergebnis. Sowohl in den vorherrschenden intermediären Gesichtsfeldern (5; 8; 14), als auch im peripheren Gesichtsfeld (6; 9; 12; 15) liegen die Neuronzahldifferenzen in der FLU-Gruppe höher. Dies steht auch im Einklang mit dem kalkulierten intermediären bzw. peripheren R/L-Quotienten (FLU: 0.73 / Cyclo: 0.76 bzw. FLU: 0.73 / Cyclo: 0.78). Das bedeutet, dass die FLU-Gruppe eine geringfügig niedrigere Anzahl an überlebenden Neuronzellen in diesen Gesichtsfeldern aufweist.

### **Neuronfläche in der Flunarizin- und Cyclodextrin-Gruppe**

In der nachkommenden Tab. 15 wird eine Übersicht der absoluten Neuronflächen rechter und linker Netzhäute sowie in Abhängigkeit von der Distanz der ausgezählten Gesichtsfelder zur Papilla nervi optici dargestellt. Die errechnete relative Neuronfläche wird anhand des R/L-Quotient angegeben. Für die Signifikanzprüfung kommt der parametrische Zweistichproben-t-Test für den Vergleich der Mittelwerte unverbundener Stichproben aus der normal verteilten Grundgesamtheit mit gleichen Varianzen zur Anwendung. Bei ungleichen Varianzen wird der abgewandelte t-Test, der Welch-Test heißt, verwendet (s. Tab. 16).

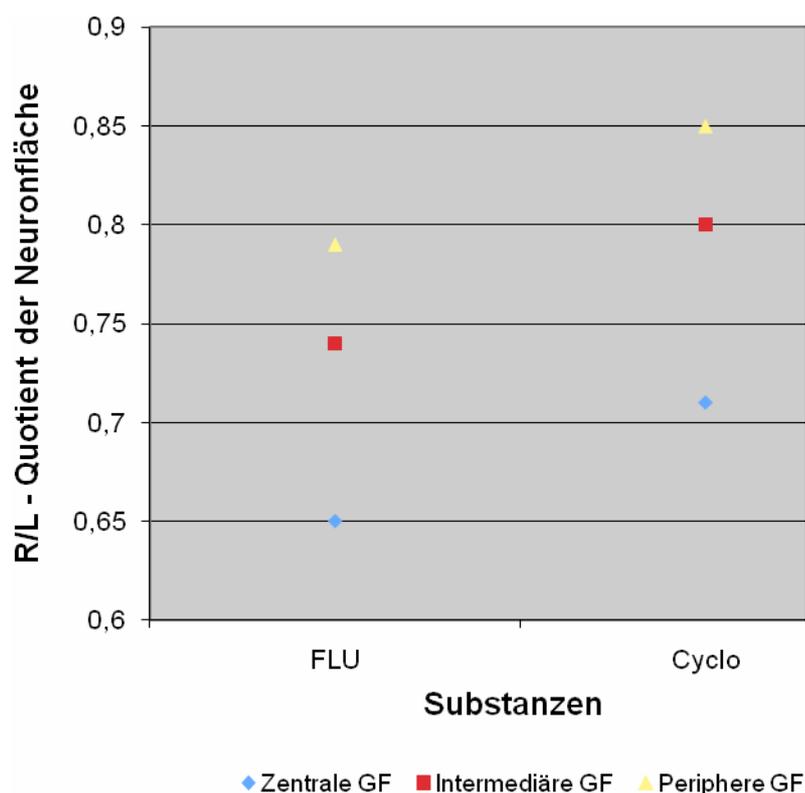
Tab. 15 Neuronfläche von Flunarizin (FLU) und Cyclodextrin (Cyclo)

	FLU		R/L- Quotient	Cyclo		R/L- Quotient
	Netzhaut Neuronfläche in $\mu\text{m}^2$			Netzhaut Neuronfläche in $\mu\text{m}^2$		
	rechts	links		rechts	links	
<b>Lage der GF</b>						
- zentral	55.8	85.6	0.65	61.8	86.5	0.71
- intermediär	62.4	84.7	0.74	64.7	80.9	0.80
- peripher	64.2	80.4	0.79	67.8	79.5	0.85
<b>Gesamt- Neuronfläche</b>	182.4	250.7	0.73	194.3	246.9	0.78

Tab. 16 Statistische Auswertung der Neuronfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) der traumatisierten rechten Netzhäute von Flunarizin (FLU) und Cyclodextrin (Cyclo)

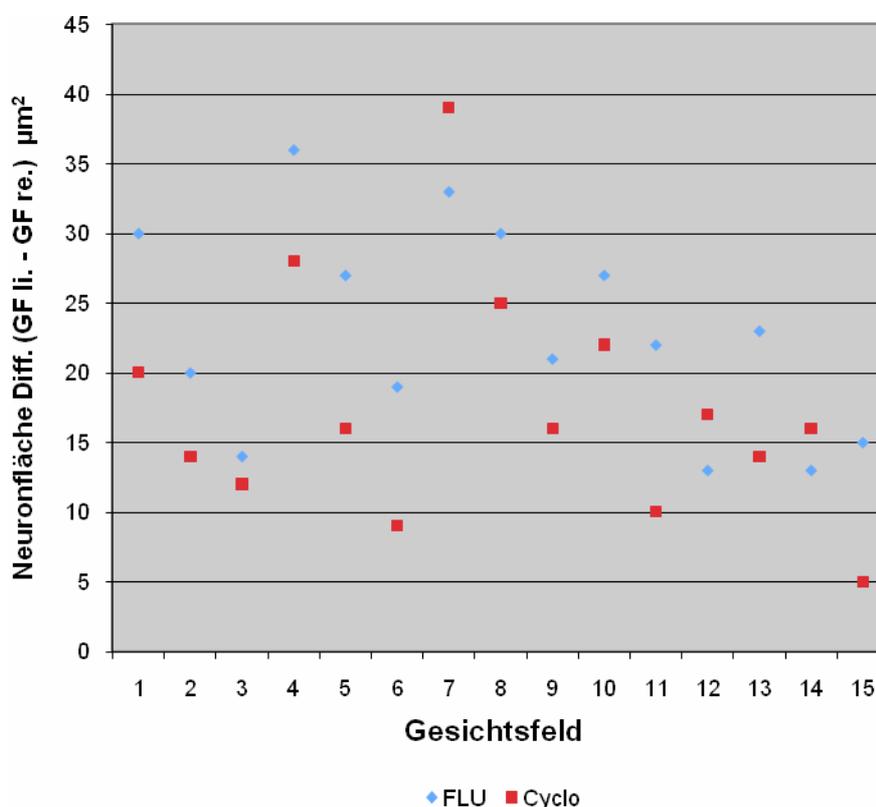
	Gesamtneuronfläche		GF-zentral		GF-intermediär		GF-peripher	
	FLU	Cyclo	FLU	Cyclo	FLU	Cyclo	FLU	Cyclo
<b>Xquer</b>	60.7	64.5	55.8	61.6	62.2	64.4	64.2	67.6
<b>s</b>	$\pm 6.1$	$\pm 5.2$	$\pm 4.0$	$\pm 3.1$	$\pm 5.50$	$\pm 4.8$	$\pm 6.1$	$\pm 6.2$
<b>Welch´s t-Test</b>	$p < 0.08$		$p = 0.03$		$p = 0.52$		$p = 0.4$	

Die semiautomatische Auswertung zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen der FLU- und der Cyclodextrin-Gruppe hinsichtlich der absoluten Gesamtneuronfläche ( $p=0.08$ ). Die absolute Neuronfläche, differenziert nach Lage der Gesichtsfelder in Abhängigkeit vom Abstand zur Papilla nervi optici weist ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der FLU- und der Cyclodextrin-Gruppe im intermediären GF ( $p=0.52$ ) und peripheren GF ( $p=0.41$ ) auf. Allerdings ist die absolute Neuronfläche im zentralen GF in der FLU-Gruppe signifikant niedriger als in der Cyclodextrin-Gruppe ( $p=0.04$ ). Die relative Gesamtneuronfläche der FLU-Gruppe (R/L-Quotient: 0.73) ist im Vergleich zur Cyclodextrin-Gruppe (R/L-Quotient: 0.78) um 5% niedriger, d.h. dass innerhalb der FLU-Gruppe zwischen dem rechten traumatisierten N. opticus und dem linken nicht-traumatisierten Sehnerven die Neuronfläche sich im Vergleich zur Cyclodextrin-Gruppe verkleinert hat.



**Abb. 21** Relative Neuronfläche nach Flunarizin- bzw. Cyclodextrin-Behandlung

Die graphische Gegenüberstellung der relativen Neuronfläche (R/L-Quotient) in *Abb. 23* macht bei Betrachtung der FLU-Gruppe eine Neuronflächenreduzierung im zentralen (FLU: 0.65 / Cyclo: 0.71), intermediären (FLU: 0.74 / Cyclo: 0.8) und peripheren Gesichtsfeld (FLU: 0.79 / Cyclo: 0.85) deutlich. Die FLU-Gruppe schneidet in allen Gesichtsfeldern um 6% schlechter ab.



**Abb. 22** Differenz der Neuronfläche (GF li.-GF re.) der FLU- und Cyclodextrin-Gruppe

In *Abb. 22* wird die Aufstellung der Neuronfläche vs. des Gesichtsfeldes zusammengestellt. Anhand des Diagrammverlaufs sind die Ergebnisse der Neuronflächendifferenzen in den überwiegenden zentralen Gesichtsfeldern (1; 4; 10, 13) in der FLU-Gruppe höher. Deshalb ist nach dem gesetzten Sehnervtrauma zentral eine kleinere Neuronfläche vorhanden, so dass die im

zentralen Gesichtsfeld befindlichen Neuronzellen der Cyclodextringruppe eine größere Neuronfläche besitzen. Die erhobenen R/L-Quotienten (FLU: 0.65 / Cyclo: 0.71) stützen dieses Ergebnis. Sowohl in den vorherrschenden intermediären Gesichtsfeldern (2; 5; 8; 11), als auch in peripheren Gesichtsfeldern (3; 6; 9; 15) liegen die Neuronflächendifferenzen der FLU-Gruppe insgesamt höher. Dies steht auch im Einklang mit dem kalkulierten intermediären bzw. peripheren R/L-Quotienten (FLU: 0.74 / Cyclo: 0.8 bzw. FLU: 0.79 / Cyclo: 0.85). Das bedeutet, dass in der FLU-Gruppe eine deutlich niedrigere Neuronfläche der überlebenden Neuronzellen herrscht.

### **3.2.4 Neuronzahl und Neuronfläche von Flunarizin (FLU) und Methylprednisolon (MP) im Vergleich**

#### **Neuronzahl in der FLU- und MP-Gruppe**

Die Tab. 17 zeigt eine Übersicht der absoluten Neuronzahl der gesamten rechten und linken Netzhaut sowie differenziert nach zentralen, intermediären und peripheren Gesichtsfeldern. Die relativen Neuronenzahl werden durch bilden des R/L-Quotienten errechnet. Für die Signifikanzprüfung kommt der parametrische Zweistichproben-t-Test für den Vergleich der Mittelwerte unverbundener Stichproben aus der normal verteilten Grundgesamtheit mit gleichen Varianzen zur Anwendung. Bei ungleichen Varianzen wird der abgewandelte t-Test, der Welch-Test heißt, verwendet (s. Tab. 18).

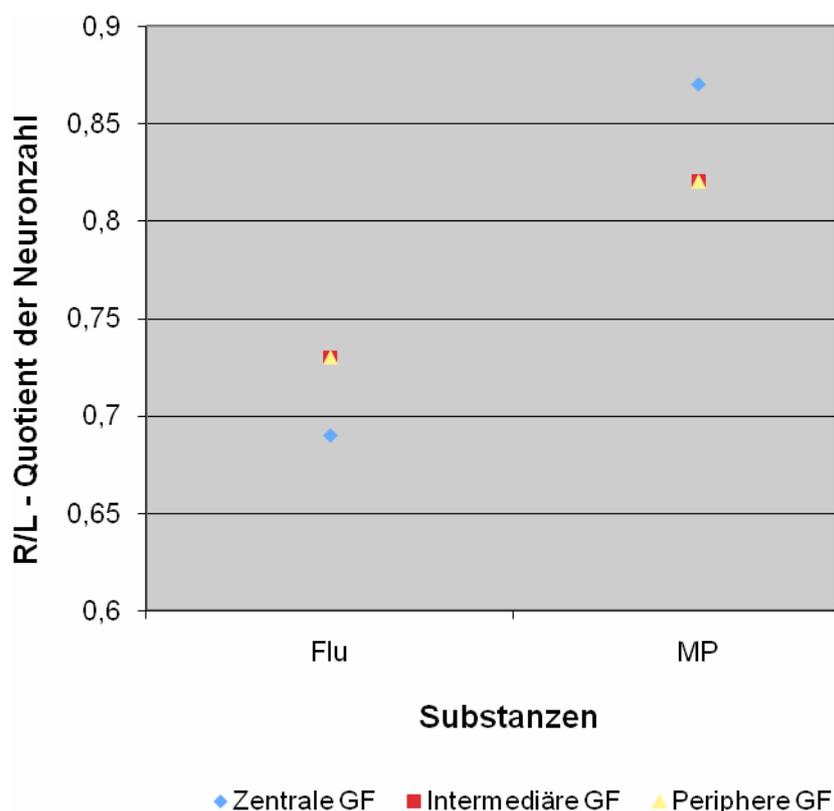
Tab. 17 Neuronzahl von Flunarizin (FLU) und Methylprednisolon (MP)

Lage der GF	FLU		R/L- Quotient	MP		R/L- Quotient
	Netzhaut Neuronzahl			Netzhaut Neuronzahl		
	rechts	links		rechts	links	
- zentral	3210	4621	0.69	3902	4437	0.87
- intermediär	2780	3811	0.73	3236	3908	0.82
- peripher	2324	3199	0.73	2665	3253	0.82
<b>Gesamt- Neuronzahl</b>	8314	11631	0.71	9803	11598	0.84

Tab. 18 Statistische Auswertung der Neuronzahlen der traumatisierten rechten Netzhäute von Flunarizin (FLU) und Methylprednisolon (MP)

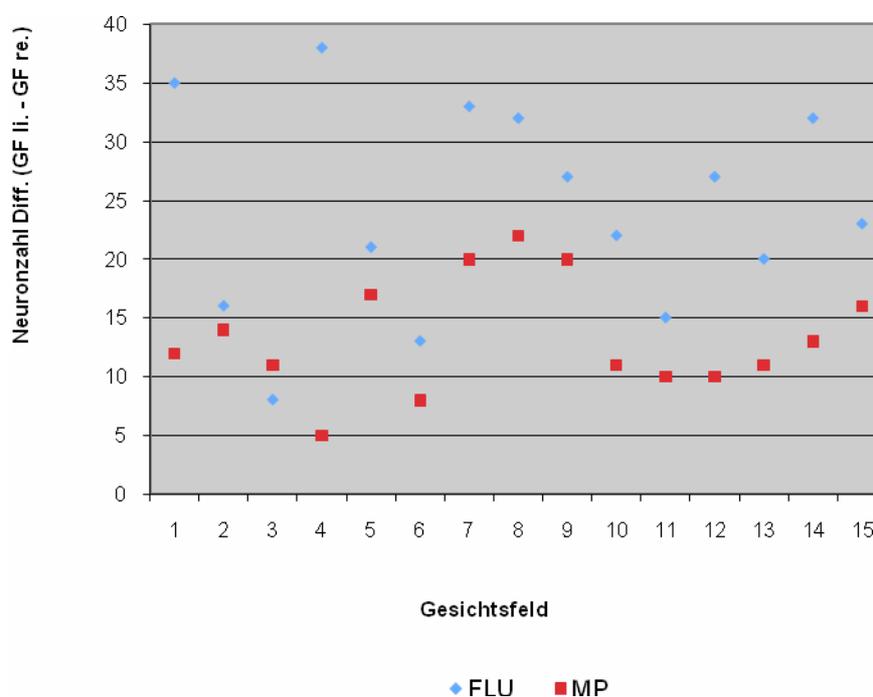
	Gesamtneuronzahl		GF-zentral		GF-intermediär		GF-peripher	
	FLU	MP	FLU	MP	FLU	MP	FLU	MP
<b>Xquer</b>	61.5	72.7	71.2	86.6	61.6	72.0	51.8	59.4
<b>s</b>	± 9.3	± 12.5	± 2.2	± 3.4	± 5.3	± 2.8	± 6.1	± 7.8
<b>Welch´s t-Test</b>	p = 0.01		p < 0.001		p = 0.008		p = 0.13	

Die semiautomatische Auswertung zeigt in der FLU-Guppe signifikant niedrigere absolute Gesamtneuronzahl der Netzhaut im Vergleich zur MP-Gruppe ( $p=0.01$ ). Die absolute Neuronzahl der FLU-Gruppe, differenziert nach Lage der Gesichtsfelder in Abhängigkeit vom Abstand zur Papilla nervi optici, weist ebenfalls einen signifikant niedrigen Wert im zentralen ( $p<0.001$ ) und intermediären ( $p=0.008$ ) auf. Die absoluten Neuronzahlen im peripheren GF unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0.13$ ). Daneben wird anhand der Tab. 17 deutlich, dass die absoluten Neuronzahlen der beiden Gruppen von zentral nach peripher hin abnehmen. Die relative Gesamtneuronzahl der FLU-Gruppe (R/L-Quotient: 0.71) ist im Vergleich zur MP-Gruppe (R/L-Quotient: 0.84) deutlich niedriger, d.h. dass innerhalb der FLU-Gruppe zwischen dem rechten traumatisierten N. opticus und dem linken nicht-traumatisierten Sehnerven im Vergleich zur MP-Gruppe 13% mehr Neurone zugrunde gegangen sind.



**Abb. 23** Relative Neuronzahl nach Flunarizin- bzw. Methylprednisolon-Behandlung

Die graphische Gegenüberstellung der relativen Neuronzahl in *Abb. 23* legt bei Betrachtung der R/L-Quotienten der zentralen Gesichtsfelder (FLU: 0.69 / MP: 0.87) einen um 18% höheren Neuronenuntergang in der FLU-Gruppe dar. Im intermediären GF (FLU: 0.73 / MP: 0.82) und peripheren GF (FLU: 0.73 / MP: 0.82) findet eine um 9% höhere Reduktion der Neuronzahl in der FLU-Gruppe statt.



**Abb. 24** Differenz der Neuronzahl (GF li.-GF re.) der FLU- und MP-Gruppe

Die *Abb. 24* zeigt eine Aufstellung der Neuronzahl vs. des Gesichtsfeldes. Anhand des Diagrammverlaufs sind die Ergebnisse der Neuronzahldifferenzen in den zentralen Gesichtsfeldern (1; 4, 7; 10; 13) der FLU-Gruppe höher. Infolgedessen ist nach dem gesetzten Sehnervtrauma zentral eine niedrigere Anzahl überlebender Neuronzellen feststellbar. Die erhobenen R/L-Quotienten (FLU: 0.69 / MP: 0.87) stützen dieses Ergebnis. In den intermediären

Gesichtsfeldern (2, 5; 8; 11; 14) und überwiegend peripheren GF (6; 9; 12; 15) sind ebenfalls höhere Neuronzahlendifferenzen in der FLU-Gruppe zu sehen. Dies steht auch im Einklang mit dem kalkulierten intermediären bzw. peripheren R/L-Quotienten (FLU: 0.73 / MP: 0.82). Das bedeutet, dass die FLU-Gruppe auch hier eine niedrigere Anzahl an überlebenden Neuronzellen aufweist.

### **Neuronfläche in der FLU- und MP-Gruppe**

Die Tab. 19 stellt die Ergebnisse der absoluten Neuronflächen rechter und linker Netzhäute sowie in Abhängigkeit von der Distanz der ausgezählten Gesichtsfelder zur Papilla nervi optici zusammen. Die errechnete relative Neuronfläche wird anhand des R/L-Quotient angegeben. Für die Signifikanzprüfung kommt der parametrische Zweistichproben-t-Test für den Vergleich der Mittelwerte unverbundener Stichproben aus der normal verteilten Grundgesamtheit mit gleichen Varianzen zur Anwendung. Bei ungleichen Varianzen wird der abgewandelte t-Test, der Welch-Test heißt, verwendet (s. Tab. 20).

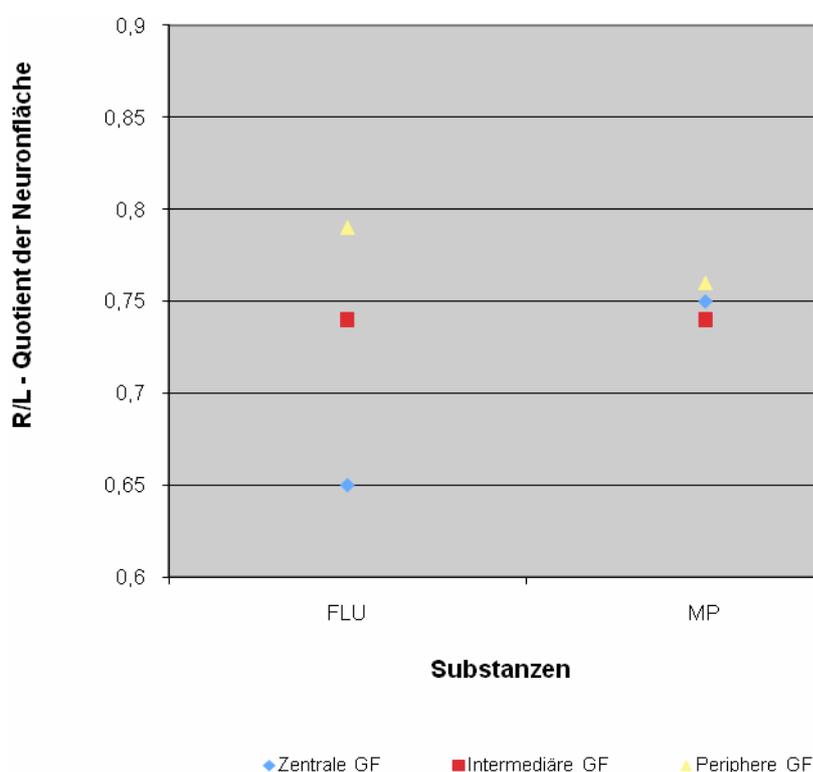
Tab. 19 Neuronfläche von Flunarizin (FLU) und Methylprednisolon (MP)

	FLU		R/L- Quotient	MP		R/L- Quotient
	Netzhaut Neuronfläche in $\mu\text{m}^2$			Netzhaut Neuronfläche in $\mu\text{m}^2$		
	rechts	links		rechts	links	
<b>Lage der GF</b>						
- zentral	55.8	85.6	0.65	67.5	90.1	0.75
- intermediär	62.4	84.7	0.74	66.5	89.5	0.74
- peripher	64.2	80.4	0.79	65.5	85.2	0.76
<b>Gesamt- Neuronfläche</b>	182.4	250.7	0.73	199.5	264.8	0.75

Tab. 20 Statistische Auswertung der Neuronfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) der traumatisierten rechten Netzhäute von Flunarizin (FLU) und Methylprednisolon (MP)

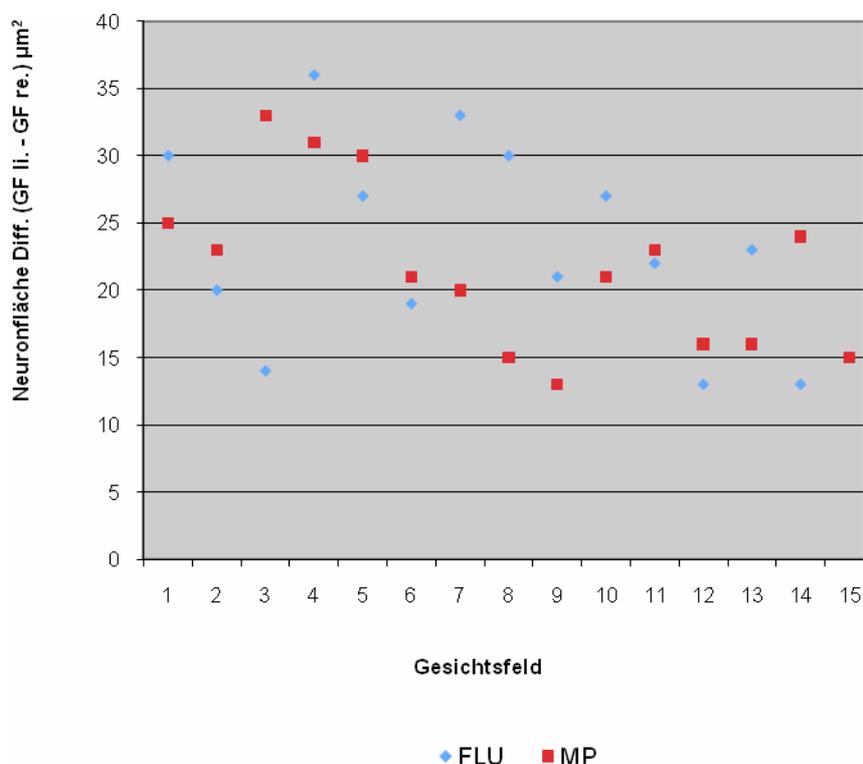
	Gesamtneuronfläche		GF-zentral		GF-intermediär		GF-peripher	
	FLU	MP	FLU	MP	FLU	MP	FLU	MP
<b>Xquer</b>	60.7	66.5	55.8	67.4	62.2	66.4	64.2	65.6
<b>s</b>	$\pm 6.1$	$\pm 2.7$	$\pm 4.0$	$\pm 2.3$	$\pm 5.5$	$\pm 3.1$	$\pm 6.1$	$\pm 3.0$
<b>Welch's t-Test</b>	$p < 0.004$		$p = 0.001$		$p = 0.19$		$p = 0.66$	

Die semiautomatische Auswertung weist eine signifikant niedrigere absolute Gesamtneuronfläche der rechten Netzhaut in der FLU-Gruppe auf ( $p=0.004$ ). Weiterhin findet man eine signifikant geringere absolute Neuronfläche der FLU-Gruppe im zentralen GF ( $p=0.001$ ). Im intermediären GF ( $p=0.19$ ) und peripheren GF ( $p=0.66$ ) sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die relative Gesamtneuronfläche der FLU-Gruppe (R/L-Quotient: 0.73) ist um 2% niedriger ausgefallen als in der MP-Gruppe (R/L-Quotient: 0.75), d.h. dass innerhalb der FLU-Gruppe zwischen dem rechten traumatisierten N. opticus und dem linken nicht-traumatisierten Sehnerven die Neuronfläche im Vergleich zur MP-Gruppe abgenommen hat.



**Abb. 25** Relative Neuronfläche nach Flunarizin- bzw. Methylprednisolon-Behandlung

Bei der graphischen Gegenüberstellung der relativen Neuronfläche (R/L-Quotienten) in *Abb. 25* stellt sich bei Untersuchung zentraler Gesichtsfelder eine um 10% höhere Neuronflächenreduzierung in der FLU- (R/L-Quotient: 0.65) als in der MP-Gruppe (R/L-Quotient: 0.75) dar. Im intermediären Gesichtsfeld findet sich in der MP- und FLU-Gruppe die gleiche relative Neuronfläche, sodass die Neuronflächenreduktion gleichermaßen auftritt (R/L-Quotient FLU: 0.74 / MP: 0.74). Im peripheren Gesichtsfeld dagegen wird die Neuronfläche in der MP-Gruppe um 3% (R/L-Quotient FLU: 0.79 / MP: 0.76) mehr reduziert als in der FLU-Gruppe.



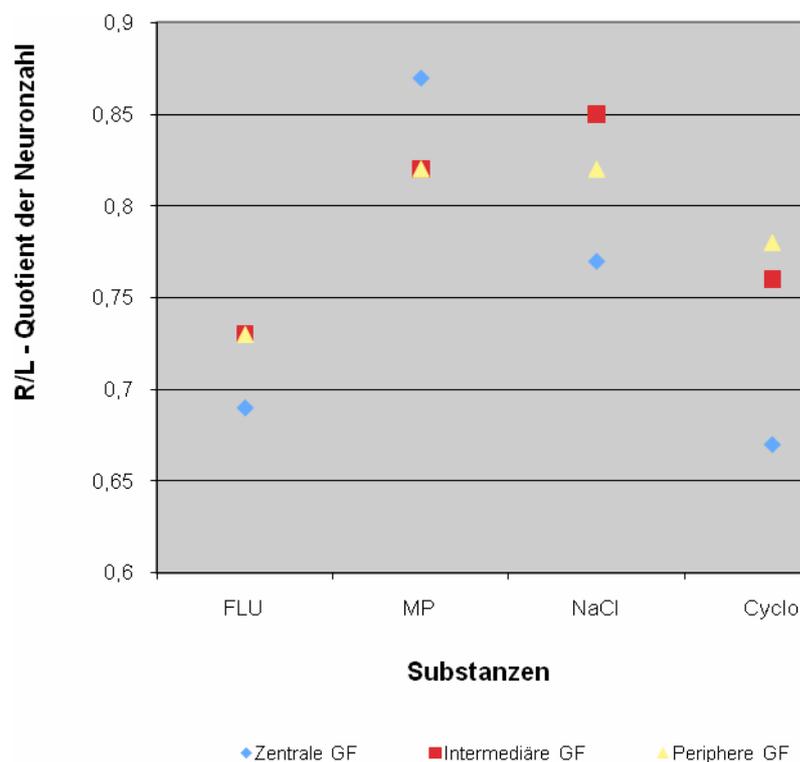
**Abb. 26** Differenz der Neuronfläche (GF li.-GF re.) der FLU- und MP-Gruppe

Die *Abb. 26* bringt eine Aufstellung der Neuronfläche vs. des Gesichtsfeldes an (siehe 3.1). Im Kurvenverlauf des zentralen Gesichtsfeldes der FLU-Gruppe (1;

4; 7; 10; 13) sind höhere Neuronflächendifferenzen im Gegensatz zur MP-Gruppe zu sehen. Diese Beobachtung deutet auf eine kleinere Neuronfläche in der FLU-Gruppe im zentralen GF nach Sehnervtrauma hin und wird durch R/L-Quotienten (FLU: 0.65 / MP: 0.75) gestützt. Das intermediäre Gesichtsfeld (2; 5; 11; 14) der MP-Gruppe veranschaulicht wie schon zuvor im zentralen GF höhere Neuronflächendifferenzen. Im Gesichtsfeld 8 herrscht eine umgekehrte Situation. Diese Tatsache trägt zur Annäherung der R/L-Quotienten (FLU: 0.74 / MP: 0.74) bei. Die FLU-Gruppe präsentiert überwiegend im peripheren Gesichtsfeld (3; 6; 12) niedrigere Neuronflächendifferenzen, hingegen höhere Werte im Gesichtsfeld 9. Dies spiegelt sich in den R/L-Quotienten FLU: 0.79 und MP: 0.76 wieder.

### 3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

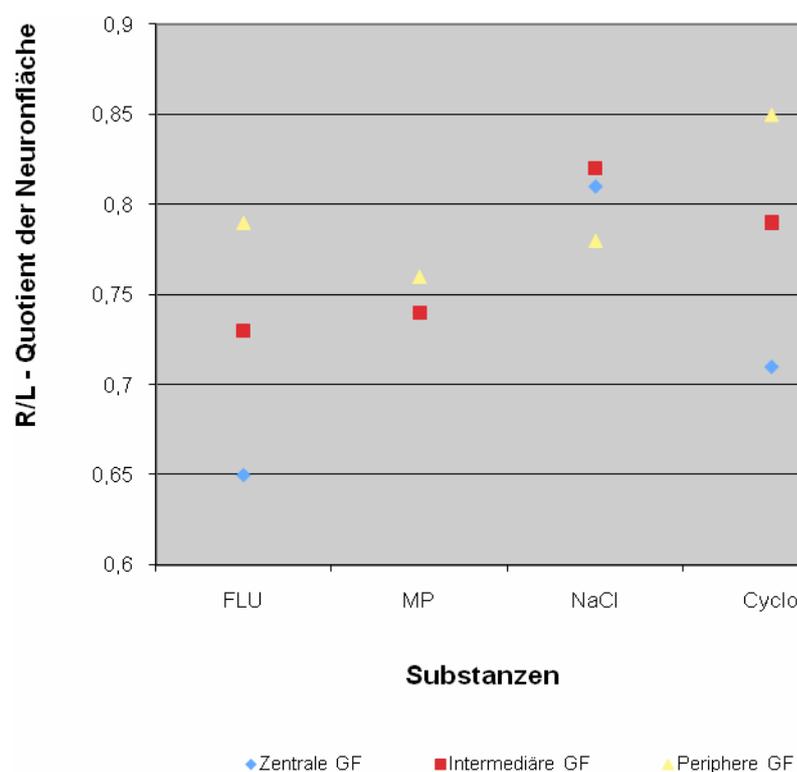
#### Relative Neuronzahl aller Substanzen



**Abb. 27 Zusammenfassung der Neuronzahl R/L-Quotienten aller Substanzen**

In *Abb. 27* bietet die Graphik eine Zusammenfassung aller Substanzen unter dem Aspekt der relativen Neuronzahlen, die als R/L-Quotienten der verschiedenen Gesichtsfelder in Abhängigkeit vom Abstand zur Papilla nervi optici hier dargestellt werden. In der MP-Gruppe haben wir die höchste relative Neuronzahl im zentralen GF festgestellt, gefolgt von der NaCl-Gruppe, dann FLU-Gruppe und schließlich Cyclodextrin-Gruppe. Im intermediären GF findet man die größte relative Neuronzahl in der NaCl-Gruppe, gefolgt von der MP-Gruppe, Cyclodextrin-Gruppe und FLU-Gruppe. Im peripheren Gesichtsfeld besteht kein Unterschied zwischen NaCl- und MP-Gruppe. Die Cyclodextrin-Gruppe schneidet besser ab als die FLU-Gruppe.

### Relative Neuronfläche aller Substanzen



**Abb. 28** Zusammenfassung der Neuronfläche R/L-Quotienten aller Substanzen

Die *Abb. 28* bietet eine Zusammenstellung aller Versuchsgruppen unter dem Aspekt der relativen Neuronfläche, die als R/L-Quotient hier in Abhängigkeit vom Abstand zur Papilla nervi optici dargestellt wird. Die Kurvenverläufe zeigen, dass die FLU-Gruppe im zentralen und intermediären Gesichtsfeld den niedrigsten R/L-Quotienten aufweist und somit auch die größte Reduktion der Neuronfläche zu verbuchen hat. Im peripheren Gesichtsfeld zeigt die Cyclodextrin-Gruppe einen R/L-Quotienten von 0.85 und infolgedessen die geringste Reduktion der Neuronfläche im peripheren Gesichtsfeld.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die Schwierigkeit der Etablierung einer Standardtherapie für die TON und ihre Diagnostik**

Mehrere Faktoren erschweren die Etablierung einer Standardtherapie der TON. Zum einen liegt der TON eine komplexe Diagnostik und Pathophysiologie zugrunde, zum anderen stehen grundsätzlich verschiedene Therapieansätze zur Verfügung, wohingegen die Differentialindikation und -kontraindikation noch umstritten sind. Des Weiteren ist die traumatische Optikusneuropathie ein seltenes und häufig übersehenes Krankheitsbild, für welches es bisher keinen Modellansatz gab, der eine Therapiebewertung zuließ. Beim wachen, ansprechbaren und kooperativen Patienten lässt sich auf einfachstem Wege eine Ausschlussdiagnostik für eine TON mittels Prüfung des afferenten Systems durch den Swinging flash light-Test und einer orientierenden Visuskontrolle durchführen (Frenkel und Spoor 1988, Joseph et al 1990, Seiff 1992). Neben der Beurteilung der direkten und indirekten Lichtreaktion in Form des Swinging flash light-Test sollte zudem eine Dokumentation des Pupillendurchmessers und der Pupillenform stattfinden (Gellrich 1999).

Jedoch tritt die TON gehäuft in Kombination mit komplexen Verletzungen des Gesichts- und Hirnschädels auf, die eine Bewusstlosigkeit und folglich einen Mangel an Compliance bedingen (Seiff 1984, Gellrich 1997). Abhängig vom Grad des Bewusstseins und der Verletzungsart bei Notfallpatienten lässt sich nicht immer eine vollständige körperliche Anamnese erstellen (Gellrich 1999). Aufgrund eventueller Applikation von Morphinderivaten und Schwellung der Periorbitalregion scheidet die einfache Funktionsdiagnostik aus und eine bildgebende Diagnostik der Orbita und des Canalis nervi optici mittels Dünnschicht-CT-Untersuchung, sowie die elektrophysiologische Untersuchung mittels visuell evozierter Potentiale ist erforderlich. Diese sollte innerhalb weniger Stunden nach dem erfolgten Trauma durchgeführt werden (Goldberg 1992, Gellrich 1995).

## 4.2 Das Tiermodell

### 4.2.1 Die Läsionsapparatur

Da der N. opticus eine gut zugängliche Struktur des zentralen Nervensystems darstellt, bietet er eine günstige Voraussetzung zur Erforschung degenerativer und regenerativer Prozesse (Sievers et al. 1984). Der meist genutzte Ansatz zur Erzeugung der Läsion am visuellen System stellt die Axotomie des N. opticus dar, die in der Wallerschen Degeneration der Axone mündet (Thanos und Thiel 1991). Hierbei handelt es sich um eine Extremläsion, die weit entfernt von der klinischen Realität liegt. Zur Erforschung der Pathomechanismen der traumatischen Optikusneuropathie ist dieses Modell ungeeignet. Um die Erforschung grundsätzlicher Phänomene der Neurodegeneration und -regeneration des ZNS weiter voranzutreiben, entwickelten Forscher weitere Modellansätze, die unter anderem durch Erzeugung einer Axonotmesis am N. opticus die Neurodegeneration und -regeneration untersuchen sollten. Dieser Ansatz liegt der klinischen Realität am nächsten.

Der hierfür häufigste angewandte Modellansatz sah ein Kompressionstrauma am Sehnerven vor. Um ein Kompressionstrauma am Sehnerven zu setzen, wurden unter anderem eine Pinzette oder eine Unterbindung des Sehnerven durch Seidenfäden verwendet. Alle genannten Modellansätze wurden zur Erforschung der Neurodegeneration und -regeneration entwickelt, aber ihre Eignung zur Erforschung der Therapie der TON muss in Frage gestellt werden. Keines dieser Modelle erfüllt die Kriterien der Reproduzierbarkeit, exakten Quantifizierbarkeit, einfachen Durchführbarkeit, Übersichtlichkeit des Operationssitus und die Vergleichbarkeit mit der klinischen Situation. Von klinischer Bedeutung ist das Modell der Querschnittsverengung des Sehnerven, wie sie beispielsweise im Sehnervkanal durch Schädelbasis- und Mittelgesichtsfrakturen auftreten kann (Matsuzaki 1982, Allcutt et al. 1984, Duvdevani 1990).

Retrobulbäre Raumforderungen durch traumatisch bedingte Hämatome und Tumor im Bereich des Canalis nervi optici können ebenso in Frage kommen (Gellrich 1996). Die Forschung am extrakraniellen visuellen System erfuhr eine Weiterentwicklung durch das von *Gellrich* entworfene Tiermodell, mit welchem die kalibrierte Sehnervschädigung durch standardisierte, beliebig reproduzierbare, sowie zeitlich steuerbare Querschnittsverengung des Sehnerven (Sehnervcrush) experimentell untersucht werden konnte. Das Sehnervtrauma wurde hier mikromanipulatorisch durch einen beweglichen Kraftmesser (Federwaage) hervorgerufen, dessen Messarm über einen supraorbitalen Zugang von temporal an den N. opticus herangeführt wurde. Der N. opticus wurde nun gegen ein Widerlager gedrückt, das an der nasalen Seite des N. opticus durch einen Mikrohaken geschaffen wird. Anhand dieses Tiermodells ließ sich die Abnahme der Neuronenpopulation der retinalen Ganglienzellschicht, welche linear von Läsionskraft und Läsionszeit abhängig war, nachweisen (Gellrich 1995).

Das für diese Arbeit angewandte Tiermodell wurde in einigen Aspekten von *Zerfowski* modifiziert, vereinfacht und weiterentwickelt. Durch das leicht handhabbare mikromanipulatorisch führbare Stempelverfahren, das die Federwaagenkonstruktion ersetzte, konnte das Sehnervtrauma durch eine beschleunigte und übersichtliche Versuchsanordnung ausgeführt werden. Somit ist die Versuchsanordnung mit weniger Fehlern behaftet. Der Nachweis des linearen Zusammenhangs der einwirkenden Läsionskraft und der nach 30 Tagen histomorphometrisch nachweisbaren verminderten Neuronenzahl und Neuronengröße in der RGC (retinalen Ganglienzellschicht) kann auch mit diesem modifizierten Modellansatz von *Zerfowski* erbracht werden. Hier gelang der tierexperimentelle Nachweis der neuroprotektiven Wirkung des hochdosierten Methylprednisolons am extrakraniellen visuellen System (Zerfowski 1999).

Dieses von *Zerfowski* modifizierte Modell der traumatischen Sehnervschädigung bietet im Vergleich zu anderen veröffentlichten tierexperimentellen Ansätzen diverse Vorteile. Dank des modifizierten Versuchsaufbaus gestaltet sich die Versuchsdurchführung unter konstanten Bedingungen übersichtlich und schnell. Einerseits wird dies durch die Fixierung des Rattenschädels in der stereotaktischen Vorrichtung und die Durchführung der operativen Schritte unter dem Mikroskop gesichert, andererseits kann der Stempel samt der Basisplatte mit vergrößerter Präzision an den Ort der Läsion gebracht und wieder weggeführt werden, ohne dass sich eine ungewollte zusätzliche Traumatisierung ereignet. Im Gegensatz hierzu stehen die Versuchsansätze von *Stevenson* und *Duvdevani*, wo die Läsion an einem nicht fixierten Tier mit Hilfe einer Pinzette durchgeführt wurde (*Stevenson* 1987, *Duvdevani* 1990).

Ein weiterer Aspekt in diesem Versuchsaufbau ist die Variabilität von quantifizierbarer und jederzeit reproduzierbarer Läsionsstärke und -länge. Eine definierte Masse in Form eines Stempels von 5, 10, 15 oder 20 g kann über einen gewünschten Zeitraum von Sekunden bis Minuten auf den Sehnerven wirken. Nur eine bedingt definierbare und kontrollierbare Optikusschädigung wird durch die schon erwähnten Modellansätze des Kompressionstraumas durch eine Pinzette von *Stevenson* und *Duvdevani*, oder durch die Seidenfadenligatur von *Matsuzaki* erzielt (*Matsuzaki* 1982, *Stevenson* 1987, *Duvdevani* 1990).

Zusätzlich muss darauf geachtet werden, welches der genannten Modelle die klinische Traumasituation am besten simuliert. Der Modellansatz der Querschnittsverengung durch das Stempelprinzip ist mit der Sehnervkompression im *Canalis nervi optici*, beispielsweise durch dislozierten Knochenfragmenten nach einem Trauma vergleichbar. Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass *Gellrich* und *Zerfowski* ein Tiermodell etabliert haben, welches die Auswertung verschiedenartiger Therapieansätze der traumatischen Sehnervschädigung durch standardisierte, jederzeit reproduzierbare und quantifizierbare Sehnervschädigung erlaubt.

---

Für diese Arbeit wurde an 40 Ratten ein einheitliches stumpfes Trauma von 6 Minuten mit 5 Gramm durchgeführt. Die Perfusion der Tiere erfolgte, wie in der Literatur bereits diskutiert, nach 30 Tagen.

#### 4.2.1.1 Zeitpunkt der Perfusion

Ein bedeutender Aspekt des tierexperimentellen Versuchsaufbaus zur TON ist der Perfusionszeitpunkt. Der retinale Ganglienzelluntergang als grundsätzliches Phänomen der Axotomie des Sehnerven ist allgemein bekannt (James 1933), jedoch werden in neueren Studien zwei unterschiedliche Phasen des Zelluntergangs differenziert (Villegas-Pèrez und Vidal-Sanz 1993). Die Arbeit von *Villegas-Pèrez* und *Vidal-Sanz* zeigte einen initialen abrupten Verlust von RGC (retinalen Ganglienzellen), der sich ab dem fünften Tag und weiterhin innerhalb der ersten zwei Wochen nach dem Sehnervcrush ereignete. Der zweite Schub des retinalen Ganglienzelluntergangs konnte bis sechs Monate nach dem Trauma beobachtet werden (Villegas-Pèrez und Vidal-Sanz 1993, Peinando-Ramòn 1996).

Durch *Joo* wurden mögliche Mechanismen des neuronalen Zelluntergangs beschrieben. Nach einem 4 Stunden Zeitintervall von der Schädigung kommt es zur Zellnekrose. Diese ist durch Anschwellen der Zellkörper und der Mitochondrien, die Zerstörung der Zellmembran, und eine ungleiche Verteilung des Zellchromatins gekennzeichnet. Der erste Tag nach der Schädigung leitet die zweite Phase der Nekrose ein. Kennzeichnend dafür ist die apoptotische Umstrukturierung der Zellen, wie beispielsweise die Zellkörperschrumpfung, die Verdichtung des Kernchromatins und der Expression von p53 (Joo 1999).

Das verzögerte Auftreten der Neuronendegeneration lässt sich mit dem programmierten Zelltod, der Apoptose, erklären. Diese gewann in den letzten Jahren im Rahmen verzögerter neuronaler Zelluntergänge nach Ischämie und akutem Trauma an Bedeutung zu. Diese Tatsache lässt sich nach einer

retinalen Ischämie besonders gut beobachten. Eine entzündliche Begleitreaktion tritt bei dieser Form des Zelluntergangs im Gegensatz zur Nekrose nicht auf. Charakteristisch für die Apoptose ist der Zerfall der Zellen in membranumschlossene Körperchen, den sogenannten apoptotic bodies, deren Beseitigung durch Phagozytose gesichert wird. Die Apoptose stellt eine Sonderform des Zelluntergangs mit Initiierung eines energieverbrauchenden „Todesprogramms“ ohne entzündliche Begleitreaktion dar. Im Gegensatz dazu steht die Nekrose, welche gekennzeichnet ist durch das Versagen metabolischer Vorgänge mit Verlust der Membranintegrität der zugrunde gehenden Zellen (Padosch und Vogel 2001).

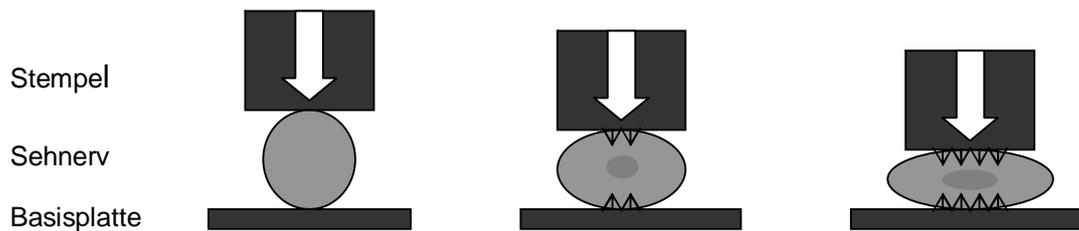
**Tab. 21 Unterschiedliche Merkmale der Apoptose und Nekrose (Padosch u. Vogel 2001)**

<b>Apoptose</b>	<b>Nekrose</b>
Physiologisch oder pathophysiologisch	Pathophysiologisch
Genetisch determiniert	Nicht genetisch determiniert
Energieabhängig	Energieunabhängig
Proteinbiosynthese nötig	Verminderte Proteinsynthese
Zeitlich verzögerte aktive Degeneration	Unmittelbar eintretende passive Atrophie
Zellschrumpfung	Zellschwellung
Chromatinkondensation	Zerfall nukleärer Chromatinstrukturen
Keine entzündliche Begleitreaktion	Entzündliche Begleitreaktion

Aufgrund der Stabilisierung der lichtmikroskopisch erfassbaren neuronalen Degeneration nach 30 Tagen, wurden die Retinae entsprechend den Forschungsergebnissen von *Gellrich* und *Zerfowski* entnommen und untersucht (Gellrich 1995, Zerfowski 1999).

#### **4.2.1.2 Wird die Netzhaut gleichmäßig geschädigt?**

Der Modellansatz zur Sehnervenkompression mittels Stempelverfahren liefert eine inhomogene Schädigung der retinalen Ganglienzellschicht der Retina. Die Zelldichte der RGC ist zentral höher als peripher. Dieses Phänomen ist bei Retinae sowohl nach einem Sehnervcrush, als auch bei nicht traumatisierten Tieren zu erkennen. Die zentralen Teile der Retina erfahren durch das Kompressionstrauma des N. opticus eine höher gradige Schädigung, wie sich bei der Auswertung der relativen Neuronenzahlen der geschädigten Netzhäute demonstrieren lässt. Durch die anfängliche Kraftaufnahme am Sehnerv wird zunächst nur ein zentraler Bereich von oben wie bzw. von unten mittels Widerlager gleichermaßen mit der Kraft beladen. Das hat die elastische Verformung des Sehnerven zur Folge, wodurch nun nicht nur das Zentrum, sondern auch periphere Bereiche mit dem Stempel bzw. der Basisplatte, die als Widerlager fungiert, in Berührung kommen und die Kraftanteile aufnehmen. Diese werden im Zentrum aufaddiert und folglich herrscht eine größere Gesamtkraftaufnahme im Zentrum des N. opticus.



**Abb. 29** Erklärungsmodell für die stärkere Schädigung zentraler Sehnerv- bzw. Netzhautanteile durch Kompression

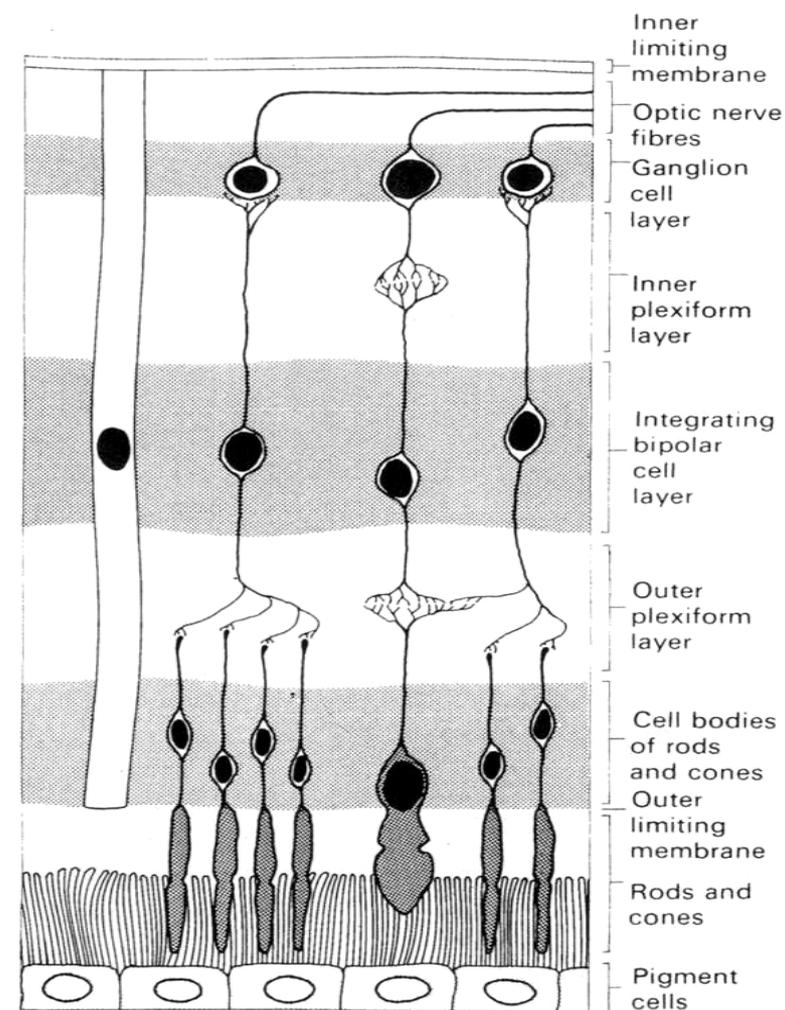
#### 4.2.2 Histomorphometrische Auswertung

Eine histomorphometrische Analyse der Zelldegeneration kann prinzipiell durch eine Quantifizierung der nach zentral projizierten Axone im N. opticus oder durch eine Auswertung der Zellveränderungen in der RGL erfolgen (Sievers 1989). Die histomorphometrische Bewertung der Ganglienzellen der RGL besitzt gegenüber der Axonquantifizierung zwei erhebliche Vorteile. Der Durchmesser eines Zellkörpers ist im Vergleich zum Axon größer. Folglich lassen sich degenerative oder regenerative Veränderungen am Zellkörper der Ganglienzelle einfacher erfassen. Ferner befinden sich alle Somata der Ganglienzellen in einer Schicht auf der Retina (Gellrich 2002). Aufgrund des Multifokusmoduls des Auswertungsmikroskops werden die retinalen Ganglienzellen des whole-mount in ihrer größten Ausdehnung einstellbar. Somit wird eine zuverlässige Auswertung, besonders in Zusammenhang mit der Zellgröße, ermöglicht.

### 4.2.3 Histomorphometrische Evaluation

Die Bildbearbeitungs- und Analysesoftware QWin der Firma Leica wurde zur Zählung der Zellen der RGL eingesetzt. Die Auswertung von whole-mounts stellt anspruchsvolle Anforderungen an das Softwareprogramm.

Der histologische Aufbau der Netzhaut setzt sich aus 10 Schichten zusammen (siehe Abb. 19).



(a)

**Abb. 30** Schematische Darstellung der Retinaschichten

Die Perikaryen der Ganglienzellen, die sich fast in einer Ebene befinden, bilden das Stratum ganglionare nervi optici (RGL). Der Querschnitt jeder einzelnen Zelle ist in dieser Schicht der Netzhaut durch die Fokussierung scharf im Äquator einzustellen und folglich die Differenzierung der Zellen nach Größe zuverlässig möglich. Hier ist ein Vorteil der Auswertung am whole-mount im Vergleich zum Axonquerschnitt zu erkennen. Im Gegensatz hierzu ist die lichtmikroskopische Beurteilung der retinalen Ganglienzellschicht durch die Dicke der Ganzhäutchenpräparate (whole-mount) und die Darstellung der von unten und oben angrenzenden Netzhautschichten erschwert. Auf einer radiären Achse von der Papilla nervi optici zur Pars plana werden die Gesichtsfelder (GF) im Abstand von 1,2 mm, 2,4 mm und 3,6 mm von der Papille automatisch bei 10facher Vergrößerung zu Beginn der morphometrischen Analyse angefahren. Die Aufnahme der Gesichtsfelder erfolgt in 40facher Vergrößerung.

Das GF-Bild kann durch Artefakte, Risse, Schärfeschwankungen innerhalb des GFs durch Wellung des whole-mount, oder Gefäßverläufe in seiner Beurteilbarkeit eingeschränkt sein. Unter solchen Bedingungen kann mittels manuell-systematischer Verschiebung eines oder zwei GF nach links und nach oben ein verwertbares Bild bei minimaler Fehlerquote erstellt werden. Bei leicht gewellten Netzhäuten, d.h. wenn die retinalen Ganglienzellen nicht in einer Ebene liegen, ermöglicht der Einsatz des Multifokus-Moduls der Leica IM1000-Software die Erstellung hochwertiger Bilder durch Auswertung von 2-3 Einzelbildern.

Ein weiterer Vorteil der Bildbearbeitungssoftware ist das automatische Markieren und Erkennen der retinalen Ganglienzellen durch das Programm. Es werden alle Zellen, bis auf die Gefäßendothelzellen, farblich dargestellt. Die Gefäßendothelzellen fallen aufgrund ihrer Proportionen schon von vorne herein durch das Detektionsraster durch. Mit Hilfe der Binärbild - und Wasserscheidenfunktion, wie schon im Methodikteil beschrieben, werden die Ganglienzellen von den anderen unterschieden, Zellgrenzen aufgezeigt und sich berührende Zellen durch Trennungslinien voneinander getrennt. Die Markierung der einzelnen

Zellen wird durch sich überlappende Zellen, Artefakte und Zellprojektionen aus anderen Zellschichten erschwert. Durch einen höher gewählten Vergrößerungsfaktor von 1,6fach zwischen Objektiv und Okular verkürzt sich die Bearbeitungszeit von 4-6 Stunden bei nicht geschädigter Netzhaut auf 2-3 Stunden für beide Netzhäute einer Ratte. Dennoch kann es auch durch den erhöhten Vergrößerungsfaktor bei manueller Nachbearbeitung zu Fehlern durch Auflösen und Einfügen von Zellgrenzen, oder durch Markieren bzw. Entfernen von Zellen kommen.

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass sich die hier diskutierte und praktizierte Tierversuchsanordnung in Hinsicht auf den Einsatz zum Wirksamkeitsnachweis von Methylprednisolon und Flunarizin bei Behandlung der TON verlässlich ist. Die vorgestellte Bildbearbeitungs- und Bildanalysesoftware kann prinzipiell für die Auswertung der RGL kresylviolettgefärbter Ganzhäutchenpräparate benutzt werden.

#### **4.2.3.1 Die objektive Prüfung der Sehfunktion**

Das Ziel einer jeden Behandlung der TON ist die Wiederherstellung oder Besserung des Sehvermögens. Somit kann nur eine objektive Prüfung der Sehfunktion eine ideale Prüfgröße für die Therapietestung der TON und nicht die histomorphologische Analyse der Anzahl der retinalen Ganglienzellen (RGC) sein. Die Prüfung der direkten und indirekten Lichtreaktion beider Augen dient deshalb als einfach durchführbarer Funktionstest. Für die Bewertung der Funktion des visuellen Systems bis zum Corpus geniculatum laterale (CGL) kann die Pupillenweite in Zusammenhang mit dem Lichteinfall verwendet werden (Reim 1985). Jedoch stellt die Lichtreaktionsprüfung keine Prüfmethode für das gesamte visuelle System dar, da die Afferenzen ab dem CGL anders verschaltet werden, als die Afferenzen des visuellen Signals zum visuellen Cortex. Das Prätectum wird über eine tectobulbäre Bahn mit den okulomotorischen Kernen, insbesondere mit der parasymphatischen Portion

des Erdinger-Westphal-Kerns, verbunden. Von hier gelangt die Efferenz über den N. oculomotorius bis in die Orbita, wo es zum Ganglion ciliare zieht und in den Ziliarnerven zwischen der Sklera und Choroidea des Bulbus zum M. sphincter pupillae reicht (Reim 1985).

#### **4.2.3.2 Die Beurteilung der Ganzhäutchenpräparat-Färbung mit CV (Kresylviolett)**

Grundsätzlich wäre eine spezifische Färbetechnik der retinalen Ganglienzellen erstrebenswert, da die Auswirkung des Traumas sich am N. opticus in Form einer Wallerschen Degeneration von Axonen zeigt und zu einem Zelluntergang führt (Thanos und Thiel 1991). In der Literatur werden zur Markierung der retinalen Ganglienzellen häufig mehr oder weniger spezifische Färbemethoden wie beispielsweise die anterograde oder retrograde Markierung der RGC mit Meerrettichperoxidase (Carmignoto 1989) oder die Kennzeichnung mit dem Vitalfarbstoff Dil (Thanos und Thiel 1991) und die post mortem durchführbare Färbung mit Kresylviolett aufgelistet (Gellrich MM 1996).

Kresylviolett findet oft zur Färbung von whole-mount-Netzhäuten und der damit verbundenen Identifizierung von Neuronen, Gliazellen und Kapillaren im selben Präparat Verwendung (Gellrich MM 1996). Bei den hier aufgezählten Färbemethoden werden durchaus nicht nur neuronale Zellen der Retina markiert (Gerfen 1982). Der Carbocyaninfarbstoff Dil, der nur eine relative Spezifität besitzt, führt zu einer kräftigen fluoreszierenden Kennzeichnung der Somata, Axone und Dendritenbäume der RGC (Thanos 1988). Das ungewollte Anfärben nicht neuronaler Zellen durch austretendes Dil kann hier ebenfalls vorkommen (Gerfen 1982). Außerdem muss die Markierung einige Tage vor dem experimentellen Trauma geschehen und ist somit mit einem erheblich größeren Aufwand verbunden. Durch Kresylviolett werden Ribonukleoproteine gefärbt. Die Nisslkörperchen, bei denen es sich um chromatophile Schollen im Zytoplasma handelt, die Kernmembranen und Nukleolen der Neuronen werden

violett bis blau gefärbt, wohingegen das Zytoplasma blass-lila in Erscheinung tritt. Die Nisslkörperchen weisen einen hohen Gehalt an Ribonukleinsäure (RNA) auf. Kennzeichnend ist fehlendes Auftreten beim toxischen und mechanischen Trauma. Durch Kresylviolett ist eine dauerhafte und optimale Anfärbung gewährleistet. Dennoch ist bei der Auswertung zu berücksichtigen, dass Kresylviolett alle Zellen der retinalen Ganglienzellschicht (RGL) anfärbt. Die RGL besteht aus Ganglienzellen, die ihre Axone in den Sehnerven projizieren, sowie aus amakrinen Zellen, Glia- und Gefäßendothelzellen (Perry 1981). Dennoch ist sicherlich die Art der Färbung der Netzhäute nicht ausschlaggebend für die ausgewerteten Ergebnisse dieser Arbeit.

Die Differenzierung der nicht neuronalen Gliazellen und der Endothelzellen von den neuronalen Zellen ist nach den Kriterien von Perry gut durchzuführen. Die Unterscheidung der amakrinen Zellen von den Ganglienzellen gestaltet sich schwieriger. Das im N. opticus verlaufende Axon ist bei der Differenzierung das bedeutendste Kriterium. Sowohl die dendritische Morphologie als auch das Axon bleiben unter der Kresylviolettfärbung unsichtbar, und somit ist nur eine indirekte Bewertung möglich. Die retinale Ganglienzellschicht setzt sich zu je der Hälfte aus Ganglienzellen und amakrinen Zellen zusammen. Daneben zählen die Zellen mit einer Fläche von  $\geq 80 \mu\text{m}^2$  zu den Ganglienzellen (Perry 1981). Die Bestimmung der Zellgröße ist dank der Fokussierung mittels Multifokusmodul vergleichsweise zuverlässig. In Hinsicht auf die Zellgrößen muss die Fixierung der Retinapräparate mit Formalin und die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe berücksichtigt werden, da diese zwei aufeinanderfolgenden Schritte eine Zellschrumpfung nach sich ziehen

### **4.3 Gegenwärtiger Stand und neue Behandlungsansätze der traumatischen Optikusneuropathie**

Bisher ist eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Behandlung der TON veröffentlicht worden. Es gibt chirurgische und konservativ-medikamentöse Methoden. Außerdem gibt es einige Autoren, die als dritte Variante, die wait and see-Taktik vorschlagen (Miller 1990). Für die medikamentöse Behandlung wurde nicht nur die Steroidgabe in sehr unterschiedlichen Dosierungen, sondern auch Mannitol als osmotisch wirksame Substanz zur Hirnödemtherapie in Betracht gezogen (Walsh 1966). Trotz der geringen Inzidenz der TON befassen sich verschiedene Fachdisziplinen mit dieser Thematik, was sich aufgrund der anatomischen Nähe des Sehnerven zu den umgebenden Strukturen wie der Orbita, dem Sinus cavernosus und dem Gehirn erklären lässt. Die Verletzung des Sehnerven und seiner in der Nähe befindlichen topographischen Strukturen zieht das Interesse der Ophthalmologen, der Otorhinolaryngologen, der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen und der Neurochirurgen auf sich und bedarf eine interdisziplinäre Kooperation. Häufig sind es komatöse und/oder medikamentös eingestellte, zum Teil sogar polytraumatisierte Patienten, bei denen die klinische Beurteilung der Schwere des Sehnervtraumas nahezu unmöglich ist. Obwohl viele Fachdisziplinen Interesse an diesem Erkrankungsbild zeigen, bleiben die pathophysiologischen Mechanismen weitgehend ungeklärt und klare Richtlinien für die Behandlung fehlen (Berestka und Rizzo 1994, Pomeranz 1999).

#### **4.3.1 Die chirurgische Therapie der TON**

Das Hauptanliegen der operativen Intervention ist die mechanische Entlastung des N. opticus im knöchernen Canalis nervi optici (Sehnervkanal). Die Kompression kann durch ein disloziertes Knochenfragment, ein Hämatom oder Ödem des N. opticus, seiner Hüllen oder seiner Umgebung verursacht sein (Gellrich 1999). Kontrovers diskutiert wird der operative Zugang zur

chirurgischen Dekompression. Die erste Sehnervdekompression wurde auf dem transkraniellen Zugangsweg durch *Pringle* 1916 erreicht. *Sewall* gelang 1926 die Dekompression über den transethmoidalen Zugang. Dieser wurde erneut aufgegriffen von *Niho* 1960. In Europa und den USA wurden bis in die 80er Jahre 150 Einzelfälle veröffentlicht, wohingegen in Japan innerhalb von 20 Jahren an einer Institution über 700 Dekompressionen beschrieben wurden (*Pringle* 1922, *Sewall* 1926, *Niho* 1970). Hier wurde visuelle Besserung von 80-100% durch chirurgische Dekompression beschrieben, sogar wenn diese erst Monate nach dem eigentlichen Trauma stattfand. Jedoch lassen die unzufriedene Dokumentation und das Fehlen bestimmter Auswahlkriterien diese Veröffentlichungen fragwürdig erscheinen. Gleichwohl hat die Durchführung dieser 700 Dekompressionen zur Entwicklung des transethmoidalen Zuganges geführt (*Steinsapir* 1994). Die International Optic Nerve Trauma Study (IONTS) wies bei 32% der operierten Patienten eine Verbesserung der Sehfunktion nach (*Levin* 1999). Dieses Ergebnis ist mit der retrospektiv angelegten Studie von *Wohlrab*, bei der 40% der operierten Patienten einen Benefit von der chirurgischen Dekompression erfuhren d.h. eine Visusverbesserung, zu vergleichen (*Wohlrab* 2002).

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass bis zum heutigen Tag keine klare Aussage über die Stellung der chirurgischen Therapie der traumatischen Optikusneuropathie gemacht werden kann. Es liegen nur vage Empfehlungen vor.

### 4.3.2 Die konservativ-medikamentöse Therapie der TON

#### Methylprednisolon

Die häufigste Empfehlung unter der medikamentösen Behandlung der TON stellt die hochdosierte Gabe von Methylprednisolon dar. Gleichwohl kann dies nicht als eine Standardtherapie betrachtet werden, da die Behandlung bezüglich ihrer Wirkung bei der TON niemals in kontrollierten und prospektiven Studien überprüft wurde (Steinsapir und Goldberg 1994, Rabchevsky 2002). Die Therapie mit hochdosiertem Methylprednisolon basiert auf den Behandlungserfolgen des Therapiemodells beim spinalen Trauma (Hall 1982). Insbesondere die NASCIS II (Second **N**ational **A**cute **S**pinal **C**ord **I**njury **S**tudy) trieb die Forschung in der Neurotraumatologie an. Die Grundlage für diese große Studie war die First **N**ational **A**cute **S**pinal **C**ord **I**njury **S**tudy (NASCIS I), bei welcher eine Standarddosis Methylprednisolon (100 mg i.v. Bolus pro Tag) mit einer Höchstdosis Methylprednisolon (1000 mg i.v. Bolus pro Tag) verglichen wurde, wobei für die höhere Dosis keine positive Wirkung nachgewiesen werden konnte. Eine Placebo-Gruppe fehlte in der NASCIS I. Es folgte daraufhin die NASCIS II, die randomisiert, multizentrisch und doppelblind durchgeführt wurde. In dieser wurden 3 Gruppen miteinander verglichen (Bracken 1990):

- initiale Gabe von 30 mg/kg MP (Methylprednisolon) als Bolus, nachfolgend 5,4 mg/kg/h über 23 Stunden als Dauerinfusion
- Naloxongabe
- Placebo-Gabe

Bei frühzeitigem Beginn, nicht später als 8 Stunden nach dem Trauma, waren neurologische Funktionsverbesserungen bei den Querschnittsgelähmten in der MP-Gruppe zu verzeichnen (Bracken 1990). Die NASCIS III zeigte bei Therapiebeginn innerhalb der ersten 3 Stunden nach dem spinalen Trauma, dass die MP-Gabe noch weitere 24 Stunden erfolgen sollte, um einen Benefit

aus der Behandlung zu erzielen. Liegt die erste Gabe des MPs zwischen der dritten und achten Stunde posttraumatisch, sollte die Behandlung über 48 Stunden kontinuierlich gegeben werden. Auf die Ergebnisse der NASCIS II aufbauend erfolgte die Übertragung auf die Behandlung der traumatischen Optikusneuropathie. Laut *Gellrich* wird bei Verdacht auf ein Sehnervtrauma sofort die Therapie mit einer initialen Dosis von 30 mg Urbason<sup>®</sup>/kg KG i.v. und 5,4 mg/kg KG über die nachfolgenden 47 Stunden eingeleitet (*Gellrich* 1999). Der frühe Therapiebeginn nicht später als 8 h sollte befolgt werden. Trotzdem scheint es keine Korrelation zwischen den positiven Ergebnissen der NASCIS-Studien und den Ergebnissen bei der Behandlung der TON zu geben. Durch die Studie von *Zerfowski* wurde erstmals ein neuroprotektiver Wirksamkeitsnachweis des Methylprednisolons (285 mg/kg/48h i.v.) bei der Behandlung der TON tierexperimentell nachgewiesen (*Zerfowski* 1999).

*Steinsapir* und *Goldbergs* Veröffentlichung aus dem Jahre 2000 zeigt sogar eine tendenziell schädigende Wirkung des MPs auf und weist daraufhin, dass MP auch eine negative Wirkung bezüglich des visuellen Systems besitzen kann. Die klinische Rechtfertigung für die Gabe von MP basiert immer noch auf den Ergebnissen bei spinalem Trauma. Durch den verschiedenartigen anatomischen Aufbau dieser beiden Strukturen könnte die unterschiedliche Wirkung des MP erklärt werden. In ihrem Artikel aus dem Jahre 2002 verschärfen *Steinsapir* und *Goldberg* (*Steinsapir* und *Goldberg* 2002) ihre Kritik und schreiben dem Methylprednisolon eine toxische Wirkung zu. Des Weiteren halten sie es sowohl medizinisch, als auch ethisch vertretbar die Therapie mit MP dem Patienten vorzuenthalten...“finally, it is no longer acceptable to argue that withholding corticosteroid treatment in future clinical studies of traumatic optic neuropathy is unethical“ (*Steinsapir* und *Goldberg* 2002).

*Diem* und *Hobom* zeigten, dass MP den neuronalen Zelluntergang durch Inhibition eines endogenen neuroprotektiven Reaktionsweges aktiviert. Diese durch MP induzierte gesteigerte Apoptoserate der retinalen Ganglienzellen ist mediiert durch einen nicht-genomischen Mechanismus, da MP unabhängig von

dem zytosolischen Glukokortikoidrezeptor, der in diesem Experiment mittels RU 486, einem kompetitiven Antagonisten, geblockt wurde, seine Wirkung entfaltet (Diem und Hobom 2003). Weitere unerwünschte apoptotische Zelluntergänge wurden auch für Chondrozyten und Epithelzellen beschrieben. Diese, durch Glukokortikoide initiierten Apoptosevorgänge, sind mit der Verdrängung des Cytochrom c, der Aktivierung der Caspase 9 und der Expression des Phosphatidylserins auf der äußeren Zellmembran assoziiert (Nakazawa 2002, Dorscheid 2001). Ferner verhindert MP die axonale Aussprossung und interferiert mit der neuronalen Regeneration durch Hemmung der Immunzellaktivierung und Antigenprozessierung durch Makrophagen nach der akuten Phase des spinalen Traumas (SCI). Die Bildung von brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und neurotrophin-3 (NT3), welche nach einem SCI ausgeschüttet wird, unterbunden. Die Kombination von MP und BDNF führt zu einem verstärkten Axonüberleben, wobei das BDNF die Wirkung von MP im Rückenmark, wie beispielsweise die antiinflammatorische Wirkung, nicht beeinträchtigt (Kim 2004).

Außerdem steigert paradoxerweise eine erhöhte Bolusdosis MP die Lipidperoxidation und die Gewebsschädigung im experimentell durchgeführten Katzenmodell (Rabchevsky 2002, Young 1993b). In diesem Katzenmodell wurde das Trauma am Rückenmark von 12 Tieren mit einem Gewicht von 20 g, das in einem Teflonrohr aus einer Höhe von 20 cm auf das Rückenmarkssegment Th 8 fiel, provoziert. Als Kontrolle wurde an 5 Tieren nur eine Laminektomie ohne Trauma durchgeführt (Young und Koreh 1986). Eine Dosissteigerung von 30 zu 60 mg/kg ist assoziiert mit einem Verlust der antioxidativen Wirkung. Dagegen wirkt sich eine einmalige Bolusgabe von 30 mg/kg 10 Minuten nach dem ereigneten Trauma positiv auf das Überleben der Neurone und Axone während der folgenden 24 h aus. Aber jegliche Behandlung mit MP, die 30 Minuten oder später posttraumatisch begann, zeigte keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Yoon et al 1999). Nach experimenteller Datenlage kann davon ausgegangen werden, dass Glukokortikoide, die später als 30 Minuten nach dem Trauma appliziert werden,

eine geringe bis klinisch nicht erfassbare Wirkung entfalten. Des Weiteren sind die publizierten Daten zu den toxischen Nebenwirkungen valider als diejenigen zu klinisch positiven Wirkungen. Steroide sind keine „magic bullets“ (Hadley 2002). Es liegen nur Steroidstudien ohne Beleg wirklich erzielter Konzentration im Zielgewebe vor und stellen sich damit als schwer interpretierbar dar. Eine solche Datenlage wäre bei Antibiotika und Kardiaka unvorstellbar. Somit kann die Indikation von Steroiden bei Behandlung von intrakraniellen und spinalen Traumata nicht mehr als Behandlungsoption angesehen werden (Moskopp 1992, Moskopp 2004).

Eine Studie aus dem Jahre 2006 der Universität Parma untersuchte eine Kohorte von 12 Patienten ohne existierende Kontrollgruppe, die sofort nach dem Trauma die Megasteroiddosis erhielt, sowie jeden sechsten Monat für die nächsten 5 Jahre. Alle Patienten zeigten im Laufe von 5 Jahren nach ihrem Trauma einen stabilen Visus. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem posttraumatischen Visus und dem nach 5jährigen Kontrollen ersehen (Carta 2006).

### **Eigene Untersuchungsergebnisse**

Bei der Gegenüberstellung der Gesamtneuronzahl der MP-Gruppe zu der NaCl-Gruppe zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die verbliebene Gesamtneuronzahl ( $p=0.44$ ). Diese Aussage wird noch zusätzlich bei Betrachtung der vorliegenden Daten der NaCl-Gruppe untermauert. Es lässt sich eine um 3% stärkere Reduktion der retinalen Gesamtneuronzahl ersehen, welche jedoch klinisch und statistisch sich in einer nicht relevanten Größenordnung befindet. Aber speziell im zentralen GF der MP-Gruppe lässt sich ein signifikanter Unterschied in Hinsicht auf die Neuronzahl ableiten ( $p=0.0002$ ). Darunter ist zu verstehen, dass die MP-Gruppe im zentralen Gesichtsfeld einem geringeren Neuronenuntergang unterlag. Somit überleben 10% mehr Neurone im zentralen GF der MP-Gruppe das Trauma. Im intermediären GF der MP-Gruppe ergibt sich eine 3%ige Reduzierung der Neurone, welche jedoch keine statistisch signifikante Reduktion des

Neuronenuntergangs ( $p=0.84$ ) darstellt (s. Tab.9). Im peripheren Gesichtsfeld liegt kein signifikanter Unterschied beider Gruppen vor.

Beide Gruppen weisen im Rahmen der hier angewandten Substanzen keinen therapeutischen Effekt auf ( $p=0.44$ ), d.h. weder Methylprednisolon noch NaCl bieten eine Stabilisierung oder Schutz der Neuronzahl des rechten traumatisierten N. opticus im Gegensatz zu dem linken nicht-traumatisierten Sehnerven. Aus dieser Datenlage lässt sich in diesem Versuchsaufbau mit der gewählten Dosierung nur im zentralen Gesichtsfeld für MP in Hinsicht auf die Neuronzahl ein signifikanter Unterschied ableiten ( $p=0.002$ ).

Dies wurde schon in anderen Veröffentlichungen gezeigt, die sogar eine eher schädigende Tendenz des MP vermuten ließen (Hadley 2002, Steinsapir und Goldberg 2002, Rabchevsky 2002). In dieser Arbeit wird es nochmals anhand der absoluten mittleren Neuronzahlen aus der Tabelle 9 (3.2.2) hinreichend demonstriert.

Bei der Größenanalyse der retinalen Ganglienzellen lässt sich feststellen, dass die MP-Gruppe im Vergleich zur NaCl-Gruppe in allen Gesichtsfeldern signifikant kleinere Ganglienzellen vorweist ( $p < 0.001$ ). Die R/L-Quotienten der beiden Versuchsgruppen verdeutlichen dies weiter (s. Tab.11). Die NaCl-Gruppe zeigt bessere Auswertungsergebnisse als die MP-Gruppe. Entsprechend der Neuronzahl zeigt sich auch hier, dass die Kontrollgruppe das Sehnervtrauma und die darauf folgende Therapie in Bezug auf die verbliebene Fläche der retinalen Ganglienzellen deutlich besser überstanden hat. In Prozentzahlen dargestellt, zeigt sich in der Gegenüberstellung der Gesamtneuronflächen eine um 5% stärkere Minderung in der MP-Gruppe. Parallel zur Gesamtneuronfläche findet sich im zentralen GF der MP-Gruppe eine Minderung der Neuronfläche um 6%, im intermediären um 8% und im peripheren GF der MP-Gruppe um 2%. Folglich schneidet die NaCl-Gruppe in allen GF deutlich besser ab und liefert größere Neurone. Diese Datenlage deutet nicht auf eine statistisch greifbare Stabilisierung der retinalen Ganglienzellfläche durch Methylprednisolon im Vergleich mit NaCl hin.

## Flunarizin

Aufgrund seiner vasodilatierenden Wirkung wird Flunarizin (FLU) bei Migräne, Schwindel, Durchblutungsstörungen, Epilepsie und in der Neurotraumaforschung eingesetzt (Cupini 2003, Berger 1998, Belforte 2001). Dieses lipophile Diphenylpiperazin, welches zudem auch eine antihistaminische Wirkung aufweist, besitzt seinen Angriffspunkt auf zellulärer Ebene als Hemmstoff der langsamen, spannungsabhängigen Calcium-Kanäle (Pauwels 1990, Belforte 2001). Die posttraumatische Ischämie und der neuronale Zelluntergang stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit der Calciumionenverschiebung, die sich sofort nach dem ZNS-Trauma ereignet. Folglich werden mit dem Einsatz von Flunarizin Erwartungen in eine primäre neuroprotektive Wirkung und eine sekundäre Neuroprotektion durch Verminderung der Ischämie gesetzt. Bei in vitro Versuchsdurchführungen zeigten schon 1990 *Rich* und *Hollowell*, dass eine Flunarizindosis von 20 bis 40  $\mu\text{M}$  notwendig ist, um embryonale sensible und sympathische Neurone nach Entzug von NGF vor der Zelldegeneration zu bewahren. Die benötigte Dosierung, um spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu blockieren, liegt bei 3 bis 10  $\mu\text{M}$ . Dies führte dazu, einen intrazellulären Effekt von Flunarizin anzunehmen (*Rich* und *Hollowell* 1990). In der internationalen Literatur trifft man auf die Veröffentlichung von *Eschweiler* und *Bähr* aus dem Jahre 1993, die als eine der wenigen sich mit dem Effekt von Flunarizin auf die RGC nach Trauma des Sehnerven beschäftigt haben. Die Flunarizingabe von 5 mg/kg KG erfolgte 30 min nach der Operation, danach erhielten die Versuchstiere alle 24 Stunden über einen Zeitraum von 14 Tagen eine subkutane Injektion der Substanz. Obwohl es sich in dieser Versuchsanordnung um eine Axotomie am Sehnerven handelt, wurde in der Versuchsgruppe nach Gabe der Substanz in einer geringeren Dosierung als in dieser vorliegenden Arbeit eine im Durchschnitt 14% höhere RGC-Zahl ausgezählt (*Eschweiler* und *Bähr* 1993).

Aber es stellen sich zu den erwünschten Wirkungen des FLU auch Nebenwirkungen in Form von Aggravation des pathologischen Patienten-

zustandes sowie, insbesondere bei älteren Patienten, extrapyramidale Störungen bei chronischer Behandlung (Belforte 2001). Somit zeigt sich eine Diskrepanz zwischen den experimentellen Studien und den klinischen Ergebnissen in der Dosierung des Medikamentes, dem Zeitpunkt der Gabe und der Behandlungsdauer (Zapater 1997).

### **Eigene Untersuchungsergebnisse**

In dieser hier vorgestellten Versuchsanordnung wurde Flunarizin in einer Dosierung von 25 mg/kg/KG subkutan appliziert und die histomorphometrisch erhaltenen Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe verglichen. Durch die Lipophilie des Flunarizins ist eine ausreichende Resorption und Konzentration im ZNS zu erwarten. Es wird vermutet, dass die Art der Läsion ein entscheidender Parameter für die Ausdehnung und die Detektierbarkeit der Neuroprotektion darstellt. In der bisher veröffentlichten Literatur wurde Flunarizin fast ausschliesslich bei finalen Nerventraumata wie z.B. der Axotomie des Sehnerven angewendet. Es liegt nahe, dass in der vorliegenden Arbeit das Sehnervtrauma zu gering gehalten wurde, so dass ein statistisch signifikanter Nachweis des neuroprotektiven Flunarizineffekts nicht erbracht werden konnte.

Bei Gegenüberstellung der absoluten Neuronzahl der rechten traumatisierten Netzhäute der FLU-Gruppe und der Cyclodextrin-Gruppe sind signifikant weniger absolute Neuronzahlen in der FLU-Gruppe zu finden ( $p=0.05$ ). Nur im zentralen GF erzielt die FLU-Gruppe eine höhere Neuronzahl. Im intermediären und peripheren GF schneidet die Cyclodextrin-Gruppe deutlich besser ab als die zu prüfende Substanz Flunarizin. Dies kann anhand der Tabelle 13 (3.2.3) nachvollzogen werden.

Im intermediären GF der FLU-Gruppe macht sich eine Neuronzahlreduzierung von 3% und im peripheren GF von 5% bemerkbar. Hingegen zeigt sich im zentralen GF der FLU-Gruppe eine um 2% geringere Neuronzahlreduzierung als in der Cyclodextrin-Gruppe. Bei der Gegenüberstellung der Gesamtneuronzahl beider Gruppen liefert die FLU-Gruppe eine 2%ig höher

verlaufende Reduzierung als die Cyclodextrin-Gruppe. Dennoch stellt dieses statistisch erbrachte Ergebnis in dieser minimalen Größenordnung keine klinisch relevante Veränderung in Form einer Verbesserung dar.

Die histomorphometrische Analyse der Neuronfläche erbrachte für Flunarizin kleinere Neuronflächen in allen ausgewerteten Gesichtsfeldern. Der R/L-Quotientenvergleich beider Versuchsgruppen ergab zusätzlich eine signifikante Neuronflächenminderung für Flunarizin.

In Prozentzahlen ausgedrückt sieht man in allen GF der FLU-Gruppe eine 6%ige Reduzierung der Neuronfläche als innerhalb der Cyclodextrin-Gruppe. Auch hier kann keine klinische Relevanz der Ergebnisse in dieser geringfügigen Größenordnung belegt werden.

## **MP und FLU**

Zusätzlich lässt sich anhand der prozentualen Gegenüberstellung von FLU und MP in Bezug auf die Neuronzahl sagen, dass die FLU-Gruppe in der Gesamtneuronzahl eine um 13%, im zentralen GF eine um 18%, im intermediären und peripheren GF eine um 9% höhere Reduzierung der Neuronzahl erlitten hat. Anhand dieser histomorphometrisch erhobenen Datenlage lässt sich im direkten Vergleich beider Substanzen feststellen, dass MP gegenwärtig eine stärkere positive Wirkung auf die untersuchte Zielgröße ausübt als FLU. Allerdings besitzt das statistisch ausgewertete Ergebnis keine klinische Relevanz.

Zudem stellte sich bei der Gesamtflächengegenüberstellung von FLU und MP heraus, dass bei FLU eine um 2% stärkere Reduzierung stattfand. Im zentralen GF von FLU leitet sich eine deutliche Reduzierung um 10% ab. Im intermediären GF liegen keine Unterschiede vor. Jedoch liefert FLU im peripheren GF eine um 3% schwächere Neuronflächenreduzierung. Somit zeigt das MP in seiner Megadosierung zumindest durchgehend einen positiven Effekt hinsichtlich der retinalen Ganglienzellzahl. Allerdings trifft das nicht

ausnahmslos auf die retinale Ganglienzellfläche zu, was durch die dazugehörige Datenlage untermauert werden kann. Hier hebt sich einzig das zentrale GF der MP-Gruppe mit einer Stabilisierung gegenüber der FLU-Gruppe hervor.

Zukünftig sind weitere detaillierte Untersuchungen in Anbetracht der Dosierung und des Wirkspektrums zu empfehlen, welche die gezielte Auswirkung dieser Substanzen in abgewandelten Versuchsanordnungen erforscht.

#### 4.4 Neue Behandlungsansätze der TON

Da ZNS-Neuronen in der späten Embryonalphase und in der postnatalen Entwicklung ihre Fähigkeit, zur Axonregeneration, verlieren und der Apoptose unterliegen, sind neuroprotektive Substanzen ständig in der wissenschaftlichen Diskussion präsent (James 1933), (Yin 2003). Es existiert eine Reihe von neuroprotektiven Substanzen, die das neuronale Überleben der Ganglienzellen und somit auch die Funktion des visuellen Systems begünstigen. *Heiduschka* und *Thanos* konnten zeigen, dass eine intravitreale Injektion dieser verschiedenen Substanzen

- Aurintricarboxylsäure,
- Kortisol,
- einem Caspase Inhibitor und
- Brimonidin

eine Regeneration der Axone induzierte (Heiduschka und Thanos 2004).

Dem Einsatz von Erythropoietin (EPO), das als glia- und neuroprotektive Substanz Verwendung findet, werden neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben, die unter anderem durch die Ausschaltung der antiapoptotischen Janus-Kinase-2-Kaskade zustande kommen. Zudem wird die gestörte Auto-regulation des Gefäßtonus reguliert und die Induktion der Nitritoxid-Synthase

vermindert. Doch liefert EPO eine Beeinträchtigung in Bezug auf die Rheologie, die sich in einem erhöhten Hämatokrit und einer gesteigerten Thrombozytenaggregation zeigt. Durch die enzymatisch katalysierte Desialisation von EPO entsteht Asialoerythropoetin (AsialoEPO), das ohne rheologische Nebenwirkungen dieselben protektiven Eigenschaften zeigt (Schwab 2004). Der Macrophage-derived factor, der normalerweise von Makrophagen nach einem Trauma ausgeschüttet wird, wurde in der Versuchsanordnung von Yin durch eine intravitreale Injektion von Zymosan induziert und stimuliert die Axone des N. opticus zur Regeneration (Yin 2003).

Eine weitere Methode zur Axonaussprossung liefert die Blockierung des NOGO-Rezeptors. Es handelt sich um im Myelin befindliche Inhibitoren. Das NOGO-A, das Myelin assoziierte Glykoprotein und das Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein werden beschrieben und all diese binden an denselben NOGO-Rezeptor. Um eine antagonistische Wirkung zu erzielen wird die Bindung all dieser Myelininhibitoren blockiert und es resultiert eine effektive axonale Aussprossung (GrandPre 2002, Fischer 2004). Einige Autoren verfolgen das Prinzip der therapeutischen Vaccination in Form einer passiven Immunisierung. Dabei werden Anti-NOGO-Antikörper-produzierende Hybridomzellen transplantiert. Dies führt zu einer Antikörperbildung gegen die aufgeführten Inhibitoren des Myelins und der Narbe des Rückenmarks. Somit konnte ein Aussprossen der Axone von bis zu 11 mm distal der Läsionsstelle verbucht werden (Schnell und Schwab 1990).

*Klöcker et al.* forschten auf dem Gebiet der Wachstumsfaktoren und zeigten, dass der brain-derived growth factor (BDNF) das axonale Wachstum zum einen und zum anderen das neuronale Überleben fördert (Klöcker 1998, Klöcker 2000, Kido 2000). Neuroprotektive Wirkung wird auch dem (-) Delta 9-Tetrahydrocannabinol zugeschrieben, indem es durch die Formation des Peroxynitrit, welches nach dem exzessiven Glutamatanstieg entsteht, die Apoptose der Neurone in der Retina steuert (El-Remessy 2003). Ein Nachteil dieser Therapieoptionen war zum einen die intravitreale Applikationsart, zum

anderen war die Fallzahl zu gering, um einen therapeutischen Benefit für die Behandlung der traumatischen Optikusneuropathie signifikant nachweisen zu können. Zusätzlich handelt es sich teilweise um experimentell nicht etablierte Substanzen, die klinisch nicht zugelassen sind.

## 5 Zusammenfassung

Die indirekte traumatische Optikusneuropathie ist ein akut visusbedrohendes Krankheitsbild, dessen Therapie einer engen interdisziplinären Zusammenarbeit bedarf. Die Herausforderung in der Therapie der traumatischen Optikusneuropathie ist die Neuroprotektion der retinalen Ganglienzellen mit Einschluss der Aufdeckung der pathophysiologischen Schädigungsmechanismen. Als Neuroprotektion wird die Behandlung bezeichnet, die das Überleben der Neuronen anstrebt. Die Neuroprotektion ist ein sinnreicher Behandlungsansatz, wenn der genaue Pathomechanismus einer Erkrankung noch nicht aufgeklärt ist, aber ein definiertes Ergebnis - eine geschädigte oder abgestorbene retinale Ganglienzelle - resultiert. Der Funktionserhalt von Neuronen ist von ausgesprochener wissenschaftlicher Wichtigkeit, da es sich bei diesen um postmitotische Zellen, welche nach der Geburt keine weitere Zellteilung durchlaufen, handelt.

Das experimentelle Tiermodell sollte ein standardisiertes, leicht reproduzierbares und kontrolliertes Verfahren zum Kompressionstrauma am N. opticus darstellen. Der apoptotische retinale Ganglienzelluntergang und die damit analog einhergehende tendenzielle Schrumpfung überlebender Neurone treten als Konsequenzen des Kompressionstraumas auf. Die TON ist eine seltene Erkrankung und zudem ist die Diagnosestellung aufgrund ungünstiger Untersuchungsbedingungen nicht immer einfach; sie sollte jedoch in 5 % aller Mittelgesichts- und Frontobasisfrakturen erwogen werden. Die Kennzeichen der TON sind die sofortige oder auch zeitlich retardierte Visusminderung, wobei das betroffene Auge in bis zu 50% der aufgetretenen Fälle erblindet. Da dem primären Trauma sekundäre Schädigungsmechanismen, die mit einem weiteren Neuronenuntergang verbunden sind, nachfolgen, kann hier mittels therapeutischen Einschreitens eine Reduzierung derselbigen erreicht werden.

Es existieren bis heute noch keine Richtlinien für das therapeutische Verhalten bei einer TON beim Menschen, die über den Rahmen von Empfehlungen

hinausgehen. Die pathophysiologischen Mechanismen, die zur TON führen, sind noch nicht ganz aufgeklärt. In der Literatur sind sowohl die hochdosierte Steroidtherapie, als auch die chirurgisch durchgeführte Dekompression des knöchernen Sehkanals und die Kombination beider Therapiearme in der Indikation kontrovers diskutiert. Basierend auf Erfahrungen bei Rückenmarksverletzungen wird eine Megadosis-Steroidtherapie befürwortet, um eine Reduktion der sekundären Schädigungsmechanismen zu erreichen. Der Wert einer zusätzlichen operativen Dekompression wurde zwar in mehreren Studien bestätigt, dies geht aber noch nicht über den Rahmen einer Empfehlung hinaus. Undeutlich ist neben der Wahl der Therapieart auch der Zeitfaktor, d.h. bis zu welchem Zeitpunkt nach dem Funktionsverlust eine chirurgische oder konservativ-medikamentöse Therapie im Hinblick auf eine therapeutische Wirkung noch von Nutzen ist.

Ziel dieser Arbeit war anhand des experimentellen Tiermodells die therapeutisch-neuroprotektive Potenz von Methylprednisolon und Flunarizin bei der traumatischen Optikusneuropathie zu evaluieren. Dieses Tiermodell ist die Reflektion des Pathomechanismus der traumatischen Optikusneuropathie und ermöglicht beispielhaft die klinische Relevanz der verschiedenen Therapieansätze zu erproben. An 40 Ratten wurde mittels Kompressionstrauma, das am intraorbitalen Anteil des Sehnerven mit Hilfe eines 5 g schweren Stempels über 6 min durchgeführt wurde, eine TON hervorgerufen. Eine valide Aussage über die retinalen Ganglienzellen konnte durch eine Kresylviolett-Färbung erzielt werden.

Methylprednisolon wurde in seiner Megadosierung (285 mg/kg/KG/48h) der Therapiegruppe i.v. verabreicht. In der Gesamtstatistik der Neuronzahl liefert Methylprednisolon eine 3%ig niedrigere Neuronzahlreduktion als NaCl, was besagt, dass Methylprednisolon hinsichtlich des zu prüfenden Merkmals „Neuronzahl“ in dieser Versuchsanordnung besser abschneidet. Jedoch weist die Gesamtstatistik der Neuronfläche im Vergleich eine 5%ige Reduzierung der Neuronfläche auf.

Der Calciumantagonist Flunarizin wurde in der Gesamtdosierung von 750 mg in Bezug auf seine neuroprotektive Wirkung auf die Netzhaut überprüft.

In der Gesamtstatistik der Neuronzahl verbucht Flunarizin eine Reduzierung um 2%, während die Neuronfläche einen Verlust von 5% belegen lässt.

Vergleicht man Methylprednisolon und Flunarizin direkt miteinander, sieht man, dass Flunarizin sowohl bei der Neuronzahl (13%), als auch bei der Neuronfläche (2%) statistisch eine höher gradige Reduzierung verbucht. Vom klinischen Standpunkt aus betrachtet, sind diese Ergebnisse jedoch in dieser Größenordnung nicht relevant.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass diese vorgestellten Therapieansätze zukünftig in weiteren Versuchsanordnungen erforscht werden sollten.

## 6 Literaturverzeichnis

**Akins, P. T., Atkinson, R. P., (2002):**

Glutamat AMPA receptor antagonist treatment for ischemic stroke.  
Curr Med Res Opin 18 Suppl 2: 9-13

**Allcutt, D., Berry, M., Sievers, J., (1984):**

A qualitative comparison of the reactions of retinal ganglion cell axons to optic nerve crush in neonatal and adult mice.  
Dev Brain Res 16: 231-240

**Al-Qurainy, I. A., Stassen, L. F., Dutton, G. N., Moos, K. F., el-Attar, A., (1991):**

The characteristics of midfacial fractures and the association with ocular injury: a prospective study.  
Br J Oral Maxillofacial Surg 29: 291-301

**Anand, V. K., Sherwood, C., Al-Mefty, O., (1991):**

Optic nerve decompression via transethmoid and supraorbital approaches. Operative techniques in otolaryngology.  
Head and Neck Surgery 2: 157-166

**Andermann, E., (1994):**

Benign familial nocturnal alternating hemiplegia of childhood.  
Neurology 44: 1812-1814

**Barkan, O., Barkan, H., (1928):**

Fracture of the optic canal.  
Am J Ophthalmol, 11: 767-774

**Barnes, P.J., (1985):**

Clinical studies with calcium antagonists in asthma.  
Br J Clin Pharmacol 20:9-13

**Barnes, P.J., (1994):**

New anticonvulsant drugs. Focus on flunarizine, fosphenytoin, midazolam and stiripentol.  
Drug 48:153-171

**Behrens-Baumann, W., Chilla, R., (1984):**

Drug and surgical therapy of traumatic optic nerve compression.  
Fortschr Ophthalmol 81 (1): 87-89

**Behrmann, D. L.; Bresnahan, J. C.; Beattie, M. S., (1994):**

Modeling of acute spinal cord injury in the rat:  
neuroprotection and enhanced recovery with methylprednisolone, U-74006F  
and YM-14673.  
Exp Neurol 126: 61-75

**Belforte, J. E.; Magarinos-Azcone, C.; Armando, I.; Buno, W.; Pazo, J. H., (2001):**

Pharmacological involvement of the calcium channel blocker flunarizine in  
dopamine transmission at the striatum.  
Parkinsonism Relat Disord 8 (1): 33-40

**Benzel, E. C.; Hoffpauir, G. M.; Thomas, M. M.; Beal, J. A.; Lancon, J. A.; Kesterson, L., (1990):**

Dose-dependent effects of naloxone and methylprednisolone in the ventral  
compression model of spinal cord injury.  
J Spinal Disord 3 (4): 339-344

**Berestka, J. S.; Rizzo, J. F., (1994):**

Controversy in the management of traumatic optic neuropathy.  
Int Ophthalmol Clin 34 (3): 87-96

**Berger, R.; Lehmann, T.; Karcher, J.; Garnier, Y.; Jensen, A., (1998):**

Low dose flunarizine protects the fetal brain from ischemic injury in sheep.  
Pediatr.Res. 44 (3): 277-282

**Berlin, R., (1879):**

Über Sehstörungen nach Verletzung des Schädels durch stumpfe Gewalt.  
Berl Versamml Ophthalmol Ges 8: 9-9

**Beuthner, D., (1974):**

Consideration of optic nerve decompression in relation to a 10 year review of  
management in fractures of the anterior base of the skull.  
Laryngol Rhinol Otol (Stuttg) 53 (11): 830-835

**Bilyk, J. R.; Joseph, M. P., (1994):**

Traumatic optic neuropathy.  
Semin Ophthalmol 9 (3): 200-211

**Bracken, M. B.; Shepard, M. J.; Collins, W. F.; Holford, T. R.; Young, W.; Baskin, D. S.; Eisenberg, H. M.; Flamm, E.; Leo-Summers, L.; Maroon, J., (1990):**

A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the  
treatment of acute spinal-cord injury.  
Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study.  
N Engl J Med 322 (20): 1405-1411

**Carmignoto, G., (1989):**

Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section.

J Neurosci 9: 1263-1272

**Carta, A.; Ferrigno, L., (2006):**

Long-term outcome after conservative treatment of in direct traumatic optic neuropathy.

Eur J Ophthalmol 16 (6): 847-850

**Chousa, C.; Scaramelli, A., (1986):**

Parkinson, tardive dyskinesia, akathisia, and depression induced by flunarizine.

Lancet 1: 1303-1304

**Cupini, L. M.; Santorelli, F. M.; Iani, C.; Fariello, G.; Calabresi, P., (2003):**

Cyclic vomiting syndrome, migraine, and epilepsy: a common underlying disorder?

Headache 43 (4): 407-409

**Demopoulos, H. B.; Flamm, E. S.; Seligman, M. L.; Pietronigro, D. D.; Tomasula, J.; DeCrescito, V., (1982):**

Further studies on free-radical pathology in the major central nervous system disorders: effect of very high doses of methylprednisolone on the functional outcome, morphology, and chemistry of experimental spinal cord impact injury.

Can J Physiol Pharmacol 90 (11): 1415-1424

**Devoto, P., (1991):**

Inhibition of [3H] dopamine uptake by flunarizine.

Eur J Pharmacol 203: 67-69

**Diem, R.; Hobom, M.; Maier, K.; Weissert, R.; Storch, M. K.; Meyer, R.; Bahr, M., (2003):**

Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway.

J Neurosci 23 (18): 6993-7000

**Diener, H. C., (1994):**

A review of current treatment of migraine.

Eur Neurol 34 (2): 18-25

**Dorscheid, D. R., (2001):**

Apoptosis of airway epithelial cells induced by corticosteroids.

Am J Respir Crit Care Med 164: 1939-1947

**Dul, M. W., (1993):**

Optic nerve trauma.

Optom Clin 2 (3): 91-101

**Duvdevani, R., (1990):**

Graded crush of the rat optic nerve as a brain injury model combining electrophysiological and behavioral outcome.

Neurol Neurosci 2: 31-38

**El-Remessy, A. B., (2003):**

Neuroprotective effect of (-)delta9-Tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite.

Am J Pathol 5 (163): 1997-2008

**Eschweiler, G. W.; Bähr, M., (1993):**

Flunarizine enhances rat retinal ganglion cell survival after axotomy.

J Neurol Sci 116: 34-40

**Eysel, U. T., (1994):**

Sehsystem.

Klinke R, Silbernagel S, (Hrsg.) Lehrbuch der Physiologie. Thieme, Stuttgart, New York: 595-621

**Falkenstein, E., (2000):**

Multiple actions of steroids hormones: a focus on rapid, nongenomic effects.

Pharmacol Rev 52: 513-556

**Fischer, D., (2004):**

Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state.

The Journal of Neuroscience 24 (7): 1646-1651

**Frenkel, R. E. P.; Spoor, T. C., (1988):**

Neuro-ophthalmologic manifestations of trauma, Management of ocular, orbital and adnexal Trauma.

Hrsg.: Spoor und Nesi, Raven Press, New York: 195-209

**Fukado, Y., (1981):**

Microsurgical transthemoidal optic nerve decompression: experience in 700 cases.

The cranial nerves

Springer, Berlin, Heidelberg, New York: 126-128

**Fukuda, Y., (1977):**

A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies.

Brain Res 119: 327-344

**Gäbler, C., (1995):**

Klinische Erfahrungen und Ergebnisse der hochdosierten

Methylprednisolontherapie bei Rückenmarkstrauma von 1991 bis 1993.

Unfallchirurgie 21 (2): 20-29

**Garcia, M., Ruiz Ederra, J. Hernandez Barbachano, E., (2003):**

Neuroproteccion de la celulas ganglionares de la retina.

Arch Soc Esp Oftalmol 78 (3): 151-157

**Gellrich, N. C., (1991):**

Regeneration im Zentralnervensystem.

Eine quantitative Analyse der Neurone und Gliazellen der retinalen Ganglienzellschicht adulter Ratten nach einfacher Axotomie oder Transplantation embryonaler Thalami (E16) in den Nervus opticus.

Medizinische Dissertation vorgelegt der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel

**Gellrich, N. C., (1995):**

Histomorphologische und elektrophysiologische Untersuchung zur traumatischen Sehnervschädigung.

Habilitationsschrift vorgelegt der medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum

**Gellrich, N. C.; Eysel, U. T.; Machtens, E., (1996):**

Damage to the optic nerve: an animal model.

Fortschr Kiefer Gesichtschir 41: 1-6

**Gellrich, M. M.; Gellrich, N. C., (1996):**

Quantitative relations in the retinal ganglion cell layer of the rat: neurons, glia and capillaries before and after optic nerve section.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 234 (5): 315-325

**Gellrich, N. C.; Gellrich, M. M.; Zerfowski, M.; Eufinger, H.; Eysel, U. T., (1997):**

Clinical and experimental study of traumatic optic nerve damage.

Ophthalmologie 94 (11): 807-814

**Gellrich, N. C.; Zerfowski, M.; Eufinger, H.; Reinert, S.; Eysel, U. T., (1998):**

Interdisciplinary diagnosis and therapy of traumatic optic nerve damage.

Mund Kiefer Gesichtschir 2 Suppl 1: S 107-S112

**Gellrich, N. C., (1999):**

Controversies and current status of therapy of optic nerve damage in craniofacial traumatology and surgery.

Mund Kiefer Gesichtschir 3 (4): 176-194

**Gellrich, N. C.; Schimming, R.; Zerfowski, M.; Eysel, U. T., (2002):**

Quantification of histological changes after calibrated crush of the intraorbital optic nerve in rats.

Br J Ophthalmol 86 (2): 233-237

**Gellrich, N. C.; Schramm, A.; Rustemeyer, J.; Schon, R.; Eysel U., (2002):**  
Quantification of the neurodegenerative impact on the visual system following sudden retrobulbar expanding lesions - an experimental model.  
J Craniomaxillofac Surg 30 (4): 230-236

**Gerfen, C. R.; O'Leary, D. D.; Cowan, W. M., (1982):**  
A note on the transneuronal transport of wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase in the avian and rodent visual systems.  
Exp Brain Res 48 (3): 443-448

**Gold, R., (2001):**  
Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders.  
J Neuroimmunol 117: 1-8

**Goldberg, R. A., (1992):**  
Microanatomy of the orbital apex. Computed tomography and microplanning of soft and hard tissue.  
Ophthalmol 99: 1447-1452

**Gossman, M. D.; Roberts, D. M., (1992):**  
Ophthalmic aspects of orbital injury- a comprehensive diagnostic and management approach.  
Clin Plast Surg 19: 71-85

**GrandPre, T., (2002):**  
Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration.  
Nature 417: 547-551

**Hadley, M. N., (2002):**  
Pharmacological therapy after acute cervical spinal cord injury.  
Neurosurgery 50 (Suppl): 63-72

**Hall, E. D; Braughler, J. M., (1982):**  
Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale.  
Surg Neurol 18: 320-327

**Hedges, T. R., (1981):**  
Traumatic anterior ischemic optic neuropathy.  
Ann Ophthalmol 13 (5): 625-628

**Heiduschka, P.; Thanos, S., (2004):**  
Neuroprotection and regeneration after traumatic lesion of the optic nerve.  
Klin Monatsbl Augenheilkd 221 (8): 684-701

**Holt, J. E.; Holt, G. R.; Blodgett, J. M., (1983):**

Ocular injuries sustained during blunt facial trauma.  
Ophthalmology 90 (1): 14-18

**Isenmann, S.; Kretz, A.; Cellerino, A., (2003):**

Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival and regeneration.

Prog Retin Eye Res 22 (4): 483-543

**James, G. R., (1933):**

Degeneration of ganglion cells following axonal injury.

Arch Ophthalmol 9: 338-343

**Joo, C. K.; Choi, J. S.; Ko, H. W.; Park, K. Y.; Sohn, S.; Chun, M. H.; Oh, Y. J.; Gwag, B. J., (1999):**

Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53.

Invest Ophthalmol Vis Sci 40 (3): 713-720

**Jorissen, M.; Feenstra, L., (1992):**

Optic nerve decompression for indirect posterior optic nerve trauma.

Acta Otorhinolaryngol Belg 46 (3): 311-324

**Joseph, M. P.; Lessell, S.; Rizzo, J.; Momose, K. J., (1990):**

Extracranial optic nerve decompression for traumatic optic neuropathy.

Arch Ophthalmol 108 (8): 1091-1093

**Kido, N.; Tanihara, H.; Honjo, M.; Inatani, M.; Tatsuno, T.; Nakayama, C.; Honda, Y., (2000):**

Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death.

Brain Res 884 (1-2): 59-67

**Kim, D. H.; Jahng, T. A., (2004):**

Continuous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion after Methylprednisolone treatment in severe spinal cord injury.

J Korean Med Sci 19 (1): 113-122

**Kline, L. B.; Morawetz, R. B.; Swaid, S. N., (1984):**

Indirect injury of the optic nerve.

Neurosurgery 14 (6): 756-764

**Klöcker, N.; Cellerino, A.; Bahr, M., (1998):**

Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells in vivo.

J Neurosci 18 (3): 1038-1046

**Klöcker, N.; Kermer, P.; Weishaupt, J. H.; Labes, M.; Ankerhold, R.; Bahr, M., (2000):**

Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B signaling.

J Neurosci 20 (18): 6962-6967

**Koc, R. K.; Akdemir H.; Karakucuk E. I.; Oktem I. S.; Menku A., (1999):**

Effect of methylprednisolone, tirilazad mesylate and vitamin E on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury.

Spinal Cord 37: 29-32

**Lang, J., (1981):**

Optic nerve, topographic anatomy.

The Cranial Nerves.

Hrsg.: M.Samii, P.J.Janetta, Springer, New York: 77-84

**Lessel, S., (1989):**

Indirect optic nerve trauma.

Arch Ophthalmol 107: 382-386

**Lessel, S., (1991):**

Traumatic optic neuropathy and visual system injury.

Eye Trauma: 371-379

**Levin, L. A.; Beck, R. W.; Joseph, M. P.; Seiff, S.; Kraker, R., (1999):**

The treatment of traumatic optic neuropathy: the International Optic Nerve Trauma Study.

Ophthalmology 106 (7): 1268-1277

**Linden, R., (1987):**

Displaced ganglion cells in the retina of the rat.

J Comp Neurol 258: 138-143

**Lugnier, C., (1984):**

Bepidil and flunarizine as calmodulin inhibitors.

Eur J Pharmacol 98: 157-158

**Luxenberger, W.; Stammberger, H.; Jebeles, J. A.; Walch, C., (1998):**

Endoscopic optic nerve decompression: the Graz experience.

Laryngoscope 108 (6): 873-882

**Matsuzaki, H.; Kunita, M.; Kawai, K., (1982):**

Optic nerve damage in head trauma: clinical and experimental studies.

Jpn J Ophthalmol 26 (4): 447-461

**Maxwell, W. L.; Irvine, A.; Graham; Adams, J. H.; Gennarelli, T. A.; Tipperman, R.; Sturatis, M., (1991):**

Focal axonal injury: the early axonal response to stretch.  
J Neurocytol 20 (3): 157-164

**Maxwell, W. L.; Irvine, A.; Watt, C.; Graham, D. I.; Adams, J. H.; Gennarelli, T. A., (1991):**

The microvascular response to stretch injury in the adult guinea pig visual system.  
J Neurotrauma 8 (4): 271-279

**Menge, T., (2000):**

Induction of the proinflammatory cytokine interleukin-18 by axonal injury.  
Braz J Med Biol Res 33 (12): 1477-1482

**Miller, N. R., (1990):**

The management of traumatic optic neuropathy.  
Arch Ophthalmol 108: 1086-1087

**Molloy, S., (2002):**

Failure to administer methylprednisolone for acute traumatic spinal cord injury- a prospective audit of 100 patients from a regional spinal injuries unit.  
Injury, Int J Care Injured 33: 575-578

**Moskopp, D., (1992):**

Corticosteroids in the treatment of optic neuritis.  
N Engl J Med 327 (4): 281-281

**Moskopp, D., (2004):**

Kein Nutzen für ZNS-Verletzte durch Corticoidbehandlung.  
Deutsches Ärzteblatt 47 (101): A 3181-A 3184

**Nakazawa, F., (2002):**

Corticosteroid treatment induces chondrocyte apoptosis in an experimental arthritis model and in chondrocyte cultures.  
Clin Exp Rheumatol 20: 773-781

**Niho, S.; Niho, M.; Niho, K., (1970):**

Decompression of the optic canal by the transtentorial route and decompression of the superior orbital fissure.  
Can J Ophthalmol 5 (1): 22-40

**Opderbecke, H. W.; Weißbauer, W., (2001):**

Zur Gabe von Kortikosteroiden nach akuter spinaler Traumatisierung.  
Entschließungen-Empfehlungen-Vereinbarungen.  
Ein Beitrag zur Qualitätssicherung in der Anästhesiologie: 17-28

**Osguthorpe, J. D., (1985):**

Transthmoid decompression of the optic nerve.  
Otolaryngol Clin North Am 18 (1): 125-137

**Osguthorpe, J. D.; Sofferman, R. A., (1988):**

Optic Nerve Decompression.  
Otolaryngologic Clinics of North America 21: 155-169

**Padosch, S.A.; Vogel, P., (2001):**

Neuronal apoptosis following cerebral ischemia.  
Basis, physiopathology and treatment strategies.  
Anästhesist 50 (12): 905-920

**Pauwels, P. J.; Van Assouw, H. P.; Peeters, L.; Leysen, J. E., (1990):**

Neurotoxic action of veratridine in rat brain neuronal cultures:  
mechanism of neuroprotection by Ca<sup>++</sup> antagonists nonselective for slow Ca<sup>++</sup>  
channels.  
J Pharmacol Exp Ther 255 (3): 1117-1122

**Payne, A. P., (1994):**

The harderian gland: a tercentennial review.  
J Anat 185: 1-49

**Peinado-Ramon, P.; Salvador, M.; Villegas-Perez, M. P.; Vidal-Sanz, M., (1996):**

Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells.  
A quantitative in vivo study.  
Invest Ophthalmol Vis Sci 37 (4): 489-500

**Perry, V. H., (1981):**

Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat.  
Retina Neurosci 6: 931-944

**Pomeranz, H. D.; Rizzo, J. F.; Lessel, S., (1999):**

Treatment of traumatic optic neuropathy.  
Int Ophthalmol Clin 39 (1): 185-194

**Prepared by the Ad Hoc Committee of the Congress of Neurological Surgeons, (1966):**

Head injury nomenclature: a glossary of head injury including some definitions of injuries of cervical spine.  
Clin Neurosurg 12: 388-394

**Pringle, J. H., (1922):**

Atrophy of the optic nerve following diffused violence to the skull.  
Br Med J 2: 1156-1157

**Rabchevsky, A. G.; Fugaccia, I.; Sullivan, P. G.; Blades, D. A.; Scheff, S. W., (2002):**

Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord.  
J Neurosci Res 68 (1): 7-18

**Ragsdale, D. S., (1991):**

Frequency and voltage-dependent inhibition of type IIA Na<sup>+</sup> channels, expressed in a mammalian cell line, by local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant drugs.  
Mol Pharmacol 40: 756-765

**Raveh, J.; Vuillemin, Th., (1988):**

The surgical one-stage management of combined craniomaxillo-facial and frontobasal fractures.  
J Craniomaxillofac Surg 16: 350-358

**Reim, M., (1985):**

Zur Physiologie des Auges.  
Die Pupille.  
Augenheilkunde, Enke, Stuttgart: 64-66

**Rich, K. M.; Hollowell, J. P., (1990):**

Flunarizine protects neurons from death after axotomy or NGF deprivation.  
Science 248: 1419-1421

**Ryck, M. D., (1989):**

Photoreceptor stroke model flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats.  
Stroke 20: 1383-1390

**Sakai, T., (1981):**

The mammalian Harderian gland:  
morphology, biochemistry, function and phylogeny.  
Arch Histol Jpn 44: 299-333

**Schmidbauer, J. M.; Muller, E.; Hoh, H.; Robinson, E., (1998):**

Early trans-sphenoid decompression in indirect traumatic optic neuropathy.  
HNO 46 (2): 152-156

**Schnell, L.; Schwab, M. E., (1990):**

Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors.  
Nature 343: 269-272

**Schwab, J. M., (2004):**

Akute Rückenmarkverletzung:  
Experimentelle Strategien als Basis zukünftiger Behandlungen.  
Deutsches Ärzteblatt 20 (101): A 1422- A 1434

**Seiff, S. R., Berger, M. S., Guyon, J., Pitts, L. H., (1984):**

Computed tomographic evaluation of the optic canal in sudden traumatic blindness.

Am J Ophthalmol 98: 751-755

**Seiff, S. R., (1990):**

High dose corticosteroids for treatment of vision loss due to indirect injury to the optic nerve.

Ophthalmic Surg 21 (6): 389-395

**Seiff, S. R., (1992):**

Trauma and the optic nerve.

Ophthalmol Clin North Am 109: 610-610

**Sewall, E. C., (1926):**

External operation on the ethmosphenoid-frontal group of sinuses under local anesthesia. Technique for removal of part of optic nerve.

Arch Otolaryngol 4: 410-411

**Sewall, E. C., (1928):**

Further development of the transsphenoid approach to the optic foramen.

Ann Otol Rhinol Laryngol 37: 839-849

**Shimazawa, M., (1995):**

Effects of calcium-channel blockers on cortical hypoperfusion and expression of c-Fos-like immunoreactivity after cortical spreading depression in rats.

Brit J Pharmacol 115: 1359-1368

**Sievers, H.; Gronemeyer, U.; Hansen, C.; Sievers, J., (1984):**

Der Fasciculus opticus als Modell für die Untersuchung von Regenerationsvorgängen im Zentralnervensystem.

Fortschr Ophthalmol 81: 164-167

**Sievers, J.; Hausmann, B.; Berry, M., (1989):**

Fetal brain grafts rescue adult retinal ganglion cells from axotomy-induced cell death.

J Comp Neurol 281 (3): 467-478

**Simpson, R. K.; Hsu, C. Y.; Dimitrijevic, M. R., (1991):**

The experimental basis for early pharmacological intervention in spinal cord injury.

Paraplegia 29 (6): 364-372

**Sofferman, R. A., (1981):**

Sphenoethmoid approach to the optic nerve

Laryngoscope 91 (2): 184-196

**Spoor, T. C.; Hartel, W. C.; Lensink, D. B.; Wilkinson, M. J., (1990):**

Treatment of traumatic optic neuropathy with corticosteroids.

Am J Ophthalmol 110 (7): 665-669

**Spoor, T. C.; McHenry, J. G., (1996):**

Management of traumatic optic neuropathy.

J Craniomaxillofac Trauma 2 (1): 14-26

**Steinsapir, K. D.; Goldberg, R. A., (1994):**

Traumatic optic neuropathy.

Surv Ophthalmol 38 (6): 487-518

**Steinsapir, K. D.; Goldberg, R. A., (1998):**

Traumatic optic neuropathies.

Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology: 715-739

**Steinsapir, K. D., (1999):**

Traumatic optic neuropathy.

Curr Opin Ophthalmol 10 (5): 340-342

**Steinsapir, K. D.; Goldberg, R. A.; Sinha, S.; Hovda, D. A., (2000):**

Methylprednisolone exacerbates axonal loss following optic nerve trauma in rats.

Restor Neurol Neurosci 17 (4): 157-163

**Steinsapir, K. D.; Seiff, S. R.; Goldberg, R. A., (2002):**

Traumatic optic neuropathy:

where do we stand?

Ophthal Plast Reconstr Surg 18 (3): 232-234

**Stevenson, J. A., (1987):**

Growth of retinal ganglion cell axons following optic nerve crush in adult hamsters.

Exp Neurol 97 (1): 77-89

**Thanos, S., (1988):**

Morphology of ganglion cell dendrites in the albino rat retina: an analysis with fluorescent carbocyanine dyes.

J Hirnforsch 29 (6): 617-631

**Thanos, S.; Thiel, H. J., (1991):**

Mechanisms governing neuronal degeneration and axonal regeneration in the mature retinofugal system.

J Cell Sci Suppl 15: 125-134

**Villegas-Perez, M. P.; Vidal-Sanz, M.; Rasminsky, M.; Bray, G. M.; Aguayo, A. J., (1993):**

Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats.

J Neurobiol 24 (1): 23-36

**Walker, J.; Criddle, L. M., (2001):**

Methylprednisolone in acute spinal cord injury: fact or fantasy?

J Emerg Nurs 27 (4): 401-403

**Walsh, F. B., (1966):**

Pathological-clinical correlations:

I. Indirect trauma to the optic nerves and chiasm.

II. Certain cerebral involvements associated with defective blood supply.

Invest Ophthalmol 5: 433-449

**Wohlrab, T. M.; Maas, S.; de Carpentier, J. P., (2002):**

Surgical decompression in traumatic optic neuropathy.

Acta Ophthalmol Scand 80 (3): 287-293

**Wolf, E., (1976):**

Anatomy of the eye and orbit.

WB Saunders: 325-340

**Yarangumeli, A.; Comoglu, S.; Koz, O. G.; Elhan, A. H.; Kural, G., (2003):**

Effects of betaxolol and flunarizine on visual fields and intraocular pressure in patients with migraine.

Doc Ophthalmol 106 (3): 265-270

**Yin, Y., (2003):**

Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration.

The Journal of Neuroscience 23 (6): 2284-2293

**Yoon, D. H.; Kim, Y. S.; Young, W., (1999):**

Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal cord injured rat.

Yonsei Med J 40 (4): 313-320

**Young, W.; Koreh, I., (1986):**

Potassium and calcium changes in injured spinal cords.

Brain Research 365: 42-53

**Young, W.; Bracken, M. B., (1992):**

The second national acute spinal cord injury study.

J Neurotrauma 9: 397-405

**Young W., (1993b):**

The therapeutic window for methylprednisolone treatment of acute spinal cord injury:  
implications for cell injury mechanisms.  
New York: Raven Press

**Zapater, P.; Moreno, J.; Horga, J. F., (1997):**

Neuroprotection by the novel calcium antagonist PCA50938, nimodipine and flunarizine, in gerbil global brain ischemia.  
Brain Res 772 (1-2): 57-62

**Zerfowski, M., (1999):**

Tierexperimentelle Untersuchung zur Therapie der traumatischen Optikusneuropathie.  
Habilitationsschrift vorgelegt einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum

## 7 Danksagung

Für die Überlassung des für mich sehr interessanten Themas danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. med. C. Gleiter, der stets mit wertvollen Ratschlägen und Hinweisen diese Arbeit unterstützte.

PD Dr. Dr. J. Hoffmann danke ich für die Überlassung des Elektronenmikroskops von Leica.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. Fotios Petroktistis, welcher mir während meiner Dissertation jederzeit vorbildlich und geduldig zur Seite stand.

Dr. Körtje, Leica Mannheim, danke ich herzlich für seine kompetente, stets freundliche und unermüdliche Unterstützung hinsichtlich „technischer Probleme“ bei der Anwendung der Bearbeitungssoftware.

Fr. Dr. Herberts aus dem Institut für Medizinische Biometrie möchte ich für Ihre fachliche Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse danken.

Ohne die konstruktive Kritik meiner Korrekturleserinnen wäre die Fertigstellung meiner Dissertation nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt Andrea Preschl und meiner langjährigen Freundin Manuela Falk.

Meinen Eltern und meiner Schwester, die mich über die ganze Zeit meines Studiums mit ihrer Liebe und unermüdlichen Unterstützung zum Fortfahren ermutigt haben. Vi voglio tanto bene.

Ich danke meinem Ehemann Dr. Dr. Daniel Groisman für die tatkräftige Hilfe, sowohl bei der Gestaltung des Layouts meiner Dissertation, als auch für die aufbauenden und stets verständnisvollen Worte.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name:	Quotadamo
Vorname:	Filomena
Geburtsdatum:	14.05.1980
Geburtsort:	Pforzheim
Staatsangehörigkeit:	italienisch
Familienstand:	verheiratet
Eltern:	Porzia Quotadamo Francesco Quotadamo
Geschwister:	Maria Teresa Quotadamo

### Schulbildung:

1987-1991	Inselschule Pforzheim
1991-2000	Hilda-Gymnasium
Juni 2000	Allgemeine Hochschulreife

### Studium:

April 2001	Aufnahme des Humanmedizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
März 2003	Ärztliche Vorprüfung
27.02.2007-18.06.2006	Praktisches Jahr Katharienenhospital Stuttgart HNO

19.06.2006-08.10.2006	Praktisches Jahr Katharienenhospital Stuttgart Innere Medizin
09.10.2006-31.12.2006	Praktisches Jahr Ospedale Regionale di Lugano Sede Civico Chirurgie
06.11.2007	Zweite Ärztliche Prüfung und Approbation als Ärztin
15.02.2008-31.03.2009	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie im Karl-Olga- Krankenhaus Stuttgart