

Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. U. Bartz-Schmidt

Elektrophysiologische Toxizitätsuntersuchungen von
schweren Farbstoffen für die vitreoretinale Chirurgie am
Modell der isolierten und umströmten Vertebratennetzhaut

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Sebastian Michael Müller

aus

Biberach an der Riß

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. P. Szurman

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer

Meinen Eltern

Inhalt

I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
II	EINLEITUNG	3
	II.1 VORWORT.....	3
	II.2 MAKULAFORAMEN	3
	II.3 EPIRETINALE MEMBRANEN	5
	II.4 OPERATIONSTECHNIK	7
	II.4.1 ILM-Peeling beim Makulaforamen.....	8
	II.4.2 Zur Technik des ILM-Peelings.....	8
	II.4.3 Peeling von epiretinalen Membranen.....	9
	II.5 FARBSTOFFE IN DER VITREORETINALEN CHIRURGIE – WIRKUNG UND VERTRÄGLICHKEIT.....	10
	II.5.1 Indocyaningrün, Brilliantblau und Trypanblau.....	10
	II.6 MODIFIKATIONEN ZUR HERSTELLUNG SCHWERER FARBSTOFFE FÜR DIE VITREORETINALE CHIRURGIE	14
	II.7 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	16
	II.7.1 Die Netzhaut – Anatomie und Funktion.....	16
	II.7.2 Das Elektroretinogramm (ERG).....	17
	II.7.3 Das ERG im Modell der isolierten perfundierten Retina	19
III	ZIEL DER ARBEIT	20
IV	MATERIAL UND METHODIK	21
	IV.1 GEWINNUNG UND PRÄPARATION DER ISOLIERTEN RETINAE	21
	IV.2 PERFUSIONSKAMMER	22
	IV.3 PERFUSIONSLÖSUNG.....	23
	IV.4 REIZQUELLE	24
	IV.5 FARBSTOFFE.....	24
	IV.6 OSMOLARITÄTSMESSUNG.....	25
	IV.7 VERSUCHSAUFBAU.....	25
V	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	26
	V.1 DAS VERSUCHSPROTOKOLL ZUR BEURTEILUNG DER WIRKUNG VON FARBSTOFFEN/FARBSTOFFGEMISCHEN AUF DIE B-WELLE.....	26
	V.2 DAS VERSUCHSPROTOKOLL ZUR BEURTEILUNG DER WIRKUNG VON FARBSTOFFEN/FARBSTOFFGEMISCHEN AUF DIE A-WELLE	27
	V.3 BBG BRILLIANT PEEL® GEMISCHT MIT GLUKOSE	27

V.3.1	<i>Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel® gemischt mit Glukose auf die b-Welle</i>	27
V.3.2	<i>Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel® gemischt mit Glukose auf die a-Welle</i>	27
V.4	BBG BRILLIANT PEEL (DEUTERIUMOXID)®	28
V.4.1	<i>Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die b-Welle</i>	28
V.4.2	<i>Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die a-Welle</i>	28
V.5	WIRKUNG VON BBG BRILLIANT PEEL (DEUTERIUMOXIDE)® AUF EINE ISOLIERTE HUMANE RETINA	28
V.5.1	<i>Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die b-Welle einer humanen Retina</i>	29
V.5.2	<i>Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die a-Welle einer humanen Retina</i>	29
V.6	ILM-BLUE® UND MEMBRANEBLUE-DUAL®	29
V.6.1	<i>Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von ILM-Blue® und MembraneBlue-Dual® auf die b-Welle</i>	29
V.6.2	<i>Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von ILM-Blue® und MembraneBlue-Dual® auf die a-Welle</i>	29
VI	AUSWERTUNG	30
VI.1	AUSWERTUNG DER ELEKTRORETINOGRAMME	30
VI.2	DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE.....	33
VII	ERGEBNISSE	34
VII.1	BBG BRILLIANT PEEL® GEMISCHT MIT GLUKOSE	34
VII.1.1	<i>Auswirkungen auf die b-Welle</i>	34
VII.1.2	<i>Auswirkungen auf die a-Welle</i>	37
VII.1.3	<i>Osmolarität der Gemische</i>	40
VII.2	BBG BRILLIANT PEEL (DEUTERIUMOXIDE)®	40
VII.2.1	<i>Auswirkungen auf die b-Welle</i>	40
VII.2.2	<i>Auswirkungen auf die a-Welle</i>	44
VII.2.3	<i>Testung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf einer humanen Retina</i>	48
VII.3	ILM-BLUE®	51
VII.3.1	<i>Auswirkungen auf die b-Welle</i>	51
VII.3.2	<i>Auswirkungen auf die a-Welle</i>	54
VII.4	MEMBRANEBLUE-DUAL®	57

VII.4.1	<i>Auswirkungen auf die b-Welle</i>	57
VII.4.2	<i>Auswirkungen auf die a-Welle</i>	60
VIII	DISKUSSION	63
VIII.1	ZUR METHODIK.....	63
VIII.2	BBG BRILLIANT PEEL® GEMISCHT MIT GLUKOSE	64
VIII.3	BBG BRILLIANT PEEL (DEUTERIUMOXID)®	65
VIII.4	ILM-BLUE® UND MEMBRANEBLUE-DUAL®	66
IX	ZUSAMMENFASSUNG	68
X	LITERATURVERZEICHNIS	70
XI	DANKSAGUNG	77
XII	BISHER AUS DIESER ARBEIT HERVORGEANGENE PUBLIKATIONEN	78

I Abkürzungsverzeichnis

ARPE-19	Humane Zelllinie des retinalen Pigmentepithels
µm	Mikrometer
µs	Mikrosekunden
µV	Mikrovolt
20G-ppV	20-Gauge-ppV
BBG	Brilliant Blue G
BSS	Balanced Salt Solution
C ₃ F ₈	Octafluorpropan
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton
ERG	Elektroretinogramm
ERM	Epiretinale Membranen
GDP	Guanosindiphosphat
GGM	Glaskörper-Grenzmembran
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HGA	Hintere Glaskörperabhebung
ICG	Indocyaningrün
ILM	Innere Grenzmembran
MBB	MembraneBlue-Dual®
ml	Milliliter
mlx	Millilux
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mOsm/l	Milliosmol pro Liter
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
NGF	Nerve Growth Factor
OCT	Optische Kohärenztomographie

PEG	Polyethylenglykol
PMF	Präretinale makuläre Fibrose
ppV	Pars plana Vitrektomie
RGC-5	Retinale Ganglienzellreihe der Ratte
RPE	Retinales Pigmentepithel
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
TB	Trypanblau
TGF	Transforming Growth Factor
ZM	Zellophan-Makulopathie

II Einleitung

II.1 Vorwort

Diese Arbeit soll Farbstoffe und Farbstoffgemische, die bei vitreoretinalen Eingriffen eine gute Kontrastierung anatomischer Leitstrukturen gewährleisten können, auf retinale Toxizität prüfen. Im Folgenden werden zunächst zwei Erkrankungen dargestellt, die eine Operation erfordern können.

II.2 Makulaforamen

Die Makula bildet mit ihrer zentralen Lage auf der Netzhaut und ihrer hohen Rezeptorendichte den Punkt des schärfsten Sehens. Pathologien in diesem Bereich gehen mit einer besonders starken Visusminderung einher.

Idiopathische Makulaforamina treten mit einer altersabhängig steigenden Inzidenz von 7,8/100000 Patienten pro Jahr auf. Frauen sind ca. dreimal häufiger betroffen als Männer (McCannel, Ensminger et al. 2009). In 13% der Fälle tritt das Foramen innerhalb von zwei Jahren auch auf dem anderen Auge auf (Lewis, Cohen et al. 1996). Die höchste Inzidenz besteht bei Frauen im siebten Lebensjahrzent. Klinisch bemerkbar macht sich die Erkrankung durch eine Visusminderung und ein verzerrt erscheinendes Bild (Metamorphopsien). Dies wird häufig erst dann vom Patienten bemerkt, wenn das Partnerauge im Rahmen eines Sehtests geschlossen wird. Ein wesentlicher Pathomechanismus für die Ausbildung eines Makulaforamens ist Glaskörperzug im Rahmen einer inkompletten Glaskörperabhebung. Der Glaskörper hebt sich durch Schrumpfung und Liquifizierung mit zunehmendem Alter von der hinteren Netzhaut ab, dies wird auch als hintere Glaskörperabhebung (HGA) bezeichnet. In diesem Zusammenhang kann es zu Traktion an den Bereichen kommen, wo er vermehrt haftet. Es sind dies die Glaskörperbasis, die Papille, Gefäße und die Makula (Kanski, Bowling et al. 2011 629-630).

Die Foramina können in verschiedene Stadien eingeteilt werden. Gass (1988) etablierte folgende Klassifizierung:

- Stadium 1: Ausbildung einer intraretinalen Pseudozyste
- Stadium 2: Durchgreifendes Loch bis auf das Retinale Pigmentepithel (RPE) mit einem Durchmesser $< 400 \mu\text{m}$
- Stadium 3: Durchgreifendes Loch bis auf das RPE mit einem Durchmesser $> 400 \mu\text{m}$
- Stadium 4: Durchgreifendes Loch bis auf das RPE mit einem Durchmesser $> 400 \mu\text{m}$ in Verbindung mit kompletter hinterer Glaskörperabhebung

Die Diagnose kann funduskopisch gestellt werden, wobei sich gelbe Punkte, ein Ring, ein Loch oder eine Schwellung der umgebenden Retina und subretinale Flüssigkeit zeigen können. Die gelben Punkte werden durch eine zentrifugale Verlagerung des Pigments Xanthophyll erklärt (Gass 1999; Tanner and Williamson 2000). Seit der Erstbeschreibung der optischen Kohärenztomographie (OCT) zur Anwendung bei Makulaforamen (Hee, Puliafito et al. 1995) hat sich diese Methode zum Staging und bei funduskopisch und klinisch nicht eindeutigen Befunden etabliert. Sie ermöglicht eine deutliche bessere Charakterisierung der Morphologie und kann manchmal einen Glaskörperzug sichtbar machen. Außerdem ist es möglich, schon kleinste Veränderungen an der Makula des Partnerauges zu erkennen. Über die Stadieneinteilung, den Visus, Gesichtsfeldeinschränkungen und die Progression des Befunds wird die Indikation für eine Operation gestellt. Im Stadium 1 besteht ein Risiko von 40%, dass ein durchgreifendes Foramen entsteht, in bis zu 60% der Fälle besteht aber ein spontaner Verschluss durch Lösen der Traktion (de Bustros 1994). Das Progressionsrisiko ist besonders hoch bei einem Visus von 20/50 oder weniger (Kokame and de Bustros 1995). Im Stadium 2 erfolgt eine Progression in 74% der Fälle innerhalb von 6-12 Monaten (Kim, Freeman et al. 1995). Ein spontaner Verschluss tritt in diesem Stadium in 11,5% der Fälle ein (Ezra and Gregor 2004), in den Stadien 3 und 4 nur noch in 4% (Freeman, Azen et al. 1997). Bei unbehandeltem Foramen fand sich nach 5-jährigem Bestehen in 74% der Fälle ein Visus von 20/200 oder schlechter

(Casuso, Scott et al. 2001; Williamson 2008). Eine Indikation für eine Vitrektomie und ein Peeling der inneren Grenzmembran (ILM) besteht vor allem für Makulaforamina der Stadien 2 und 3 mit nachweisbarer Glaskörpertraktion im OCT und beginnender Photorezeptorabhebung im Stadium 1. Liegt mit Stadium 4 bereits eine Glaskörperabhebung vor, sollte ebenfalls ein Peeling erfolgen, da hierdurch die Verschlussrate signifikant steigt (Schmidt-Erfurth 2002; Christensen 2009). Die Operationstechnik wird später genauer erläutert. In Zukunft kann ggf. ein Teil der Makulaforamina durch eine zusätzliche oder alleinige intravitreale Injektion mit Plasmin behandelt werden. Es handelt sich dabei um ein fibrinolytisches Enzym, das auch Laminin und Fibronectin spaltet. Diese spielen eine Schlüsselrolle bei der vitreoretinalen Adhärenz. In Studien wurde kürzlich die Wirksamkeit einer enzymatisch induzierten Glaskörperabhebung gezeigt (Hong, Deng et al. 2012; Stalmans, Benz et al. 2012; Tsui, Pan et al. 2012).

II.3 Epiretinale Membranen

Epiretinale Membranen (ERM) sind transparente oder transluzente avaskuläre Strukturen, die sich vor der Netzhaut ausbilden können. Sie können peripher oder vor der Makula entstehen, wobei letztere für die Beeinträchtigung des Sehens größere Bedeutung haben und daher hier beschrieben werden sollen. Die Prävalenz der Erkrankung lag bei einer in Australien durchgeführten Querschnittstudie ab einem Alter von 40 Lebensjahren bei 4,8% für eine Zellophan-Makulopathie (ZM), eine milde Form, und bei 1,7% für eine präretinale makuläre Fibrose (PMF), ein ausgeprägterer Befund. Dabei ergab sich eine starke Korrelation mit dem Alter: In der Gruppe der 40 bis 49-jährigen lag die Prävalenz bei 0,5% und stieg auf 11,7% bei über 80-jährigen an. Besonders die PMF kann zur Visusminderung führen. Diese ist häufig begleitet von einer Verzerrung des wahrgenommenen Bildes (Metamorphopsien) und kann bei Kontraktion der Membran und Zusammenziehen der zentralen Netzhaut mit einer Makropsie einhergehen. Bei einer älter werdenden Bevölkerung ist mit einer zunehmenden Bedeutung der Erkrankung in Zukunft zu rechnen (McCarty, Mukesh et al. 2005). ERM können in idiopathische und sekundäre Formen unterteilt werden. Sekundäre Ursachen sind z.B. eine eindellende Operation bei Netzhautablösung, wobei eine hämorrhagische Ablatio ein höheres Risiko für die Entwicklung von ERM birgt

(Hagler and Aturaliya 1971). Andere Gründe können eine vorangegangene Kataraktoperation, Argonlasertherapie und Kryopexie sowie stumpfes Bulbustraua, Venenastverschluss und Uveitis sein (Appiah and Hirose 1989). Bei der Pathogenese der idiopathischen ERM spielt, wie auch bei den Makulaforamina, die hintere Glaskörperabhebung eine wichtige Rolle. In einer 2009 durchgeführten Studie lag bei 92.9% der von ERM betroffenen Augen eine Glaskörperabhebung vor (Wang, Nguyen et al. 2009).

Epiretinale Membranen lassen sich orientierend in drei Stadien einteilen (Kwok, Lai et al. 2003):

- Stadium 1: Feine zellophanartige Membran, die eine Faltenbildung der inneren Netzhautschichten verursacht.
- Stadium 2: Ausgeprägtere Membran mit einer definierten Kante und Verschleierung der darunterliegenden Strukturen wie Retina und epiretinalen Gefäßen. Weniger als die Hälfte der ERM ist opak. Es kommt zu einer Verwerfung der Netzhaut auf ganzer Dicke.
- Stadium 3: Dicke Membran, deren opake Fläche mindestens die Hälfte der ERM betrifft. Es kommt zur Verziehung von Netzhaut und Gefäßen.

Als Pathomechanismus wird hauptsächlich eine Durchwanderung der Netzhaut durch Risse oder kleine Defekte in der inneren Grenzmembran (ILM) hindurch von Zellen des retinalen Pigmentepithels, aber auch Gliazellen, Makrophagen und Fibrozyten angenommen. Die meisten Membranen bestehen aus mehreren verschiedenen Zelltypen (Bellhorn, Friedman et al. 1975; Miller 1997). Vor kurzem wurde nachgewiesen, dass die intravitrealen Wachstumsfaktoren TGF beta 2 und NGF mit der Entwicklung von ERM assoziiert und daher zukünftige pharmakologische Angriffspunkte darstellen könnten (Iannetti, Accorinti et al. 2011).

Verursacht die ERM starke Metamorphopsien, deutliche Visusminderung oder besteht eine traktive Komponente, die zu einem Makulaforamen oder einer Ablatio führen könnte, ist eine operative Entfernung indiziert (Ting and Kwok 2005).

II.4 Operationstechnik

In beiden Fällen muss zur Entfernung der für die Pathologie ursächlichen Membranen der Zugangsweg über eine pars plana Vitrektomie (ppV) hergestellt werden.

Diese wurde erstmals in den 1970er Jahren durchgeführt (Machemer, Buettner et al. 1971). Die neue Technik ermöglichte vielseitige neue Therapiemöglichkeiten. Beispielsweise konnte eine Netzhautablösung bis dato nur von außen mittels eindellender Verfahren behandelt werden. Auch eine diabetische Glaskörperblutung und die diabetische Retinopathie waren nun direkt zugänglich. Nach den ersten 100 Fällen konnte bei 26% der Patienten mit einer zuvor nicht behandelbaren Ablatio die Netzhaut wieder angelegt werden (Laqua 1979), bei 73% der Patienten kam es zu einem signifikanten Visusanstieg. Die Technik wurde stetig weiterentwickelt, mehrere Instrumente zugleich eingeführt und die Sklerotomien konnten durch kleinere Geräte weniger invasiv angelegt werden. Auch die Möglichkeit, Endotamponaden wie z.B. Silikonöl zu verwenden, ist der Einführung der ppV zu verdanken (Machemer 1974; Bartz-Schmidt, Szurman et al. 2008; Recchia, Scott et al. 2010). Dies führte dazu, dass nun nahezu 100% der Netzhautablösungen erfolgreich therapiert werden konnten (Lincoff and Kreissig 2000). Die pars plana Vitrektomie stellt heute neben der Katarakt-Operation einen der häufigsten ophthalmochirurgischen Eingriffe dar.

Der Zugangsweg über die Pars plana ist in 3,5 - 4 mm Limbusabstand zu finden und stellt eine Zone dar, durch die ohne die Gefahr eine Ablatio zu induzieren mit den Operationsinstrumenten eingegangen werden kann. Der Bereich bildet die Pars caeca der Retina, die weiter nach zentral in etwa 6 mm Limbusabstand in die Pars optica übergeht. Die Instrumente können aus einer Lichtquelle, einer Infusion, einer Aspiration, einem Saugschneidegerät für die Vitrektomie („Cutter“), Pinzetten und Schneideinstrumenten bestehen. Wird eine 20G-ppV durchgeführt, so muss die Bindehaut vorher eröffnet werden. Bei einer 23G oder 25G-ppV kann ohne diesen Schritt direkt mit drei Trokaren über die pars plana in den Bulbus eingegangen werden. Nach Anlegen der Trokare wird eine Infusion mit einer physiologischen Elektrolytlösung angeschlossen, die den Bulbus stets in tonisiertem Zustand hält. Mit dem Cutter erfolgt jetzt eine Core-Vitrektomie und Vorarbeitung in Richtung der Papille, von wo aus eine hintere Glaskörperabhebung induziert wird – falls diese nicht bereits besteht. Dazu wird die Glaskörpergrenzmembran (GGM) vor der Papille

angesaugt bis in diesem Bereich der Glaskörper abgehoben ist. Dann kann durch ein Loch in der GGM und Flüssigkeitseinstrom zwischen GGM und ILM die Abhebung bis weiter in die Peripherie ausgedehnt werden. Nach weiterer Vitrektomie ist nun der eigentliche Operationssitus erreicht. Die weiteren operativen Schritte unterscheiden sich je nach Indikation etwas und werden im Folgenden dargestellt.

II.4.1 ILM-Peeling beim Makulaforamen

Die ILM ist eine transparente Membran, die während der Embryogenese eine wichtige Rolle für die Ausreifung der Retina und des gerichteten Wachstums der Axone spielt (Halfter 1998; Halfter, Dong et al. 2001). Sie besteht aus Kollagenfasern, Glykosaminoglykanen, Laminin und Fibronectin. Im Zentrum der Makula hat sie eine Dicke von 2,5 μm und wird in Richtung der Glaskörperbasis dünner, peripher misst sie nur noch 0,5 μm . Kelly und Wendel (1991) beschrieben erstmals die Vitrektomie zur Anlage der abgehobenen Netzhaut um das Makulaforamen und erreichten eine Visusverbesserung bei 42% der Patienten. Im Laufe der 1990er Jahre stellte sich heraus, dass das Peeling der ILM die Verschluss- und Rezidivraten deutlich verbesserte gegenüber einer alleinigen Vitrektomie. In einer Metaanalyse, die von 1992 bis 1999 operierte idiopathische Makulaforamina betrachtete, wurde eine Verschlussrate von 96% in Augen mit ILM-Peeling gegenüber 77% in Augen ohne Peeling beobachtet. Der bestkorrigierte Visus stieg bei 81% (nach Peeling) im Vergleich zu 55% (ohne Peeling) um mindestens zwei Zeilen an. Zahlreiche weitere Studien bestätigten die Vorteile des ILM-Peelings in den folgenden Jahren (Almony, Nudleman et al. 2012).

II.4.2 Zur Technik des ILM-Peelings

Die Entfernung dieser hauchdünnen, transparenten Membran stellt an den Operateur große Herausforderungen. Zunächst wird eine Inzision temporal der Fovea in Verlaufsrichtung der Axone durchgeführt, um eine Axotomie und damit verbundene iatrogene Skotome zu verhindern. Anschließend wird mit einer Pinzette der Rand der ILM ergriffen und diese in flachem Winkel kreisförmig von der Retina abgezogen. Dabei sollte der Abstand der ILM-Entfernung zur Fovea mindestens einen

Papillendurchmesser betragen. Nach Entfernung der ILM kann jetzt ein Flüssigkeits-Gas-Austausch erfolgen, um eine tamponierende Wirkung zu erhalten. Meist soll der Patient postoperativ vornehmlich eine Kopftiefhaltung einhalten, um eine optimale Wirkung des Gases und damit gute Voraussetzungen für den Verschluss des Foramens zu ermöglichen. Studien konnten aber bisher kein signifikant besseres anatomisches Ergebnis nachweisen, das auf die Lagerung zurückzuführen war (Chandra, Charteris et al. 2011). Eine Tamponade mit einem länger intraokular verbleibenden Gas wie Octafluorpropan (C_3F_8) begünstigt jedoch deutlich die Verschlussrate (Thompson, Glaser et al. 1994).

II.4.3 Peeling von epiretinalen Membranen

Die Vitrektomie und Induktion einer hinteren Glaskörperabhebung erfolgt wie oben beschrieben. Bei bisher nicht spontan erfolgter HGA kann es dabei bereits zu einer Ablösung der ERM zusammen mit der Glaskörpergrenzmembran kommen. Dies tritt bei jüngeren Patienten gelegentlich auch spontan auf und kann so eine Visusbesserung herbeiführen (Desatnik, Treister et al. 1999). Zur Entfernung der Membran wird diese an der Kante mit einer feinen Pinzette angehoben und in flachem Winkel von der Retina abgezogen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass möglichst wenig Traktion ausgeübt wird, um iatrogene Defekte zu vermeiden. Die Membran stellt sich häufig größer dar, als zunächst präoperativ sichtbar. Sie kann bis über die großen Gefäßbögen hinaus laufen. Eine Visualisierung der ERM kann daher hilfreich für eine komplette Entfernung sein. Die Anfärbung erfolgt z.B. mit Trypanblau (TB), einem Farbstoff der extrazelluläre Matrix darstellt und so eine bessere Kontrastierung gewährleisten kann (Haritoglou, Eibl et al. 2004; Haritoglou, Gandorfer et al. 2004). Nach Entfernung der epiretinalen Membranen hat sich die zusätzliche Entfernung der ILM bewährt. Dieses Vorgehen führte zu einer deutlichen Senkung der Rezidivrate. In einem Vergleich von einfachem Peeling, d.h. nur Entfernung der ERM, mit doppeltem Peeling (Entfernung von ERM und ILM), traten in der ersten Gruppe 16,3% Rezidive auf, in der zweiten Gruppe keine (Shimada, Nakashizuka et al. 2009). Der postoperative Visus unterschied sich in den Gruppen während des Beobachtungszeitraumes jedoch nicht. Weitere Studien belegen den Nutzen des ILM-Peelings (Park, Dugel et al. 2003; Almony, Nudleman et al. 2012). Als Ursache wird angenommen, dass ohne eine

ILM-Entfernung bis zu 51% der Zellen, hauptsächlich Gliazellen und einige Hyalozyten, auf der ILM verbleiben, diese als Leitstruktur nutzen und wieder proliferieren können.

In einer Studie von Gandorfer, Haritoglou et al. (2012) lag der Prozentsatz der verbleibenden Zellen nach alleinigem ERM-Peeling bei 20% im Mittel. Ein erneutes Auftreten einer epiretinalen Gliose erfolgt scheinbar nur in Arealen mit verbleibender ILM. Da diese sich nicht regenerieren kann, ist ein erneutes Auftreten nach ILM-Peeling unwahrscheinlich (Gandorfer, Haritoglou et al. 2012).

II.5 Farbstoffe in der vitreoretinalen Chirurgie – Wirkung und Verträglichkeit

Die ILM und ERM sind transparente oder semi-transparente Strukturen von wenigen Mikrometern Dicke, deren Entfernung eine chirurgische Herausforderung darstellt. Die Verwendung von Farbstoffen als Kontrastmittel im Bereich des sichtbaren Lichtes kann für den Chirurgen eine große Hilfe bei der Präparation sein. In diesem Fall werden Vitalfarbstoffe verwendet, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, am lebenden Organismus selektiv Strukturen anzufärben (Thaler, Schuttauf et al. 2009). Da die Substanzen direkt in Kontakt mit der neurosensorischen Retina kommen, muss vor der klinischen Anwendung eines Farbstoffes eine gründliche Untersuchung der Toxizität erfolgen.

Intraokular verwendete Farbstoffe sind u.a. Indocyaningrün (ICG), Brilliantblau (BBG) und Trypanblau (TB). Daneben bestehen weitere intravitreal applizierbare Substanzen, wie das dem ICG ähnliche Infracyaningrün und Patentblau. Die Darstellung von Glaskörperstrukturen kann mit Triamcinolon, einem synthetischen nicht-löslichen Steroid, erfolgen. Das folgende Kapitel soll einen Überblick über die in dieser Arbeit getesteten Farbstoffe geben.

II.5.1 Indocyaningrün, Brilliantblau und Trypanblau

Im Jahr 2000 wurde erstmals die Verwendung von **Indocyaningrün (ICG)** zur Darstellung der ILM beschrieben (Kadonosono, Itoh et al. 2000). Damals war der Tricarbozyanin-Farbstoff bereits seit vielen Jahren in der angiographischen Darstellung

der Aderhaut und ab 1998 auch zur Operation bei *Cataracta intumescens* eingesetzt worden. Die Anwendung intravitreal galt somit als sicher und wurde fortan in der vitreoretinalen Chirurgie verwendet. Es zeigte sich, dass ICG eine selektive Anfärbung der ILM ermöglichte und epiretinale Membranen nicht angefärbt wurden (Gandorfer, Messmer et al. 2001; Foster, Petersen et al. 2002). Die Präparation wurde einfacher, da neben dem Kontrast auch die Rigidität der Membran erhöht wurde. Dies wird auf eine Quervernetzung des Kollagens unter dem Einfluss von Licht zurückgeführt (Wollensak 2008). In den folgenden Jahren kam der Verdacht auf, dass ICG nicht so sicher war, wie anfangs gedacht. Studien zeigten Atrophien des RPE und Gesichtsfelddefekte (Stalmans, Van Aken et al. 2002; Lee, Yoon et al. 2003; Cheng, Yang et al. 2005). Tierversuche ergaben schon bei subretinaler Injektion einer niedrigen Konzentration eine Reduktion der Reizantworten im Elektroretinogramm (ERG) (Enaida, Sakamoto et al. 2002). Eine prospektive Studie über 7 Jahre zeigte neben dem Auftreten von Gesichtsfelddefekten und Optikusatrophie eine Beeinträchtigung des Farbsehens (von Jagow, Hoing et al. 2009). Es bestanden außerdem Hinweise auf eine starke lichtinduzierte Toxizität (Narayanan, Kenney et al. 2005; Kernt, Hirneiss et al. 2012). Dies ist von besonderer Bedeutung, da intraoperativ eine helle endoskopische Lichtquelle verwendet wird. Eine 2012 durchgeführte Metaanalyse ergab keine Verbesserung des Outcomes durch Anwendung von ICG und ein häufigeres Auftreten von Gesichtsfelddefekten. Der Visusverlauf war schlechter als bei Verwendung anderer Farbstoffe (Wu, Zhu et al. 2012). Eine Verwendung von ICG in der vitreoretinalen Chirurgie ist daher aus heutiger Sicht nicht mehr empfehlenswert.

Eine Alternative zu ICG stellt **Brilliantblau (BBG)** dar. Es handelt sich dabei um einen Aminotriarylmethan-Farbstoff, der ebenfalls mit hoher Affinität die ILM anfärbt, allerdings ergibt sich ein geringerer Kontrast als bei Färbung mit ICG und keine mechanische Versteifung der Membran. Der Farbstoff wird in der Lebensmittelindustrie verwendet und kann bei systemischer Aufnahme hoher Dosen in der Niere akkumulieren (Brown, Dorsky et al. 1980).

Im Modell der isolierten perfundierten bovinen Retina ergaben sich Hinweise auf eine bessere Biokompatibilität gegenüber ICG und Trypanblau, die bereits in früheren Studien mit der hier verwendeten Methode getestet worden waren (Luke, Luke et al. 2005; Luke, Januschowski et al. 2008). In Rattenaugen wurde bei hohen intravitreal

applizierten Dosen eine vermehrte Vakuolisierung beobachtet, ERG-Veränderungen zeigten sich nicht (Enaida, Hisatomi et al. 2006). Enaida und Ishibashi (2008) fanden bei hohen Dosen von BBG ebenfalls eine Vakuolisierung der inneren Netzhautstrukturen wie Müller- und retinale Ganglienzellen in Primatenaugen, aber keine Reduktion im ERG. Eine gute Darstellung der ILM und erleichterte Präparation wurde durch die Anfärbung erreicht und der Farbstoff als aussichtsreicher Kandidat für das ILM-Peeling angesehen. *In vitro* Studien an ARPE-19 Zelllinien ergaben ein relativ sicheres Profil für ICG, BBG und TB bei gebräuchlichen Dosen und Expositionszeiten, allerdings verursachte BBG als einziger Farbstoff hier bereits bei kurzer Expositionszeit toxische Effekte. Die Autoren sahen hier ICG als den sichersten Farbstoff an (Yuen, Gonder et al. 2009). Klinische Beobachtungen bei Verwendung von BBG im Rahmen von vitreoretinalen Eingriffen aufgrund von Makulaforamina und ERM sprechen für eine gute Verträglichkeit, wobei ein längerer Follow-Up noch aussteht (Henrich, Haritoglou et al. 2010; Hoing, Remy et al. 2011). Insgesamt ist die Studienlage für BBG noch gering.

Trypanblau (TB) ist ein anionischer Diazofarbstoff, der von Paul Ehrlich 1904 erstmals synthetisiert wurde (Ehrlich und Shiga 1907). Er wird in der Ophthalmologie zur Evaluation von Spenderhornhäuten eingesetzt. Dies ist möglich, weil der Farbstoff selektiv tote Zellen anfärben kann. Die Zellmembran vitaler Zellen kann aufgrund des hohen Molekulargewichts nicht überwunden werden (Stoddart 2011). Außerdem wird er zur Anfärbung der vorderen Linsenkapsel bei fortgeschrittener Katarakt verwendet, wenn kein guter Fundusreflex mehr vorliegt und die Kapsulorrhexis erschwert ist. In diesem Zusammenhang gilt die Verwendung als sicher (Melles, de Waard et al. 1999; van Dooren, Beekhuis et al. 2004). Allerdings wurde in einem Einzelfallbericht schon von einer vorübergehenden retinalen Toxizität nach Eintritt von Trypanblau in den Glaskörperraum berichtet, die sich durch transiente Gesichtsfelddefekte äußerte (Bacsal and Chee 2006). Für die vitreoretinale Chirurgie ist Trypanblau zur Färbung der ERM geeignet, da diese unter anderem aus abgestorbenen Gliazellen bestehen, dies wurde 2002 erstmals beschrieben (Feron, Veckeneer et al. 2002). Die ILM wird weniger gut dargestellt als bei Färbung mit BBG. 2001 erfolgte die erste Toxizitätsstudie für eine intravitreale Applikation an Kaninchenaugen. Mittels Licht- und Elektronenmikroskopie konnte eine Schädigung der Photorezeptoren und Aufhebung

der regulären retinalen Strukturen für Konzentrationen von 0,2% Trypanblau nachgewiesen werden. Bei Verwendung von 0,06 prozentiger Lösung traten diese Effekte nicht auf. Veränderungen im ERG zeigten sich nicht (Veckeneer, van Overdam et al. 2001). In neueren Studien wurde bereits für 0,15% Trypanblau ein signifikanter Rückgang der Reizantwort im ERG sowie eine Aufhebung der regulären retinalen Schichten festgestellt. Für 0,06 prozentige Lösung traten diese Effekte nicht auf (Heilweil, Komarowska et al. 2010). Bei einer 2004 durchgeführte Studie wurden Schweineaugen *post mortem* entnommen und die Retina mit Trypanblau 0,15% und BSS (Balanced Salt Solution) exponiert. Es zeigten sich keine histologischen Schädigungen der Netzhaut bei einer Expositionszeit von einer Minute (Grisanti, Szurman et al. 2004). Mackenzie, Gandorfer et al. (2010) fanden bei Verwendung von TB für das ILM-Peeling keine Zeichen einer Toxizität. Die Präparation und Vollständigkeit der ILM-Entfernung beschrieben sie als deutlich verbessert. In einer prospektiven klinischen Studie mit 30 Augen wurde ICG mit TB verglichen. Dabei traten nach Applikation von ICG signifikant mehr Gesichtsfelddefekte nach 3 Monaten auf, wobei nach 6 Monaten keine signifikante Differenz mehr bestand. Die Autoren beurteilten TB als weniger toxisch (Schmid-Kubista, Lamar et al. 2010). Abdelkader, McBain et al. (2011) untersuchten das Auftreten von RPE-Defekten nach intravitrealer TB-Anwendung bei 21 Patienten mittels Autofluoreszenz und stellten keine Schäden fest, die auf die Exposition mit dem Farbstoff zurückzuführen waren. Bestkorrigierter Visus und ERG waren postoperativ signifikant besser. In Zellkulturstudien an RPE-Zelllinien zeigte sich für Trypanblau eine chronische Toxizität nach Exposition über 6 Tage. Es verbleibt aufgrund der guten Wasserlöslichkeit wahrscheinlich nur wenig Farbstoff im Auge, daher sind chronische Effekte weniger ausgeprägt (Kodjikian, Richter et al. 2005). Im Modell der isolierten perfundierten Retina war bereits nach 15 s Anfärbung mit 0,15% Trypanblau eine Reduktion der b-Wellen-Amplitude nachweisbar, die innerhalb der Auswaschzeit von knapp zwei Stunden nur teilweise reversibel war (Luke, Luke et al. 2005).

II.6 Modifikationen zur Herstellung schwerer Farbstoffe für die vitreoretinale Chirurgie

Nach der Virektomie gilt es, die zu präparierenden semitransparenten Strukturen gut zu kontrastieren, um eine möglichst vollständige Entfernung zu gewährleisten (siehe auch II.4). Während der Operation ist der Bulbus mit Flüssigkeit gefüllt. Soll eine epiretinale Membran oder die ILM angefärbt werden, so muss bei einem Farbstoff, dessen Dichte nicht höher als die der Spülflüssigkeit ist, vor der Applikation ein Flüssigkeits-Gas-Austausch erfolgen. Um diesen Schritt zu umgehen, müssen die Farbstoffgemische modifiziert werden.

Eine Methode zur Erhöhung der Dichte ist die Kühlung der Lösung auf 4 °C. Wird sie in die etwa 20 °C warme intraokuläre Spülflüssigkeit gegeben, kommt es durch den Temperaturunterschied zu einem Absinken des Farbstoffs auf die Zielstrukturen. Allerdings findet durch das kleine injizierte Volumen eine schnelle Erwärmung und damit Verteilung des Farbstoffs im Glaskörperraum statt (interne Kommunikation).

Ein weit verbreitetes Verfahren ist daher die Zugabe von 0,05 ml Glukose zu 0,4 ml BBG. Toxizitätsprüfungen dieses Gemisches für die epiretinale Applikation wurden bisher nach aktuellem Kenntnisstand nicht durchgeführt, die Anwendung ist off-label. In einer Zellkultur-Studie mit humanen Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) konnte für eine fünfprozentige Glukoselösung mit und ohne Zugabe des Farbstoffs Indocyaningrün keine Toxizität festgestellt werden (Stalmans, Van Aken et al. 2002). Nicht veröffentlichte Daten des Herstellers Fluoron ergaben auf isolierten Zellkulturen bereits toxische Effekte ab einer Glukosekonzentration von 1,11%, allerdings erfolgte hier eine längere Exposition (70,5 Stunden Inkubationszeit). In dieser Arbeit sollen auch osmotisch-toxische Wirkungen bei verschiedenen Glukose-Konzentrationen berücksichtigt werden.

Um Glukose als Zusatz funktionell zu ersetzen, wurde BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxid)[®] entwickelt. „Schweres Wasser“ wird durch die Anreicherung mit dem stabilen Isotop des Wasserstoffs (H_2), dem Deuterium (D_2) hergestellt. Das Deuteriumoxid wurde 1932 von Harold Urey entdeckt (Bradley Jr and Urey 1932). Seit der Erstbeschreibung sind diverse toxische Wirkungen vornehmlich im Zusammenhang mit dem zentralen Nervensystem beschrieben worden, eine Toxizität

bei direktem Kontakt mit der neurosensorischen Retina ist somit denkbar. Bei hohen systemischen Deuteriumkonzentrationen traten im Tierversuch Hirnödeme, Krampfanfälle, Atemdepression und Tod auf. Toxische Wirkungen zeigten sich erst ab einer Deuteriumkonzentration von 30% im Trinkwasser, bzw. einer Serumkonzentration von 23% (Thomson 1960; Czajka, Finkel et al. 1961; Katz, Crespi et al. 1962; Medina, Li et al. 2005; Januschowski, Mueller et al. 2012). Das in dieser Arbeit getestete Gemisch hat einen Deuteriumanteil von 13%.

Mit Polyethylenglykol (PEG) wird ein weiterer Zusatz zur Erhöhung der Dichte getestet. Dieser ist in ILM-Blue® (BBG mit 4% Polyethylenglykol) und MembraneBlue-Dual® (Trypanblau und BBG mit 4% Polyethylenglykol) enthalten. Das in diesem Fall verwendete PEG 3350 (Macrogol) besteht aus ca. 50 Ketten von Monomeren mit einer jeweiligen Masse von 60 Da. Es ist gut wasserlöslich und wird aufgrund seiner osmotischen Wirkungen als Abführmittel eingesetzt. Zudem findet es in der pharmazeutischen Industrie u.a. als Wirkstoffträger zur Verlängerung der Halbwertszeit einer Substanz im Blut sowie bei der Herstellung von Salbengrundlagen, Tabletten, Tropfen und Suppositorien eine breite Anwendung. PEG gilt chemisch als inert. Bei tierexperimentellen Studien mit Mäusen wurde wie bei anderen inerten Polymeren ein karzinogener Effekt gesehen (Boyland, Charles et al. 1961). Zu PEG 3350 liegen keine tierexperimentellen Studien zu Langzeittoxizität oder Kanzerogenität vor. In einem Modell, bei dem Meerschweinchen eine durch definierten Druck bedingte Rückenmarksschädigung zugefügt wurde, zeigte sich bei Injektion von PEG in den Läsionsbereich eine deutlich schnellere Wiederherstellung neuromuskulärer Funktionen, die von den Autoren durch die membranverbindenden Eigenschaften erklärt wurde (Borgens and Shi 2000).

II.7 Elektrophysiologische Grundlagen

II.7.1 Die Netzhaut – Anatomie und Funktion

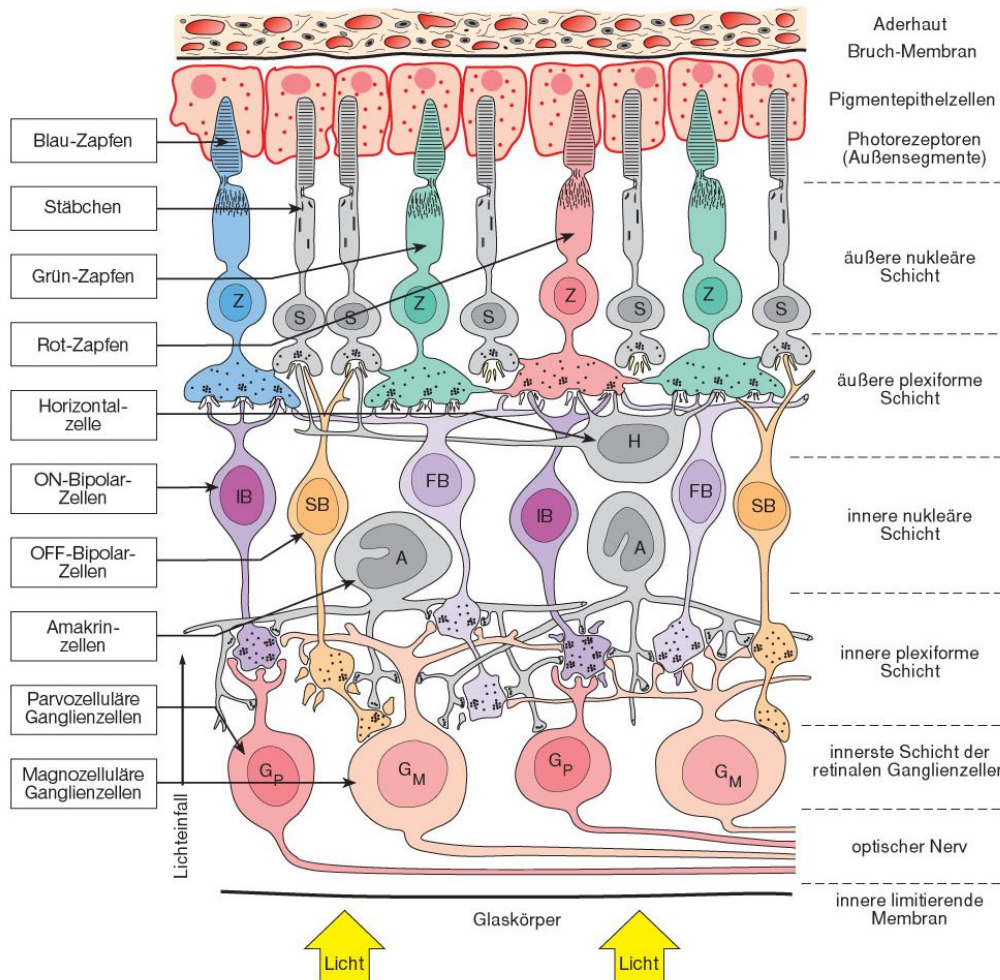


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Netzhaut. Modifiziert aus Deetjen, Speckmann, Hescheler (2005) Physiologie, 4. Auflage. München, Urban & Fischer Verlag.

Die Netzhaut als innerste Schicht des Auges liegt dem Pigmentepithel auf. Dieses gewährleistet eine Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen und phagozytiert ihre Außensegmente. Weiter nach innen schließen sich die Perikaryen der Stäbchen und Zapfen an, die zusammen die äußere Körnerschicht bilden. Es folgt die äußere plexiforme Schicht, in der die Fortsätze der Photorezeptoren mit den Horizontal- und Bipolarzellen verschaltet sind. Diese bilden mit den amakrinen Zellen und den

Perikarien der Müllerzellen die innere Körnerschicht. Die Müllerzellen haben dabei elektrophysiologische und lichtleitende Funktionen. Ähnlich eines Glasfaserkabels leiten sie Licht durch die verschiedenen Schichten bis zu den Photorezeptoren und vermindern so die Streuung, Lichtbrechung und Reflexion was die hohe Auflösung des Sehens erst ermöglicht (Franze, Grosche et al. 2007). Weiter Richtung Glaskörper schließt sich die innere plexiforme Schicht an, in der die Verschaltung mit den Ganglienzellen erfolgt. Die Axone der Ganglienzellen ergeben schließlich in ihrer Gesamtheit den Nervus opticus, der weiter als Sehstrahlung zur Sehrinde zieht.

Auf einen optischen Reiz, wie z.B. einen Lichtblitz, wird eine charakteristische Reiztransduktion ausgelöst. Trifft ein Photon auf ein Rhodopsinmolekül im Bereich der Stäbchenaußensegmente, wird dieses isomerisiert und bildet einen Komplex mit Transducin, einem GTP-bindenden Protein. Durch diesen Komplex wird eine inaktive Phosphodiesterase aktiviert, die cGMP zu GMP hydrolysiert. Natriumkanäle schließen sich und führen zu einer Hyperpolarisation. Dies stellt eine Besonderheit dar, da bei anderen neuronalen Mechanismen im Körper als Folge eines Reizes eine Depolarisation erfolgt. Über eine intrinsische GTPase-Aktivität des Transducins wandelt GTP in GDP um und führt wieder zu einer Erhöhung des cGMP-Spiegels im Zytoplasma. Die Kationenkanäle werden geöffnet und die Plasmamembran depolarisiert, was den Ruhezustand darstellt (Januschowski 2010).

II.7.2 Das Elektroretinogramm (ERG)

Die Erörterung des ERG im Zusammenhang mit dem Modell der isolierten und perfundierten Retina orientiert sich an der Vorarbeit von Januschowski (2010).

Im Jahre 1849 leitete Du Bois-Raymond am Bulbus eines enukleierten Fischeauges erstmalig ein Bestandpotential ab, indem er am vorderen und hinteren Pol Elektroden anbrachte (Du Bois-Raymond 1849). Nach Reizung durch Licht konnte Holmgren erstmals eine Bestandpotentialschwankung nachweisen, dies gilt als das erste abgeleitete ERG (Holmgren 1879). Durch die Entwicklung von Drehpuls messwerken konnten die Schwankungen genauer analysiert werden und man definierte charakteristische Wellen. Die initiale negative Potentialschwankung wurde als a-Welle bezeichnet, darauf folgte die positive b-Welle und eine langsame positive c-Welle.

Dabei wird die a-Welle als Summenäquivalent der Photorezeptorantwort gewertet. Wie oben beschrieben hyperpolarisieren diese auf einen Lichtreiz und es resultiert eine cornea-negative Potentialänderung (Jamison, Bush et al. 2001; Kang Derwent and Linsenmeier 2001). Die b-Welle wird als Ergebnis der Signaltransduktion des den Photorezeptoren nachgeschalteten neuronalen Netzwerkes interpretiert. Dabei scheinen depolarisierende Bipolarzellen wesentlich zur Entstehung der b-Welle beizutragen (Stockton and Slaughter 1989; Karwoski and Xu 1999). Es kommt es zu einem Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration in der inneren und äußeren plexiformen Schicht der Netzhaut. Diese Kaliumströme werden durch den Verlauf der Müllerzellen radiär ausgerichtet und sind als Feldpotentiale von der Cornea ableitbar (Deetjen 2005). Als Ursprung der c-Welle wird das retinale Pigmentepithel angenommen (Oakley and Green 1976; Deetjen 2005). Abbildung 2 zeigt das charakteristische Wellenbild eines ERG beim Menschen. Für die Versuche mit der isolierten perfundierten Retina wurden dunkeladaptierte Messungen durchgeführt, die auch als skotopisches ERG bezeichnet werden.

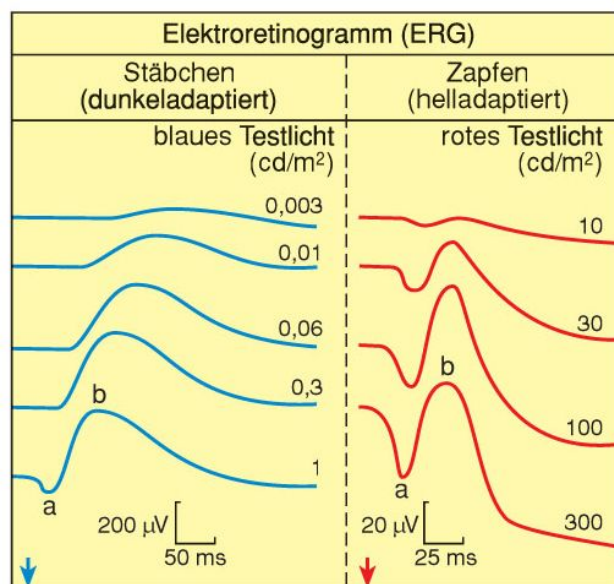


Abbildung 2: Darstellung eines ERG bei Dunkeladaption (links) und Helladaption (rechts). Dargestellt sind die a- und b-Welle. Der Pfeil kennzeichnet den Moment der Lichtreizung. Modifiziert aus Deetjen, Speckmann, Hescheler (2005) Physiologie, 4. Auflage. München, Urban & Fischer Verlag.

Schon 1946 konnte bei Retinitis pigmentosa, Gefäßerkrankungen etc. eine Veränderung des ERG erkannt und damit ein wertvolles Instrument für die Ophthalmologie eingeführt werden (Karpe 1946). Heute wird das ERG z.B. bei diversen degenerativen Netzhauterkrankungen zur Verlaufskontrolle und bei gutachterlichen Fragestellungen eingesetzt. Auch für das Monitoring bei retinotoxischen systemischen Therapien wie Chloroquin im Rahmen von Autoimmunerkrankungen (vor allem rheumatoide Arthritis und systemischer Lupus erythematodes) ist das ERG das sensitivste Verfahren zur Abbildung retinotoxischer Effekte (Missner and Kellner 2012).

II.7.3 Das ERG im Modell der isolierten perfundierten Retina

Die Methode der isolierten perfundierten Retina ermöglicht die Ableitung eines ERG von einer isolierten Netzhaut, die direkt *post mortem* entnommen wird. Damit lassen sich unter standardisierten Bedingungen Substanzen auf Toxizität prüfen. Die Methode hat sich in letzter Zeit als verlässliches Instrument für pharmakologische Prüfungen etabliert (Luke, Luke et al. 2005; Luke, Weiergraber et al. 2005; Luke, Januschowski et al. 2007; Luke, Januschowski et al. 2008; Luke, Januschowski et al. 2008; Luke, Januschowski et al. 2009; Luke, Januschowski et al. 2010; Luke, Januschowski et al. 2010).

Die Vorteile des Modells liegen u.a. in der Möglichkeit, den Ort der Schädigung einzugrenzen. Da die a-Welle die Antwort der Photorezeptoren darstellt und die b-Welle die Reizverarbeitung des nachgeschalteten neuronalen Netzwerks, kann durch getrennte Prüfung ein genauerer Bezug zum Wirkort einer Substanz hergestellt werden. Für die Ableitung einer a-Welle wird der Nährlösung Aspartat zugefügt. Es ist bekannt, dass damit die synaptische Übertragung von den Photorezeptoren zu den Horizontal- und Bipolarzellen blockiert und im ERG somit das reine Photorezeptorpotential sichtbar wird (Hanawa and Tateishi 1970). Ohne die pharmakologische Blockade der synaptischen Transmission wäre die a-Welle zu stark überlagert. Die Versuche werden unter skotopischen Bedingungen durchgeführt, da hier die b-Welle wesentlich besser erkennbar wird. Eine schwache Lichtreizung führt zu einer geringen Antwort der Photorezeptoren und einer im Verhältnis starken Signalverarbeitung der nachgeschalteten Neurone.

Bei einer Reduktion der a-Welle ist von einer funktionellen oder morphologischen Schädigung der Photorezeptoren auszugehen, die b-Welle ist dabei ebenfalls affektiert. Bei einem Rückgang der b-Wellen-Amplitude kann entweder eine funktionelle bzw. morphologische Schädigung nur der inneren Netzhautschichten eingetreten sein oder die Photorezeptoren sind ebenfalls betroffen.

Ein weiterer Vorteil der Methode liegt in der funktionellen Betrachtung der Netzhaut in ihrer natürlichen Struktur, ohne Aufhebung des Zellverbands, wie dies bei Zellkulturstudien der Fall ist. Die b-Welle ist zudem ein sehr sensitiver Messparameter. In Kapitel VI.1 sind beispielhaft zwei Originalaufzeichnungen einer a- und b-Welle dargestellt und beschrieben.

III Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Prüfung der retinalen Biokompatibilität von vier verschiedenen Farbstoffgemischen, die alle die Eigenschaft besitzen, innerhalb der Spülflüssigkeit auf die Netzhaut abzusinken. Unter Verwendung des Modells der isolierten perfundierten Retina sollen BBG Brilliant Peel® (Fluoron, Ulm, Deutschland) gemischt mit Glukose in verschiedenen Konzentrationen, BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® (Fluoron, Ulm, Deutschland), ILM-Blue® (BBG mit 4% Polyethylenglykol) und MembraneBlue-Dual® (Trypanblau und BBG mit 4% Polyethylenglykol) getestet werden. ILM-Blue® und MembraneBlue-Dual® stammen von D.O.R.C (Zuidland, Niederlande).

IV Material und Methodik

Die angewandte Methodik der isolierten und perfundierten Retina geht zurück auf die Arbeiten von Sickel und Lüke (Sickel 1966; Luke, Weiergraber et al. 2005).

IV.1 Gewinnung und Präparation der isolierten Retinae

In einem lokalen Schlachthof wurden Rinder mittels Bolzenschussgerät getötet. Vor der weiteren Fleischverarbeitung wurden innerhalb von einigen Minuten nach dem Tod des Tieres die Augen enukleiert. Noch am Schlachthof wurde unter Rotlicht die Präparation vorgenommen. Dazu wurde das periorbitale Fett- und Muskelgewebe entfernt und der N. opticus skleranah abgesetzt. Danach konnte der Vorderabschnitt des Bulbus in einem Präparationsblock durch einen zirkulären Schnitt um den Limbus zusammen mit dem Glaskörper entfernt werden. Der hintere Teil des Bulbus wurde mit anliegender Netzhaut anschließend in gekühlter, sauerstoffgesättigter Perfusionslösung in einem lichtundurchlässigen Glasgefäß zur weiteren Präparation ins Labor gebracht, der Transport dauerte ca. 30 Minuten. Im Labor wurde durch radiäre Schnitte eine Teilung in vier Quadranten vorgenommen, aus denen ich jeweils 1-2 Stenzen durch Netzhaut, Aderhaut und Sklera entnehmen konnte. Die Stenzen wurden in eine Petrischale mit sauerstoffgesättigter Perfusionslösung gelegt. In den meisten Fällen kam es nach wenigen Minuten bereits zu einer inkompletten Netzhautablösung vom retinalen Pigmentepithel (RPE). Durch vorsichtiges Abschieben der Netzhaut mittels Kolibri-Pinzette von der Seite des RPE konnte eine komplette Ablösung erfolgen. Eine Netzhautstanze wurde nun in die Perfusionskammer eingebaut. Da nach dem Ablösen im Randbereich der Stanze eine Wölbung/Einrollen in Richtung Glaskörperaum erfolgt, war ein Erkennen der Orientierung jederzeit gegeben. Die Netzhaut wurde nun rezeptorseitig auf das Trägernetz der Perfusionskammer gelegt und fixiert. Die Perfusionskammer wurde anschließend entlüftet und mit sauerstoffgesättigter, erwärmter Perfusionslösung gespült. Die restlichen Stenzen wurden bis zu ihrer Verwendung in lichtdichten Behältnissen bei ca. 7°C in sauerstoffgesättigter Perfusionslösung gelagert.

IV.2 Perfusionskammer

Für die Versuche wurde die nach Januschowski und Lüke modifizierte „Kammer nach Sickel“ verwendet.

Sie besteht aus zwei etwa 1 cm dicken Plexiglas-Blöcken, die über 4 Schrauben miteinander verbunden werden und in ihrer Mitte einen Kunststoffträger aufnehmen. Über Gummiringe wird ein wasserdichter Verschluss erreicht.

Der Kunststoffträger beinhaltet ein Kunststoffnetz, auf dem die isolierte Netzhautstanze mittels eines kleinen Gummiringes fixiert wird. Er verfügt weiterhin über einen Zu- und einen Ablauf. So wird eine konstante Umströmung des retinalen Gewebes gewährleistet. Auf der gegenüberliegenden Seite befinden sich Stecker, die mit im Kunststoffträger eingelassenen Silberdrahtelektroden verbunden sind. Auf einen Lichtblitz können die Photorezeptoren durch das Plexiglas stimuliert und die Reizantwort anhand einer Potentialdifferenz detektiert werden. Die Ableitung erfolgt dabei über die Perfusionslösung als elektrischen Leiter.

Die Modifikation der Kammer besteht in zwei Kanälen, die eine Applikation der Farbstoffe direkt epiretinal zulassen, sehr ähnlich zur klinischen Anwendung. Während der Perfusion werden diese durch Stöpsel verschlossen.

Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau der Kammer.

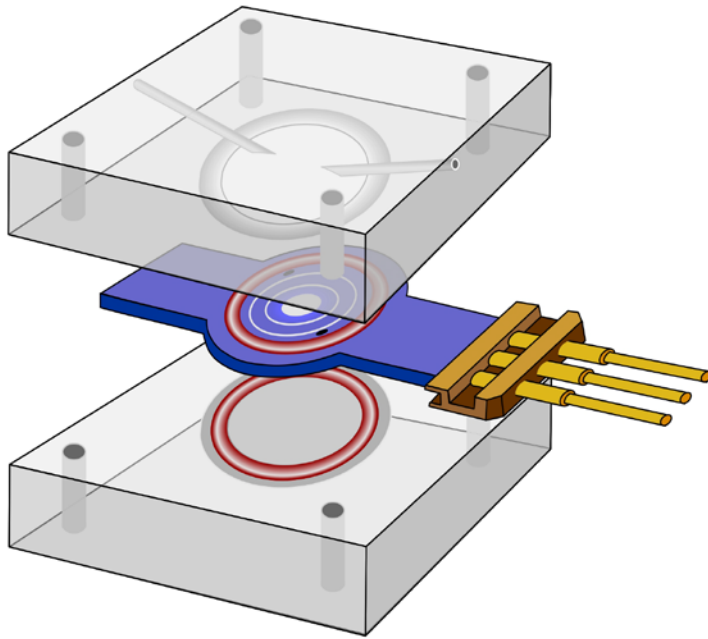


Abbildung 3: Von Januschowski und Lücke modifizierte „Kammer nach Sickel“. Die Modifikation besteht in zwei Kanälen, die mittels einer Kanüle die direkte epiretinale Applikation von Substanzen ermöglichen.

IV.3 Perfusionslösung

Die für die Experimente verwendete Perfusionslösung wird zum Transport, sowie zur Lagerung und Ernährung der isolierten Retinae benötigt. Sie enthält 120 mM NaCl; 2 mM KCl; 0,1 mM MgCl₂; 0,15 mM CaCl₂; 1,5 mM NaH₂PO₄; 13,5 mM Na₂HPO₄ und 5mM Glukose.

Die Ableitung einer b-Welle im ERG war am Schlachttag für mehr als 10 Stunden möglich. Durch Lagerung der isolierten Retinae über Nacht in auf ca. 7°C gekühlter Perfusionslösung war eine stabile Ableitung von a-Wellen über den gesamten nächsten Versuchstag möglich.

Die Zusammensetzung der Lösung wurde empirisch ermittelt, mit dem Ziel einer verlässlichen und langanhaltend stabilen ERG-Ableitung. Durch die hohe Stoffwechselaktivität des retinalen Gewebes ist ein Phosphatpuffersystem zur Pufferung der sauren Metabolite notwendig. Zusätzlich ist ein mechanischer Abtransport durch die konstante Umströmung der Netzhaut gewährleistet. Der pH-Wert der Lösung ist mit 7,8 zudem etwas alkalischer als der pH-Wert des Blutes (7,4), um genügend CO₂ gelöst zu halten. Die Ca²⁺-Konzentration ist geringer als die des Blutes. Dies ist ausreichend für

eine maximale b-Wellen-Amplitude und verhindert die Bildung von Kalziumphosphat-Präzipitaten.

Während des Versuchs wurde die Nährlösung mit 100% Sauerstoff über einen Aquariumstein begast. Dies ist notwendig, um eine b-Welle ableiten zu können (Januschowski 2010).

Zur Ableitung der A-Wellen wurde der Lösung 1 mM Aspartat hinzugefügt, was zur Supprimierung des höheren neuronalen Netzwerkes führt und somit die reine Photorezeptor-Antwort sichtbar macht.

Aspartat, Glukose und andere Chemikalien wurden von Merck (Merck Pharma, Darmstadt, Deutschland) in analysenreiner Qualität bezogen.

Die Herstellung der Nährlösungen erfolgte in der Universitäts-Apotheke Tübingen.

IV.4 Reizquelle

Die Stimulation der Retina wurde eine Xenonlampe verwendet (Xenon tube, Grass Technologies, West Warwick, USA). Diese gab einen einzelnen Lichtblitz von 10 μ s Dauer ab. Die Reizintensität war auf 6,3 mlx begrenzt, was durch einen Filter gewährleistet wurde (Wratten Filter; Kodak, Stuttgart, Germany).

IV.5 Farbstoffe

Es wurden insgesamt 4 Farbstoffe bzw. Farbstoffgemische getestet.

Das kommerziell erhältliche BBG Brilliant Peel® sowie BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® wurde von Fluoron (Ulm, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

0,4 ml BBG Brilliant Peel® wurde jeweils mit 0,05 ml, 0,1 ml oder 0,15 ml Glukose 40% gemischt. Dies entspricht Glukose-Konzentrationen von 4,4%, 8% und 10,9%.

Die Farbstoffgemische ILM-Blue® (BBG mit 4% Polyethylenglykol) und MembraneBlue-Dual® (Trypanblau und BBG mit 4% Polyethylenglykol) wurden von D.O.R.C. (Zuidland, Niederlande) bezogen.

IV.6 Osmolaritätsmessung

Die Messung der Osmolarität erfolgte mit dem Verfahren der kryoskopischen Osmometrie (OSMOMAT® 030 der Firma Gonotec®, Berlin).

IV.7 Versuchsaufbau

Die Netzhaut wurde auf dem Trägernetz des Kunststoffträgers fixiert, die Perfusionskammer entlüftet, die Applikationskanäle verschlossen und mithilfe einer nachgeschalteten Rollerpumpe („Peristaltic Pump P-1“ der Firma Pharmacia®) konstant mit einer Flussrate von 1 ml/min mit Nährlösung perfundiert. Über ein Wasserbad („LKB-Multi Temp II“ der Firma Pharmacia®) wurde die Perfusionslösung so erwärmt, dass in der Perfusionskammer eine Temperatur von 29–31 °C herrschte. Dabei floss die Nährlösung erst glaskörperseitig um die Retina um sie anschließend über einen Ablauf auch rezeptorseitig zu umströmen. Die Lösung wurde nach der Rollerpumpe in ein Abflussgefäß geleitet. Der Verstärker („Grass RPS312RM“; Grass, Warwick, USA) wurde konnektiert. Die Perfusionskammer wurde in eine optisch und elektrisch isolierte Box gestellt, die daraufhin lichtdicht verschlossen wurde. Oberhalb der Perfusionskammer befand sich ein Xenon-Blitz, der in Verbindung mit der Steuereinheit („Photopic Stimulator PS33 Plus“; Grass, Warwick, USA) einen Lichtblitz für die Dauer von 10 µs abgab. Die Stimulierung der Retina erfolgte im Abstand von 5 min. Das ERG wurde abgeleitet, gefiltert und verstärkt (100 Hz-Hochpassfilter, 50 Hz-Kerbfiler, 100.000x Verstärkung). Mit einem Analog/Digital-Wandler wurden die Daten prozessiert und ausgewertet („PCI-MIO-16XE-50“; National Instruments, Austin, USA). Die graphische Darstellung, Auswertung und Speicherung erfolgte mit der Software Labview® auf einem Desktop-Computer (PC-kompatibel).

Abbildung 4 zeigt den Versuchsaufbau schematisch.

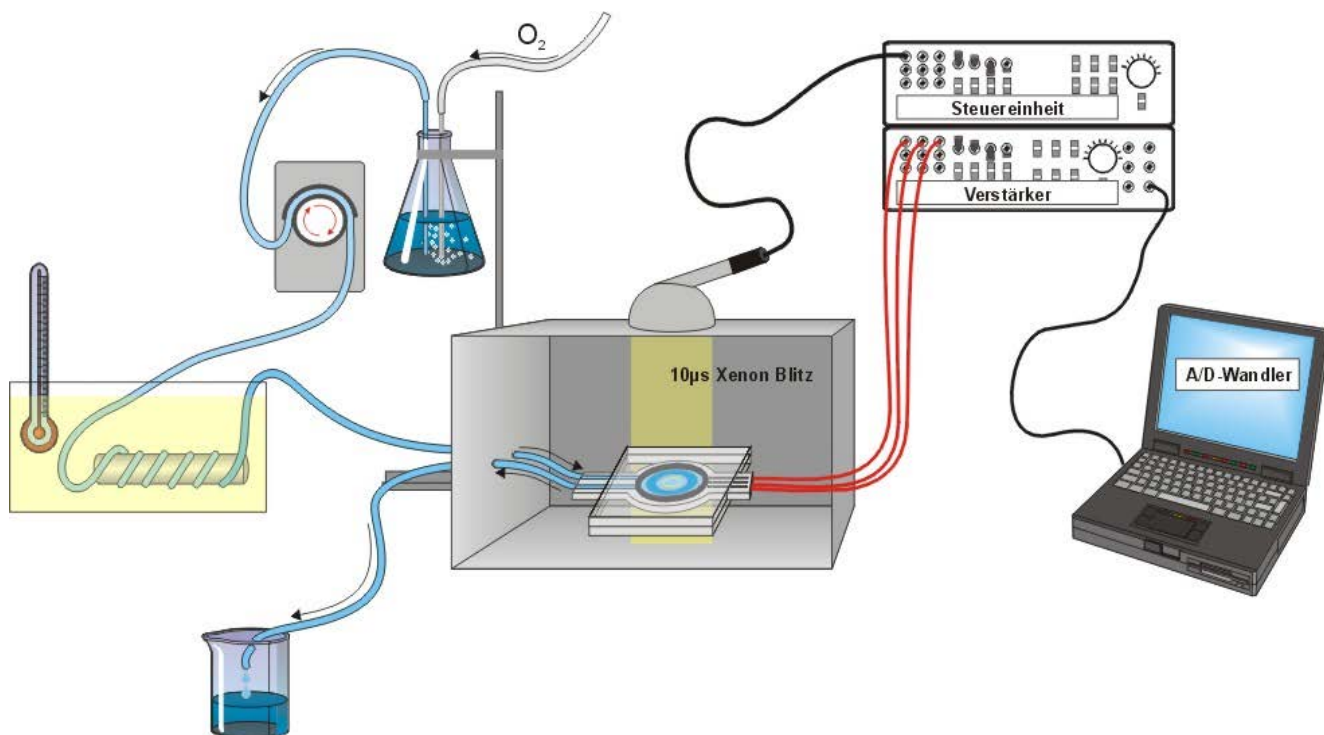


Abbildung 4: schematisierte Darstellung des Versuchsaufbaus

V Versuchsdurchführung

V.1 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Farbstoffen/Farbstoffgemischen auf die b-Welle

Konstante Parameter für alle Versuche waren eine Dauer des Lichtreizes von 10 μ s, ein Stimulationsintervall von 5 min und eine konstante Perfusion von 1 ml/min außerhalb der Expositionszeiten.

Die Gewinnung, Präparation und der Start des Systems erfolgten wie oben beschrieben. Anschließend wurde nach einer Einlaufphase von ca. 30 min im Abstand von 5 min jeweils eine Messung durchgeführt. Das Erreichen konstanter Antworten wurde definiert über eine maximale Amplitudendifferenz von 1 μ V zwischen den Einzelmessungen. Wurde dies über einen Zeitraum von 25 min (6 Messungen) erreicht, erfolgte die Applikation des Farbstoffes bzw. Farbstoffgemischs. Die Perfusion wurde vor Beginn der Applikation mittels Abschalten der Rollerpumpe und Stopp des Zulaufs mit einem Dreiweghahn unterbrochen. Anschließend wurden die Stöpsel der

Applikationskanäle entfernt und das Farbstoffgemisch in einer Insulinspritze über eine Kanüle direkt epiretinal appliziert. Direkt danach erfolgte der Verschluss der Applikationskanäle. Die Zeit wurde gestoppt und nach Ablauf der Expositionsdauer der Dreiwegehahn geöffnet um die Perfusion mit dem Start der Rollerpumpe fortzusetzen. Die Messungen wurden erneut im Abstand von 5 min nach Start der Perfusion vorgenommen. Die Auswaschphase des Farbstoffes wurde über einen Zeitraum von 75 min beobachtet, um gegebenenfalls reversible Effekte auf das ERG beobachten zu können.

V.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von Farbstoffen/Farbstoffgemischen auf die a-Welle

Der Perfusionslösung wurde aber 1 mM Aspartat zugefügt, um die b-Welle zu supprimieren. Danach wurde weiter verfahren wie unter V.1 beschrieben.

V.3 BBG Brilliant Peel® gemischt mit Glukose

In drei Versuchsreihen wurde 0,4 ml BBG Brilliant Peel® jeweils mit 0,05 ml, 0,1 ml oder 0,15 ml Glukose 40% gemischt. Dies entspricht Glukose-Konzentrationen von 4,4%, 8% und 10,9%. Das Gemisch wurde in einer Insulinspritze vor Beginn des Versuchs aufgezogen. Die Expositionszeit betrug für alle Konzentrationen 60 s.

V.3.1 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel® gemischt mit Glukose auf die b-Welle

Um die Wirkung von BBG Brilliant Peel® gemischt mit Glukose auf die b-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus V.1 angewendet.

V.3.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel® gemischt mit Glukose auf die a-Welle

Um die Wirkung von BBG Brilliant Peel® gemischt mit Glukose auf die a-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus V.2 angewendet.

V.4 BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxid)®

BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxid)® enthält 0,25 mg/ml BBG Brilliant Peel® und 13% Deuteriumoxid (D₂O). Es wurden Expositionszeiten von 10, 30, 60 und 120 s getestet.

V.4.1 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die b-Welle

Um die Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die b-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus V.1 angewendet.

V.4.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die a-Welle

Um die Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die a-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus V.2 angewendet.

V.5 Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf eine isolierte humane Retina

Eine 89-jährige Patientin wurde aufgrund einer neurotrophen Keratitis mit Hornhautulkus des rechten Auges stationär behandelt. Nach intensiver topischer Therapie sowie Amnionmembrandeckung verschlechterte sich der Befund weiter, sodass in Anbetracht des stark reduzierten Allgemeinzustands eine Enukleation erfolgen musste. Es lag zudem eine leichte Katarakt vor sowie eine zu 85% ulzerierte Hornhaut am Tag vor dem Eingriff. Ein schriftliches Einverständnis wurde 24 Stunden präoperativ eingeholt. Intraoperativ wurde das Auge meistens vor intensivem Lichteinfall geschützt. Direkt nach Absetzen des N. opticus und Unterbindung der A. ophthalmica wurde im benachbarten Labor die Präparation in gleicher Weise wie für die bovinen Retinae vorgenommen, wobei durch die kleinere Bulbusgröße hier nur 3 Netzhautstanzen entnommen werden konnten. Anschließend wurden die Versuche mit

einer Expositionsdauer von 60 s durchgeführt, weil dies am ehesten der klinischen Situation entspricht.

V.5.1 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die b-Welle einer humanen Retina

Um die Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die b-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus V.1 angewendet, mit Ausnahme der Gewinnung, die unter V.5 beschrieben ist.

V.5.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die a-Welle einer humanen Retina

Um die Wirkung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf die a-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus V.2 angewendet, mit Ausnahme der Gewinnung, die unter V.5 beschrieben ist.

V.6 ILM-Blue® und MembraneBlue-Dual®

Für ILM-Blue® und MembraneBlue-Dual® wurden jeweils Expositionszeiten von 30 s, 60 s und 120 s getestet.

V.6.1 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von ILM-Blue® und MembraneBlue-Dual® auf die b-Welle

Um die Wirkung von ILM-Blue® und MembraneBlue-Dual® auf die b-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus V.1 angewendet.

V.6.2 Das Versuchsprotokoll zur Beurteilung der Wirkung von ILM-Blue® und MembraneBlue-Dual® auf die a-Welle

Um die Wirkung von ILM-Blue® und MembraneBlue-Dual® auf die a-Welle zu beurteilen, wurde das Versuchsprotokoll aus V.2 angewendet.

VI Auswertung

VI.1 Auswertung der Elektroretinogramme

Die graphische Darstellung der ERG's erfolgte mittels der Software Labview®. Die Messung der Amplitude und Latenz wurde manuell über einen Cursor vorgenommen. Die Amplitude der a-Welle als Antwort der Photorezeptoren wurde von der Baseline bis zum ersten lokalen Minimum gemessen. Die b-Welle wurde vom ersten lokalen Minimum bis zum ersten lokalen Maximum vermessen. Bei allen Versuchen wurde auch die Latenz gemessen, also die Zeit von der Auslösung des Blitzes bis zum Erreichen des ersten lokalen Minimums im Falle der a-Welle bzw. des ersten lokalen Maximums im Falle der b-Welle.

Abbildung 5 zeigt die Messung einer a-Welle in Labview®.

Abbildung 6 zeigt die Messung einer b-Welle in Labview®.

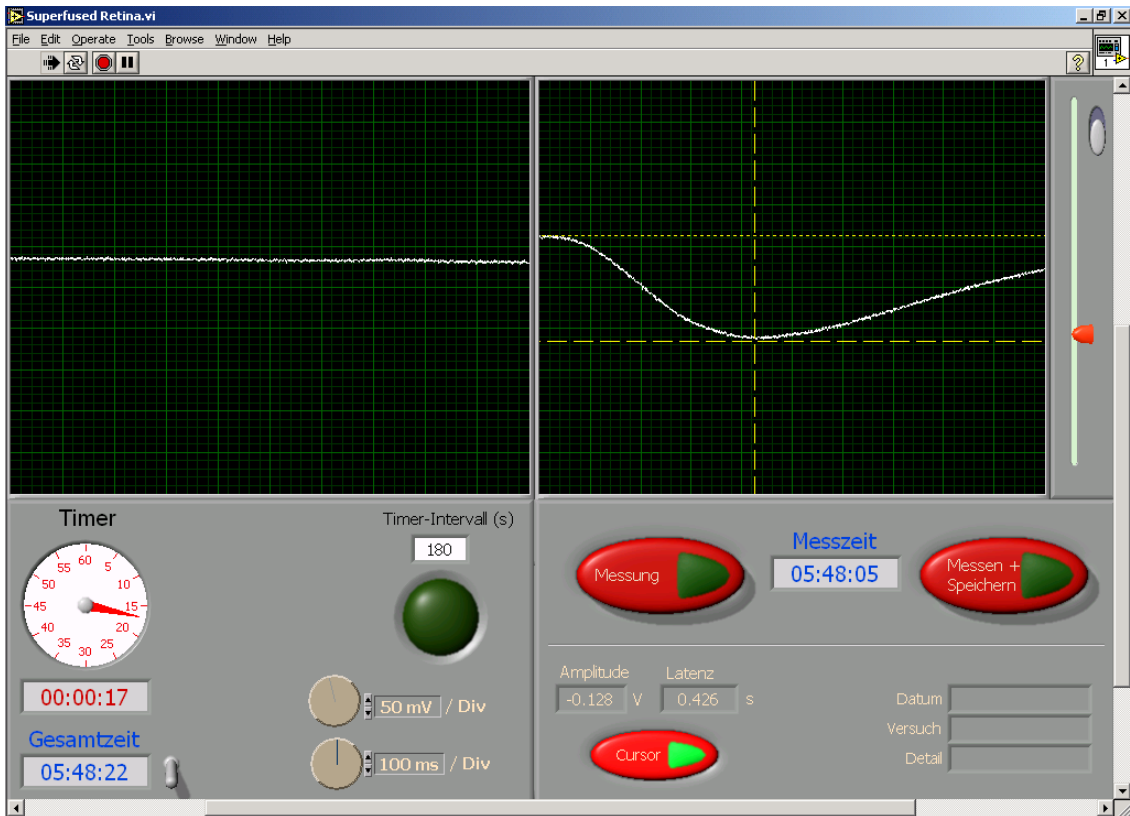


Abbildung 5: Messung einer a-Welle in Labview®. Eine Stoppuhr („Timer“) gibt den zeitlichen Abstand zur letzten Messung an. Unter „Gesamtzeit“ wird die Zeit seit dem Start der Software angeführt. Mittels zweier virtueller Drehknöpfe kann die horizontale und vertikale Skalierung in Millivolt (mV) und Millisekunden (ms) eingestellt werden. Dabei wird die Amplitude der Potentialschwankung in mV auf der y-Achse und die Latenz in ms auf der x-Achse gemessen. Ein Klick auf Messung löst das Blitzlicht aus und stellt die Potentialschwankung im rechten Fenster dar. Im linken Fenster ist ständig das aktuelle Signal sichtbar. Mittels eines Cursors wird die Amplitude und die Latenz gemessen.

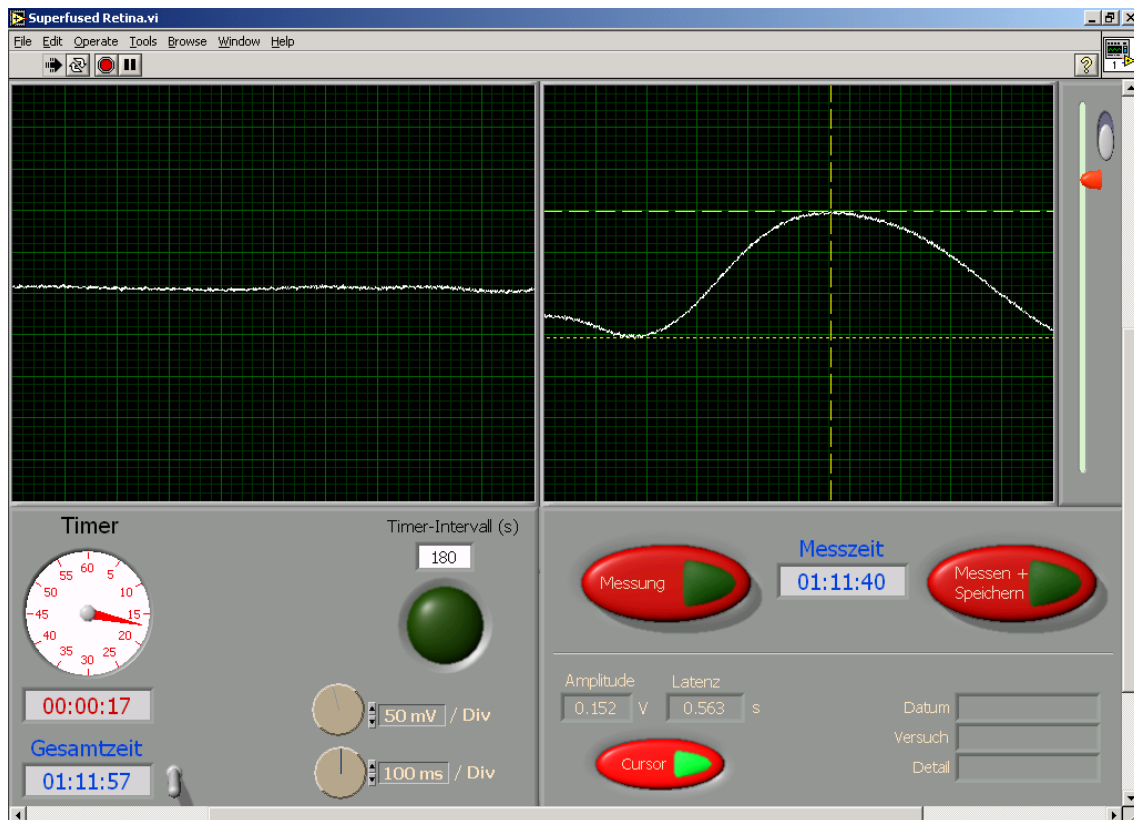


Abbildung 6: Messung einer b-Welle in Labview®. Eine Stoppuhr („Timer“) gibt den zeitlichen Abstand zur letzten Messung an. Unter „Gesamtzeit“ wird die Zeit seit dem Start der Software angeführt. Mittels zweier virtueller Drehknöpfe kann die horizontale und vertikale Skalierung in Millivolt (mV) und Millisekunden (ms) eingestellt werden. Dabei wird die Amplitude der Potentialschwankung in mV auf der y-Achse und die Latenz in ms auf der x-Achse gemessen. Ein Klick auf Messung löst das Blitzlicht aus und stellt die Potentialschwankung im rechten Fenster dar. Im linken Fenster ist ständig das aktuelle Signal sichtbar. Mittels eines Cursors wird die Amplitude und die Latenz gemessen.

VI.2 Darstellung der Ergebnisse

Für jeweils eine Fragestellung wurden, bis auf die Versuche mit der humanen Retina, fünf Messreihen durchgeführt. Eine Normalverteilung der Daten wurde vorausgesetzt. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Mittelwertskurven des Amplitudenverlaufs über die Zeit gebildet, um den Verlauf vor und nach Exposition beurteilen zu können. Die prozentuale Änderung Amplitudenhöhe direkt nach Exposition sowie am Ende der Messreihe wurde errechnet. Die Änderung ist dabei jeweils bezogen auf den letzten Messwert vor Applikation des Farbstoffes. Zur Berechnung der Standardabweichung und Reduktion der Amplitudenhöhe wurde die Datenverarbeitungssoftware „Origin 6.0“ (Microcal, Northampton, USA) verwendet. Die Signifikanz wurde mit dem gepaarten t-Test errechnet, wobei $p \leq 0,05$ als signifikant definiert wurde.

VII Ergebnisse

Eine Konstanz der Versuchsbedingungen wie Sauerstoffpartialdruck, osmotischer Druck und Temperatur der Perfusionslösung war über die Dauer des Versuchs gegeben. Eine Stabilität der Ableitung für mindestens zehn Stunden konnte aufgrund der Vorarbeiten angenommen werden (Luke, Weiergraber et al. 2005).

VII.1 BBG Brilliant Peel® gemischt mit Glukose

VII.1.1 Auswirkungen auf die b-Welle

Nach Applikation des Gemischs aus 0,4 ml BBG und 0,05 ml Glukose 40% trat ein initialer Anstieg der b-Wellen Amplitude von 2% auf, der nicht signifikant war ($p>0,05$; Abbildung 7a). Am Ende der Auswaschphase wurde ein nicht signifikanter Abfall von 11% ($p>0,05$) aufgezeichnet.

Bei Verwendung von 0,4 ml BBG und 0,1 ml Glukose 40% trat ein initialer Abfall um 19% ($p>0,05$; Abbildung 7b) auf, der statistisch nicht signifikant war. Darauf folgte ein signifikanter Rückgang der Amplitude um 23% ($p=0,0039$).

Nach der Applikation von 0,4 ml BBG und 0,15 ml Glukose 40% trat ein nicht signifikanter initialer Anstieg von 14% ($p>0,05$) auf. Nach 75 min Auswaschphase verzeichneten wir einen signifikanten Abfall um 26% ($p=0,0039$; Abbildung 7c).

Tabelle 1 zeigt die Mittelwerte der b-Wellen-Amplitude über die Zeit.

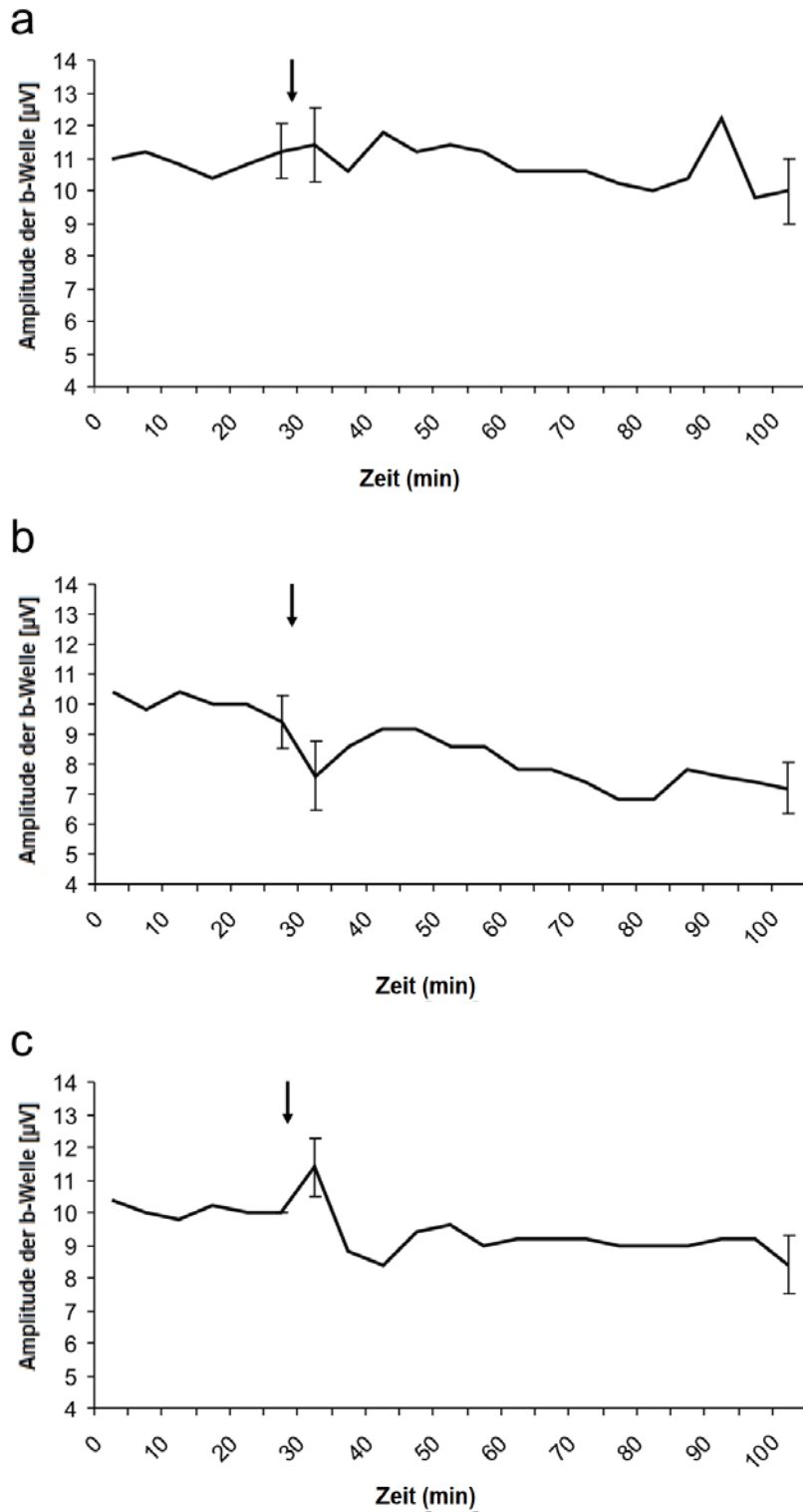


Abbildung 7: Der Verlauf der b-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug für alle Konzentrationen 60 s. a: BBG gemischt mit Glukose entsprechend einer Konzentration von 4,4%. b: BBG gemischt mit Glukose entsprechend einer Konzentration von 8%. c: BBG gemischt mit Glukose entsprechend einer Konzentration von 10,9%.

Zeit [min]	0,4 ml BBG/0,05 ml		0,4 ml BBG/0,1 ml		0,4 ml BBG/0,15 ml	
	Glukose 40%		Glukose 40%		Glukose 40%	
	Mittelwert der b-Wellen Amplitude [μ V]	SD [μ V]	Mittelwert der b-Wellen Amplitude [μ V]	SD [μ V]	Mittelwert der b-Wellen Amplitude [μ V]	SD [μ V]
0	11	0,00	10,4	0,55	10,4	1,14
5	11,2	0,45	9,8	0,45	10	0,71
10	10,8	0,84	10,4	0,55	9,8	0,84
15	10,4	0,55	10	0,71	10,2	0,45
20	10,8	0,84	10	0,71	10	0,71
25	11,2	0,84	9,4	0,89	10	0,00
30	11,4	1,14	7,6	1,14	11,4	0,89
35	10,6	0,55	8,6	0,89	8,8	2,17
40	11,8	0,84	9,2	1,79	8,4	1,34
45	11,2	1,10	9,2	1,92	9,4	0,55
50	11,4	1,34	8,6	1,95	9,6	1,82
55	11,2	1,30	8,6	2,07	9	2,00
60	10,6	0,89	7,8	0,84	9,2	2,17
65	10,6	0,89	7,8	1,30	9,2	1,64
70	10,6	0,89	7,4	0,89	9,2	1,30
75	10,2	1,10	6,8	1,10	9	1,41
80	10	0,71	6,8	1,10	9	1,41
85	10,4	0,89	7,8	1,48	9	1,87
90	12,2	3,90	7,6	1,52	9,2	1,64
95	9,8	1,64	7,4	1,14	9,2	1,30
100	10	1,00	7,2	0,84	8,4	0,89

Tabelle 1: Darstellung der Mittelwerte der b-Wellen Amplitude über die Zeit. Die Exposition erfolgte nach 25 min. Unter SD ist die Standardabweichung angegeben.

VII.1.2 Auswirkungen auf die a-Welle

Bei einer Mischung von 0,4 ml BBG und 0,05 ml Glukose 40% zeigte das Photorezeptorpotential einen nicht signifikanten Rückgang um 24% ($p>0,05$; Abbildung 8a). Am Ende der Auswaschphase wurde eine Abnahme der Amplitude um 2% gemessen, die nicht signifikant war ($p>0,05$).

Während der Färbung mit 0,4 ml BBG und 0,1 ml Glukose 40% kam es zu einem initialen Anstieg von 22% ($p>0,05$; Abbildung 8b), gefolgt von einem nicht signifikanten Abfall um 4% ($p>0,05$).

Bei Mischung von 0,4 ml BBG und 0,15 ml Glukose 40% verzeichneten wir einen initial signifikanten Anstieg der Amplitude um 70% ($p=0,0022$), gefolgt von einer Reduktion um 8%, die keine statistische Signifikanz hatte ($p>0,05$; Abbildung 8c).

Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte der a-Wellen-Amplitude über die Zeit.

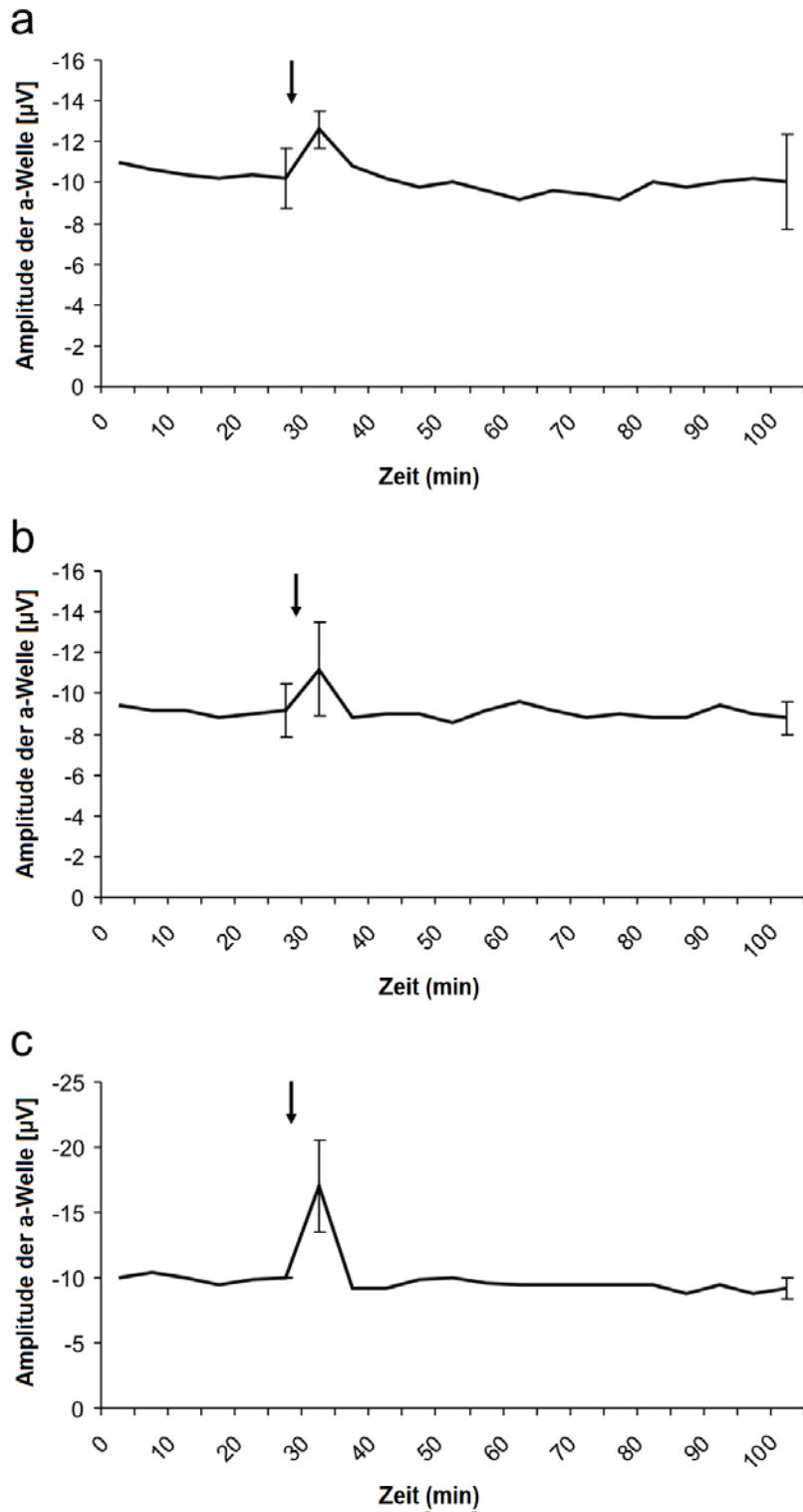


Abbildung 8: Der Verlauf der a-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug für alle Konzentrationen 60 s. a: BBG gemischt mit Glukose entsprechend einer Konzentration von 4,4%. b: BBG gemischt mit Glukose entsprechend einer Konzentration von 8%. c: BBG gemischt mit Glukose entsprechend einer Konzentration von 10,9%.

Zeit [min]	0,4 ml BBG/0,05 ml		0,4 ml BBG/0,1 ml		0,4 ml BBG/0,15 ml	
	Glukose 40%		Glukose 40%		Glukose 40%	
	Mittelwert der a-Wellen	SD	Mittelwert der a-Wellen	SD	Mittelwert der a-Wellen	SD
	Amplitude [μV]	[μV]	Amplitude [μV]	[μV]	Amplitude [μV]	[μV]
0	-11	0,00	-9,4	0,55	-10	1,00
5	-10,6	0,55	-9,2	0,45	-10,4	1,14
10	-10,4	0,55	-9,2	0,84	-10	1,22
15	-10,2	1,30	-8,8	1,10	-9,4	1,14
20	-10,4	1,52	-9	1,00	-9,8	1,10
25	-10,2	1,48	-9,2	1,30	-10	0,00
30	-12,6	0,89	-11,2	2,28	-17	3,54
35	-10,8	1,64	-8,8	1,30	-9,2	1,48
40	-10,2	1,64	-9	1,58	-9,2	0,45
45	-9,8	1,79	-9	1,00	-9,8	0,45
50	-10	1,87	-8,6	0,55	-10	1,58
55	-9,6	2,07	-9,2	0,84	-9,6	2,07
60	-9,2	1,64	-9,6	0,55	-9,4	1,14
65	-9,6	1,67	-9,2	1,10	-9,4	0,55
70	-9,4	1,34	-8,8	0,84	-9,4	0,55
75	-9,2	1,64	-9	0,00	-9,4	1,14
80	-10	2,00	-8,8	0,45	-9,4	1,52
85	-9,8	1,79	-8,8	1,10	-8,8	1,10
90	-10	2,55	-9,4	0,55	-9,4	1,14
95	-10,2	1,79	-9	0,71	-8,8	1,10
100	-10	2,35	-8,8	0,84	-9,2	0,84

Tabelle 2: Darstellung der Mittelwerte der a-Wellen Amplitude über die Zeit. Die Exposition erfolgte nach 25 min. Unter SD ist die Standardabweichung angegeben.

VII.1.3 Osmolarität der Gemische

Osmolaritätsmessungen ergaben für 0,4 ml BBG gemischt mit 0,05 ml Glukose 40% 537 mOsm/l (SD 19 mOsm/l), für 0,4 ml BBG gemischt mit 0,1 ml Glukose 40% 620 mOsm/l (SD 28 mOsm/l) und für 0,4 ml BBG gemischt mit 0,15 ml Glukose 40% 787 mOsm/l (SD 19 mOsm/l).

VII.2 BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)®

VII.2.1 Auswirkungen auf die b-Welle

Bei einer Expositionszeit von 10 s trat unmittelbar nach Start der Perfusion ein Anstieg der Amplitude um 36% auf, gefolgt von einer leichten Abnahme um 2%. Beide waren nicht signifikant ($p > 0,05$; Abbildung 9).

Nach 30 s Anfärbung konnten wir einen initialen Anstieg um 20% verzeichnen ($p > 0,05$). Am Ende der Auswaschphase wurde ein nicht-signifikanter Abfall um 5% gemessen ($p > 0,05$; Abbildung 10).

Nach 60 s Exposition trat nach dem Start der Perfusion eine unmittelbare nicht signifikante Reduktion der Amplitude um 16% ($p > 0,05$) auf, gefolgt von einem leichten Rückgang um 12% ($p > 0,05$; Abbildung 11).

Nach der längsten Expositionszeit von 120 s wurde ein sofortiger Abfall von 2% ($p > 0,05$) verzeichnet, am Ende der Auswaschphase ein Anstieg um 13%, beide nicht signifikant ($p > 0,05$; Abbildung 12).

Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte der b-Wellen-Amplitude über die Zeit.

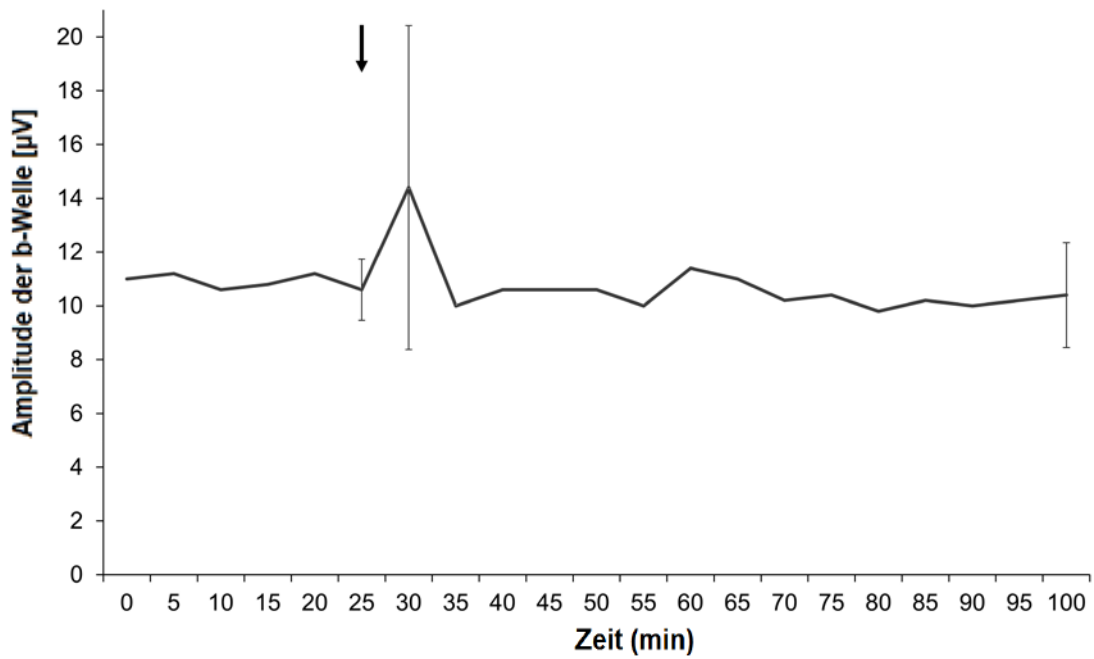


Abbildung 9: Der Verlauf der b-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 10 s.

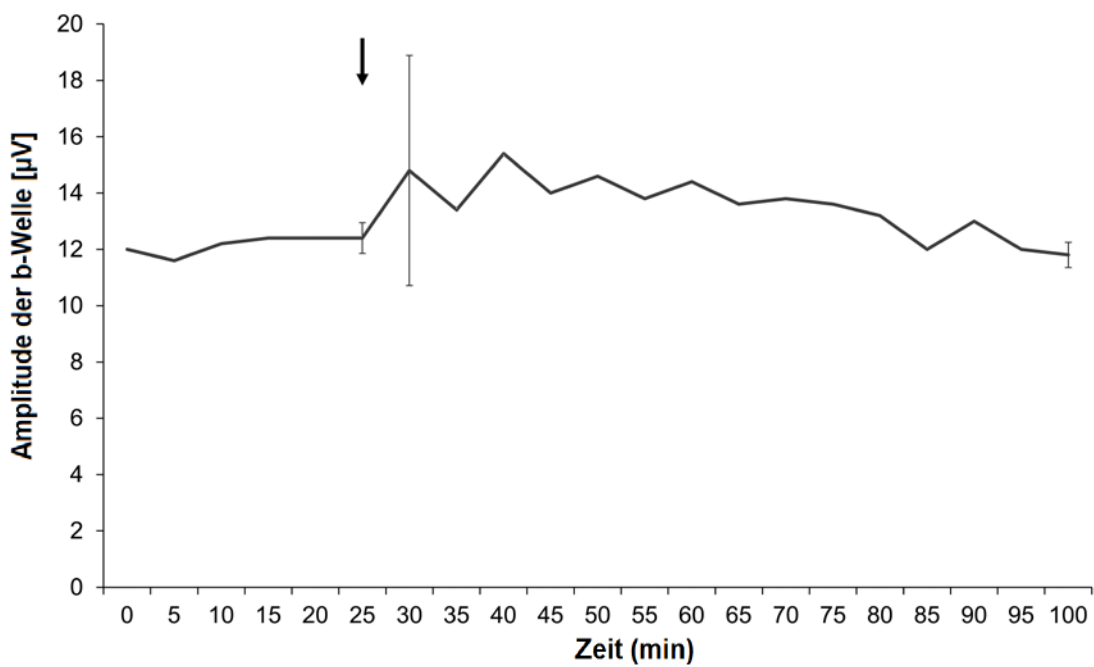


Abbildung 10: Der Verlauf der b-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 30 s.

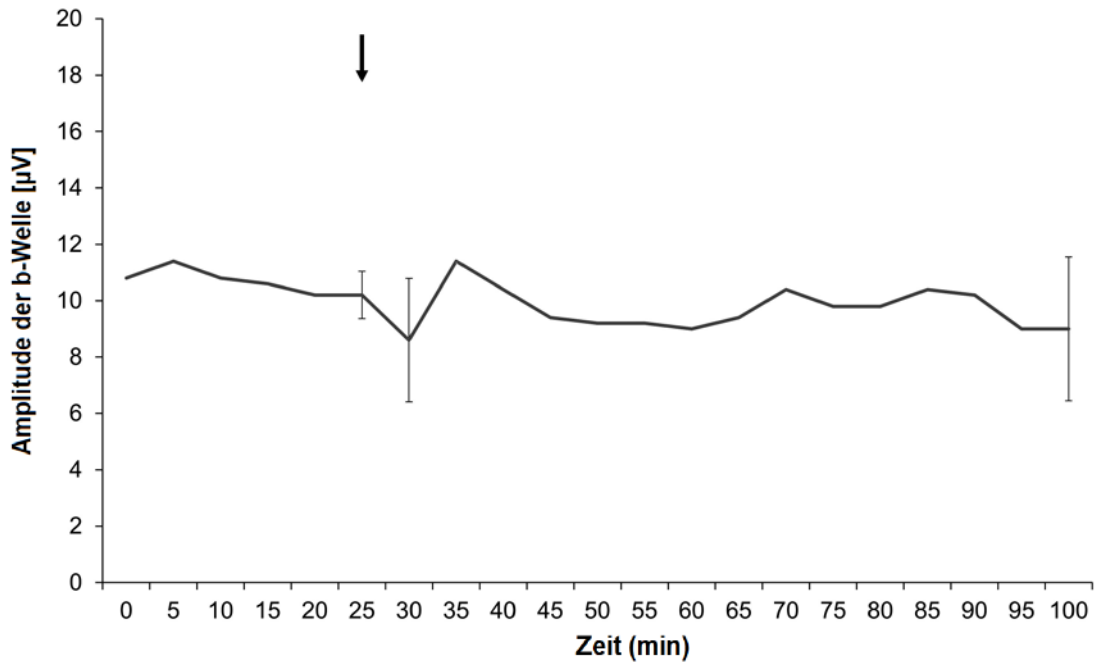


Abbildung 11: Der Verlauf der b-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 60 s.

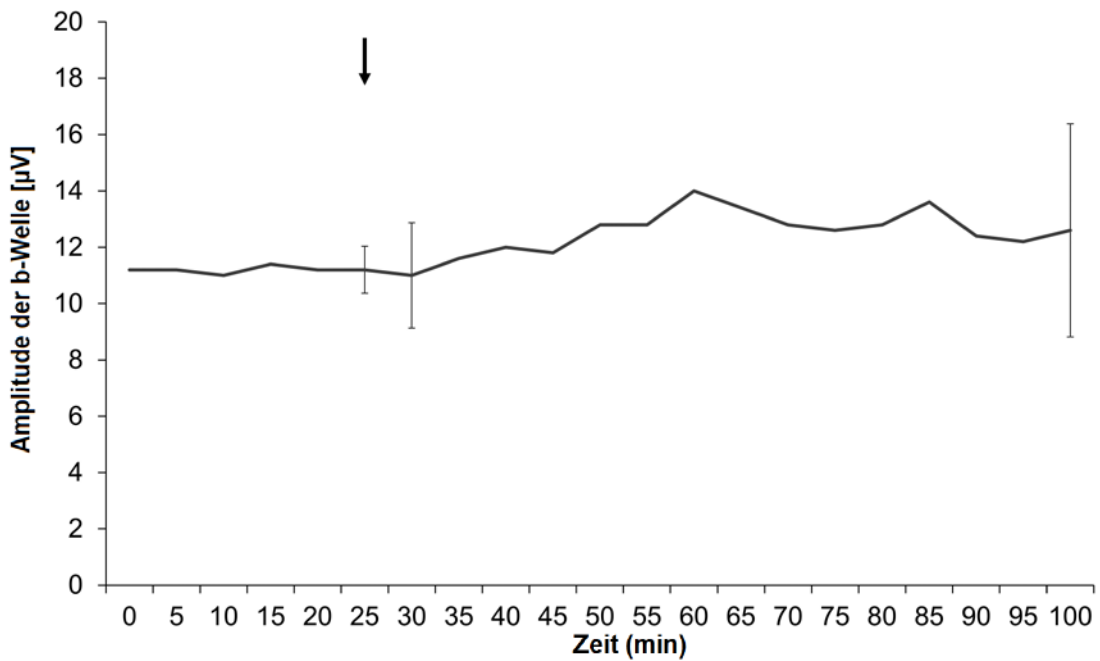


Abbildung 12: Der Verlauf der b-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 120 s.

	BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxid)®		BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxid)®		BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxid)®		BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxid)®	
	10 s		30 s		60 s		120 s	
Zeit [min]	Mittelwert der b-Wellen- Amplitude	SD [µV]	Mittelwert der b-Wellen- Amplitude	SD [µV]	Mittelwert der b-Wellen- Amplitude	SD [µV]	Mittelwert der b-Wellen- Amplitude	SD [µV]
0	11,0	1,22	12,0	1,00	10,8	1,48	11,2	1,10
5	11,2	1,30	11,6	0,89	11,4	1,34	11,2	1,48
10	10,6	0,89	12,2	0,45	10,8	0,84	11,0	1,58
15	10,8	1,10	12,4	1,14	10,6	1,14	11,4	1,14
20	11,2	1,30	12,4	1,14	10,2	1,10	11,2	1,30
25	10,6	1,14	12,4	0,55	10,2	0,84	11,2	0,84
30	14,4	6,02	14,8	4,09	8,6	2,19	11,0	1,87
35	10,0	2,24	13,4	0,55	11,4	5,03	11,6	2,30
40	10,6	1,95	15,4	2,41	10,4	3,85	12,0	1,87
45	10,6	1,82	14,0	0,00	9,4	0,55	11,8	0,84
50	10,6	2,30	14,6	1,34	9,2	1,10	12,8	2,39
55	10,0	2,45	13,8	1,30	9,2	1,48	12,8	2,49
60	11,4	2,41	14,4	1,67	9,0	1,73	14,0	1,87
65	11,0	2,45	13,6	1,67	9,4	1,82	13,4	2,19
70	10,2	2,17	13,8	2,49	10,4	3,44	12,8	2,59
75	10,4	2,41	13,6	1,95	9,8	3,42	12,6	2,61
80	9,8	1,79	13,2	0,84	9,8	3,77	12,8	2,17
85	10,2	1,30	12,0	1,00	10,4	4,16	13,6	3,29
90	10,0	1,87	13,0	1,87	10,2	4,15	12,4	3,44
95	10,2	1,92	12,0	1,00	9,0	2,24	12,2	2,39
100	10,4	1,95	11,8	0,45	9,0	2,55	12,6	3,78

Tabelle 3: Darstellung der Mittelwerte der b-Wellen Amplitude über die Zeit. Die Exposition erfolgte nach 25 min. Unter SD ist die Standardabweichung angegeben.

VII.2.2 Auswirkungen auf die a-Welle

Bei einer Expositionszeit von 10 Sekunden wurde ein Anstieg der Amplitude von 19% ($p>0,05$) nach der Applikation verzeichnet, am Ende der Auswaschphase ein nicht signifikanter Rückgang von 12% ($p>0,05$; Abbildung 13).

Nach 30 s trat ein initialer Abfall von 4% auf, der nicht statistisch signifikant war ($p>0,05$). Am Ende der Auswaschphase war keine Veränderung zu verzeichnen ($p>0,05$; Abbildung 14).

Bei einer Expositionszeit von 60 s trat am Ende der Auswaschphase eine leichte Zunahme von 2% auf ($p>0,05$; Abbildung 15).

Ein initialer Anstieg von 2% ($p>0,05$) trat bei einer Expositionszeit von 120 s auf, gefolgt von einer Abnahme von 4% ($p>0,05$; Abbildung 16), beide nicht signifikant.

Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte der a-Wellen-Amplitude über die Zeit.

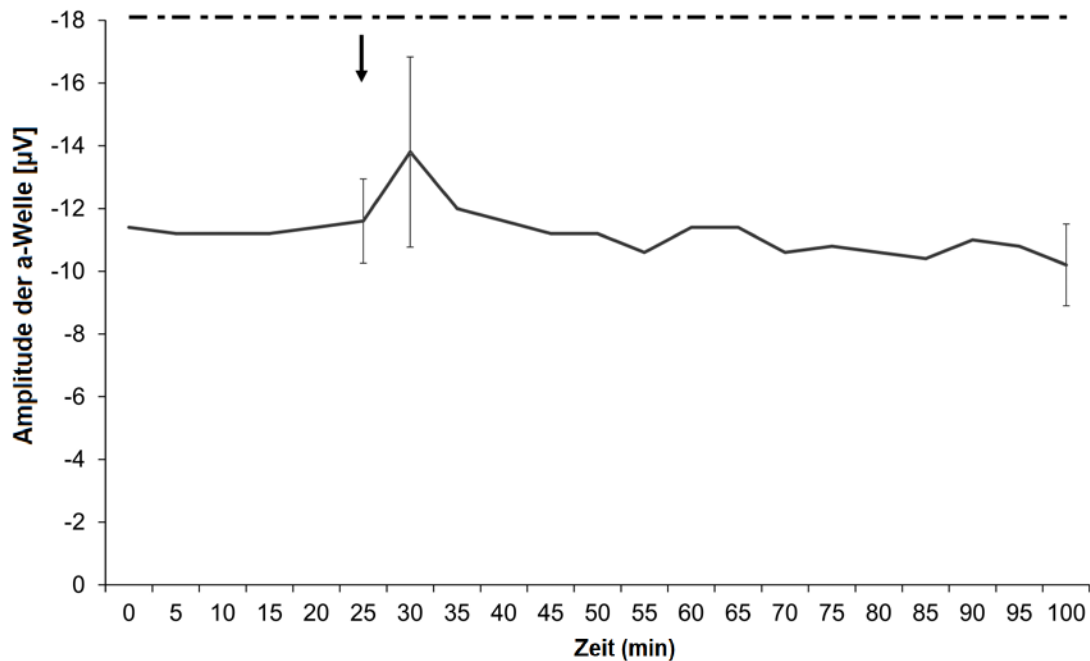


Abbildung 13: Der Verlauf der a-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 10 s. Die gestrichelte horizontale Linie stellt den Zusatz von 1mM Aspartat in der Perfusionslösung dar.

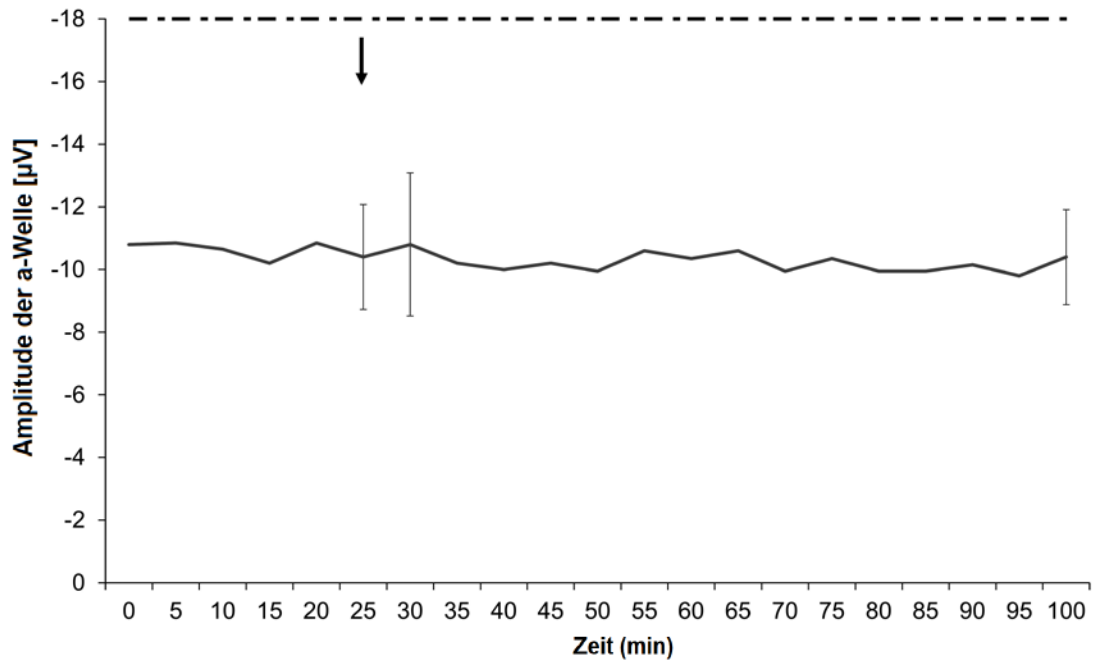


Abbildung 14: Der Verlauf der a-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 30 s. Die gestrichelte horizontale Linie stellt den Zusatz von 1mM Aspartat in der Perfusionslösung dar.

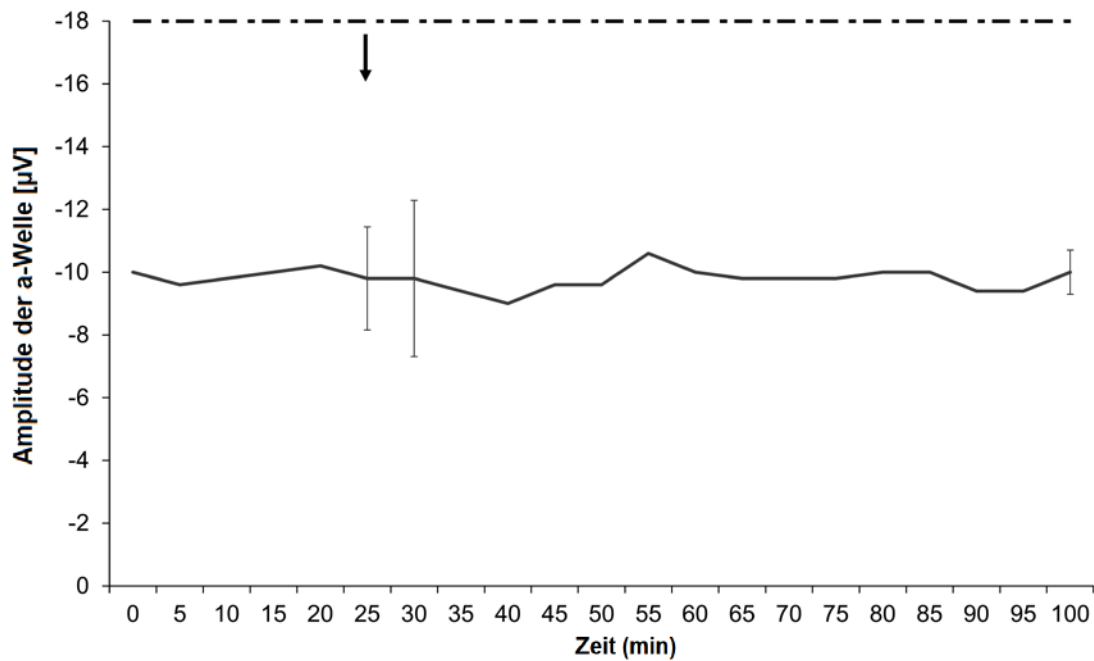


Abbildung 15: Der Verlauf der a-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 60 s. Die gestrichelte horizontale Linie stellt den Zusatz von 1mM Aspartat in der Perfusionslösung dar.

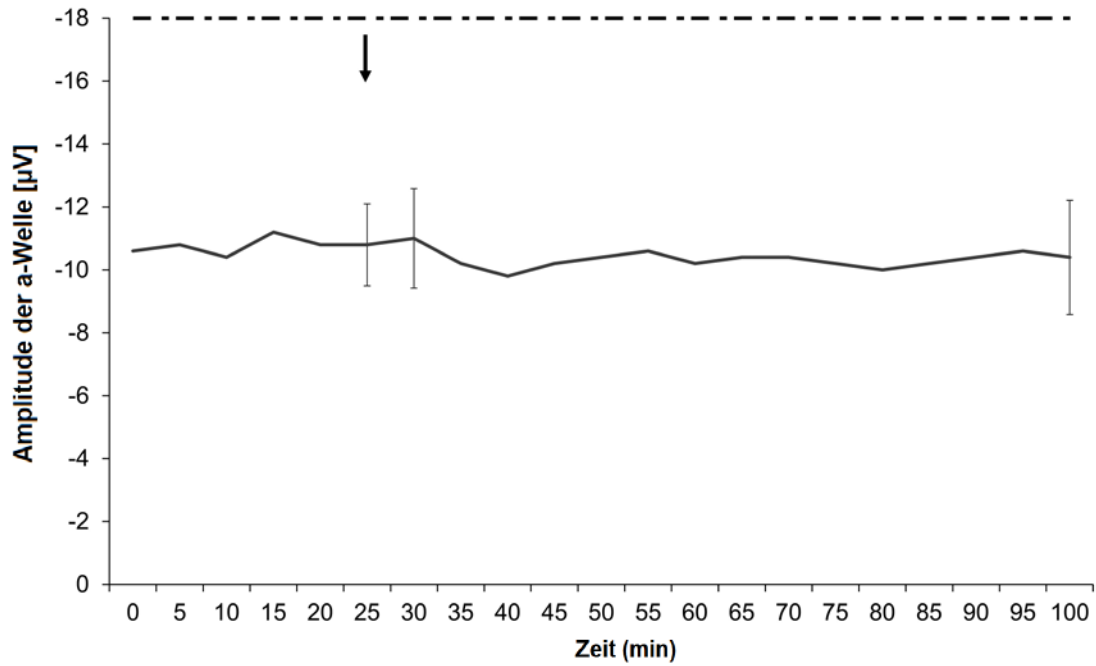


Abbildung 16: Der Verlauf der a-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 120 s. Die gestrichelte horizontale Linie stellt den Zusatz von 1mM Aspartat in der Perfusionslösung dar.

	BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)®		BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)®		BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)®		BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)®	
	10 s		30 s		60 s		120 s	
Zeit [min]	Mittelwert der a-Wellen- Amplitude	SD [µV]	Mittelwert der a-Wellen- Amplitude	SD [µV]	Mittelwert der a-Wellen- Amplitude	SD [µV]	Mittelwert der a-Wellen- Amplitude	SD [µV]
0	-11,4	1,34	-10,8	0,84	-10,0	0,84	-10,6	1,52
5	-11,2	1,30	-10,9	0,86	-9,6	1,95	-10,8	1,64
10	-11,2	1,64	-10,7	1,17	-9,8	1,79	-10,4	2,07
15	-11,2	1,30	-10,2	1,10	-10,0	2,12	-11,2	1,64
20	-11,4	1,14	-10,9	0,86	-10,2	1,48	-10,8	1,30
25	-11,6	1,34	-10,4	1,67	-9,8	1,64	-10,8	1,30
30	-13,8	3,03	-10,8	2,28	-9,8	2,49	-11,0	1,58
35	-12,0	2,92	-10,2	1,48	-9,4	1,14	-10,2	0,84
40	-11,6	2,70	-10,0	1,87	-9,0	2,24	-9,8	1,92
45	-11,2	1,30	-10,2	1,48	-9,6	1,67	-10,2	1,64
50	-11,2	1,30	-10,0	1,91	-9,6	2,41	-10,4	1,34
55	-10,6	1,82	-10,6	0,89	-10,6	1,52	-10,6	1,14
60	-11,4	1,67	-10,4	1,87	-10,0	1,41	-10,2	2,05
65	-11,4	2,07	-10,6	1,14	-9,8	1,48	-10,4	1,82
70	-10,6	1,34	-10,0	1,62	-9,8	1,64	-10,4	1,82
75	-10,8	1,30	-10,4	1,87	-9,8	1,10	-10,2	1,64
80	-10,6	1,14	-10,0	1,91	-10,0	1,22	-10,0	1,41
85	-10,4	1,14	-10,0	1,46	-10,0	0,71	-10,2	1,79
90	-11,0	1,87	-10,2	1,69	-9,4	0,89	-10,4	2,30
95	-10,8	1,64	-9,8	1,92	-9,4	1,34	-10,6	1,52
100	-10,2	1,30	-10,4	1,52	-10,0	0,71	-10,4	1,82

Tabelle 4: Darstellung der Mittelwerte der a-Wellen Amplitude über die Zeit. Die Exposition erfolgte nach 25 min. Unter SD ist die Standardabweichung angegeben.

VII.2.3 Testung von BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)® auf einer humanen Retina

Da die Verfügbarkeit der Netzhaut gering war, wurden drei Messreihen zur Beurteilung der a-Wellen und drei Messreihen zur Beurteilung der b-Wellen durchgeführt.

Aufgrund der kleinen Fallzahl wurde auf eine statistische Auswertung mit Bestimmung der Signifikanz verzichtet. Alle Messreihen wurden mit einer Expositionszeit von 60 s durchgeführt. Das Vorgehen entsprach dabei den Messungen an bovinen Retinea.

VII.2.3.1 Auswirkungen auf die b-Welle einer humanen Retina

Nach Exposition zeigte sich eine unmittelbare Reduktion der b-Welle um 29%, gefolgt von einem Anstieg um 24% am Ende des Versuchs.

VII.2.3.2 Auswirkungen auf die a-Welle einer humanen Retina

Die a-Wellen-Amplitude brach nach Exposition um 35% ein und erholte sich am Ende der Auswaschphase. Dort lag eine Reduktion von 6% vor.

Tabelle 5 zeigt die Mittelwerte der b- und a-Wellen-Amplitude über die Zeit.

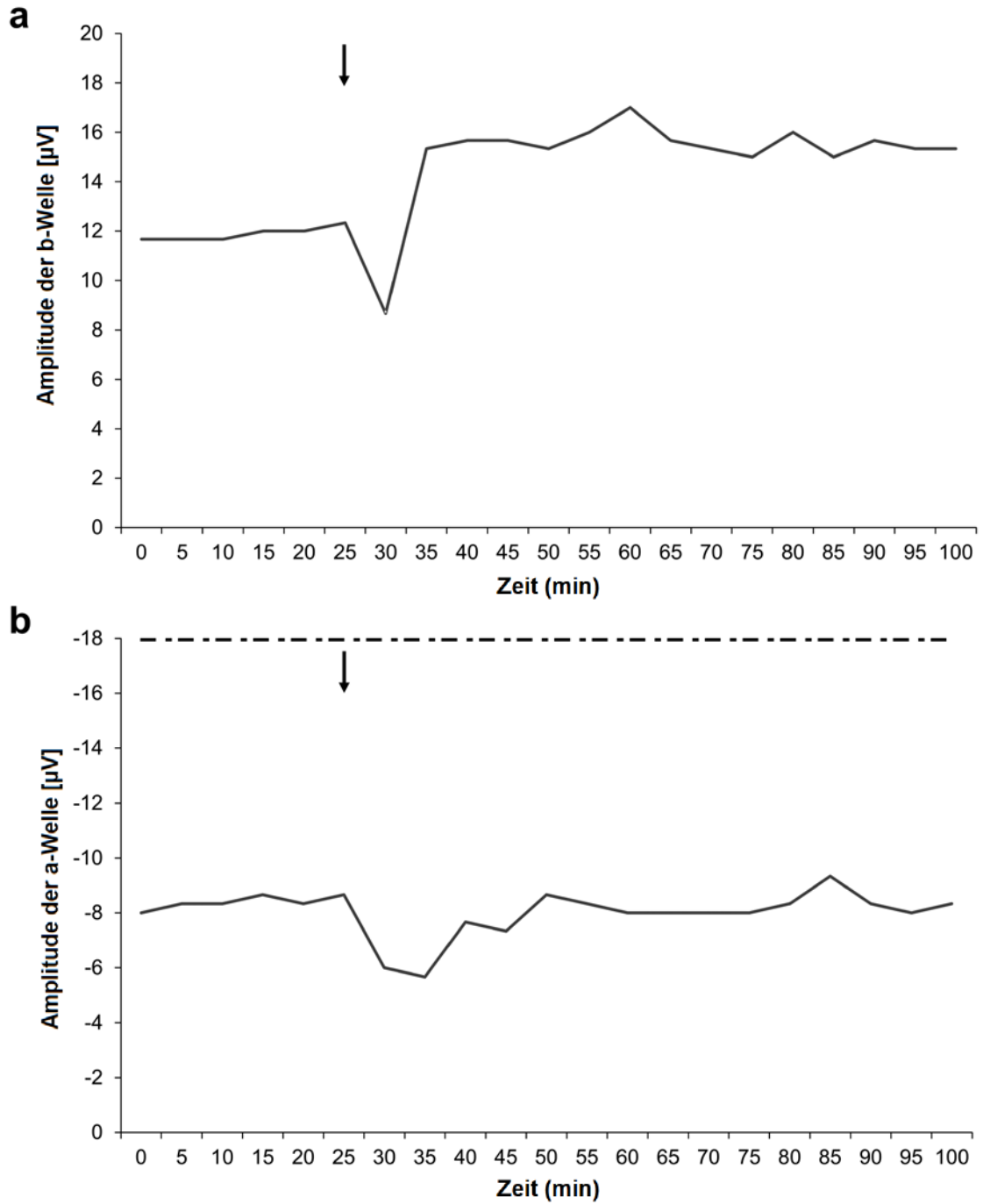


Abbildung 17: Der Verlauf der b-Wellen-Amplitude (a) und der a-Wellen-Amplitude (b). Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 60 s. Die gestrichelte horizontale Linie stellt den Zusatz von 1mM Aspartat in der Perfusionslösung dar.

Zeit [min]	BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)®		BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)®	
	60 s		60 s	
	Mittelwert der b- Wellen-Amplitude	SD [μ V]	Mittelwert der a- Wellen-Amplitude	SD [μ V]
0	11,7	0,58	-8,0	0,00
5	11,7	0,58	-8,3	0,58
10	11,7	0,58	-8,3	0,58
15	12,0	0,00	-8,7	0,58
20	12,0	0,00	-8,3	0,58
25	12,3	0,58	-8,7	0,58
30	8,7	1,53	-6,0	2,00
35	15,3	1,53	-5,7	2,08
40	15,7	0,58	-7,7	0,58
45	15,7	0,58	-7,3	2,08
50	15,3	1,53	-8,7	0,58
55	16,0	1,73	-8,3	0,58
60	17,0	1,73	-8,0	0,00
65	15,7	1,15	-8,0	0,00
70	15,3	1,53	-8,0	0,00
75	15,0	1,00	-8,0	0,00
80	16,0	1,73	-8,3	0,58
85	15,0	1,00	-9,3	0,58
90	15,7	1,15	-8,3	0,58
95	15,3	0,58	-8,0	1,00
100	15,3	0,58	-8,3	0,58

Tabelle 5: Darstellung der Mittelwerte der b- und a-Wellen-Amplitude über die Zeit. Die Exposition erfolgte nach 25 min. Unter SD ist die Standardabweichung angegeben.

VII.3 ILM-Blue®

VII.3.1 Auswirkungen auf die b-Welle

Bei einer Expositionszeit von 30 s, wurde eine unmittelbare Reduktion der Amplitude um 5% ($p=0,38$) und eine Reduktion um 9% ($p=0,25$) am Ende der Auswaschphase beobachtet, beide waren nicht signifikant (Abbildung 18a).

Nach 60 s Färbung wurde zunächst ein Rückgang um 9% ($p=0,08$) beobachtet, der sich auf 5% ($p=0,19$) Reduktion erholte (Abbildung 18b).

Nach 120 s Exposition war die b-Wellen-Amplitude initial um 6% ($p=0,37$) vermindert, gefolgt von einem leichten Anstieg am Ende der Auswaschphase auf 6% ($p=0,41$; Abbildung 18c).

Tabelle 6 zeigt die Mittelwerte der b-Wellen-Amplitude über die Zeit.

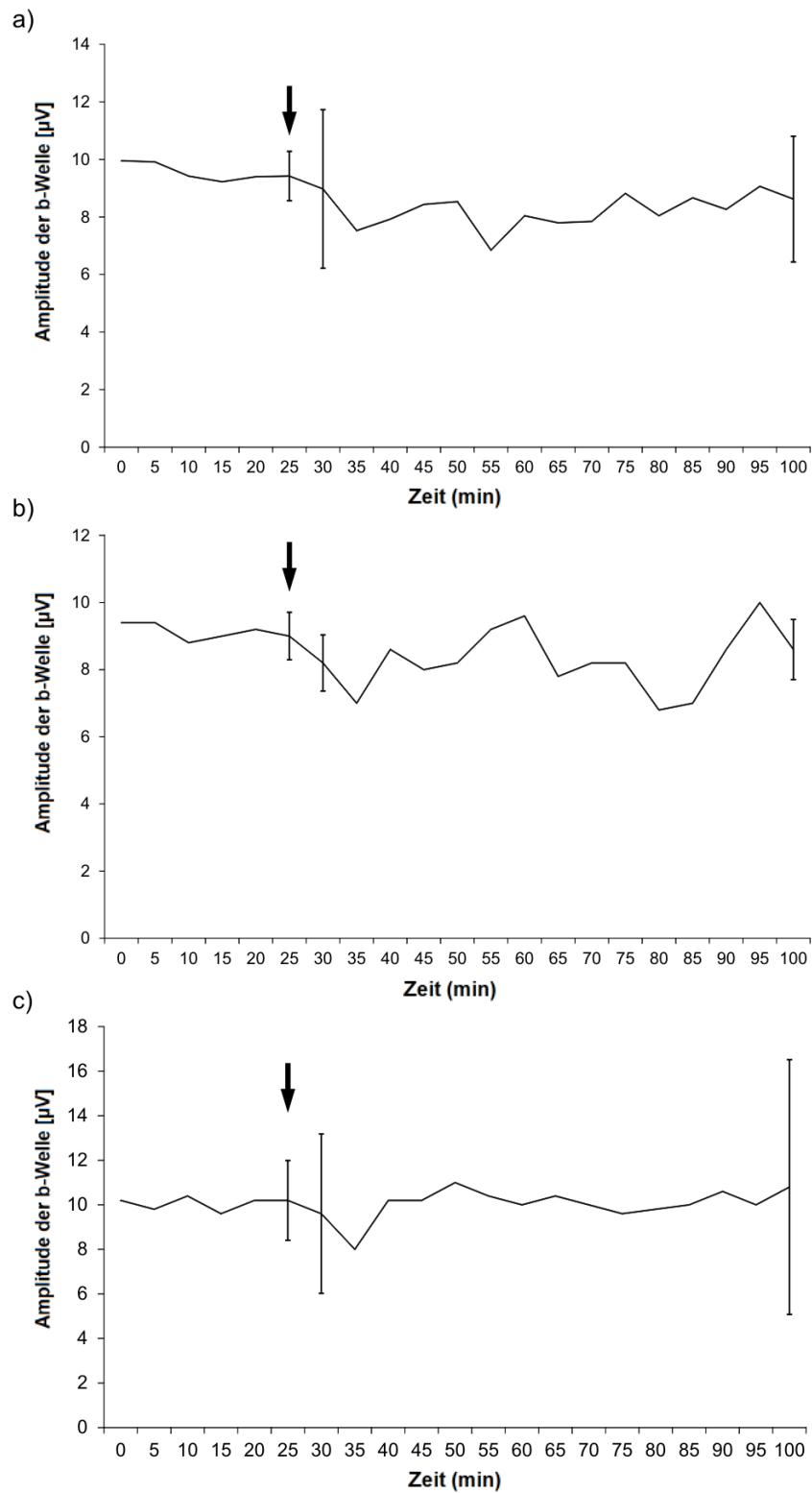


Abbildung 18: Der Verlauf der b-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 30 s (a), 60 s (b) und 120 s (c).

Zeit [min]	ILM-Blue® (BBG mit 4% Polyethylenglykol)			ILM-Blue® (BBG mit 4% Polyethylenglykol)			ILM-Blue® (BBG mit 4% Polyethylenglykol)		
	30 s			60 s			120 s		
	Mittelwert der b-Wellen	SD		Mittelwert der b-Wellen	SD		Mittelwert der b-Wellen	SD	
	Amplitude [μ V]	[μ V]		Amplitude [μ V]	[μ V]		Amplitude [μ V]	[μ V]	
0	10	1,12		9,4	0,89		10,2	1,10	
5	9,9	1,25		9,4	0,55		9,8	1,92	
10	9,4	1,18		8,8	1,10		10,4	1,14	
15	9,2	0,80		9	1,58		9,6	1,95	
20	9,4	0,55		9,2	1,79		10,2	1,30	
25	9,4	0,86		9	0,71		10,2	1,79	
30	9	2,76		8,2	0,84		9,6	3,58	
35	7,5	1,49		7	1,22		8	2,92	
40	7,9	2,73		8,6	2,70		10,2	3,56	
45	8,4	2,30		8	1,58		10,2	3,77	
50	8,5	2,61		8,2	1,30		11	4,53	
55	6,8	3,86		9,2	1,92		10,4	4,04	
60	8	2,27		9,6	0,55		10	4,85	
65	7,8	2,07		7,8	1,10		10,4	4,83	
70	7,8	2,53		8,2	1,79		10	5,15	
75	8,8	2,98		8,2	2,17		9,6	4,88	
80	8	2,16		6,8	2,77		9,8	6,42	
85	8,7	2,09		7	3,00		10	6,12	
90	8,3	2,40		8,6	2,19		10,6	4,62	
95	9,1	3,53		10	1,22		10	5,15	
100	8,6	2,18		8,6	0,89		10,8	5,72	

Tabelle 6: Darstellung der Mittelwerte der b-Wellen Amplitude über die Zeit. Die Exposition erfolgte nach 25 min. Unter SD ist die Standardabweichung angegeben.

VII.3.2 Auswirkungen auf die a-Welle

Nach einer Expositionszeit von 30 s zeigte sich eine Reduktion der a-Welle um 9%, die nicht signifikant war ($p=0,21$). Am Ende der Auswaschphase bestand keine Veränderung (Abbildung 19a).

Nach 60 s Färbung bestand eine leichte Erhöhung auf 8% ($p=0,38$). Es folgte ein nicht signifikanter Abfall auf 2% ($p=0,37$; Abbildung 19b).

Während 120 s Exposition wurde eine initiale Reduktion um 20% beobachtet ($p=0,12$), gefolgt von einer Reduktion um 31%, beide waren nicht signifikant ($p=0,07$; Abbildung 19c).

Tabelle 7 zeigt die Mittelwerte der a-Wellen-Amplitude über die Zeit.

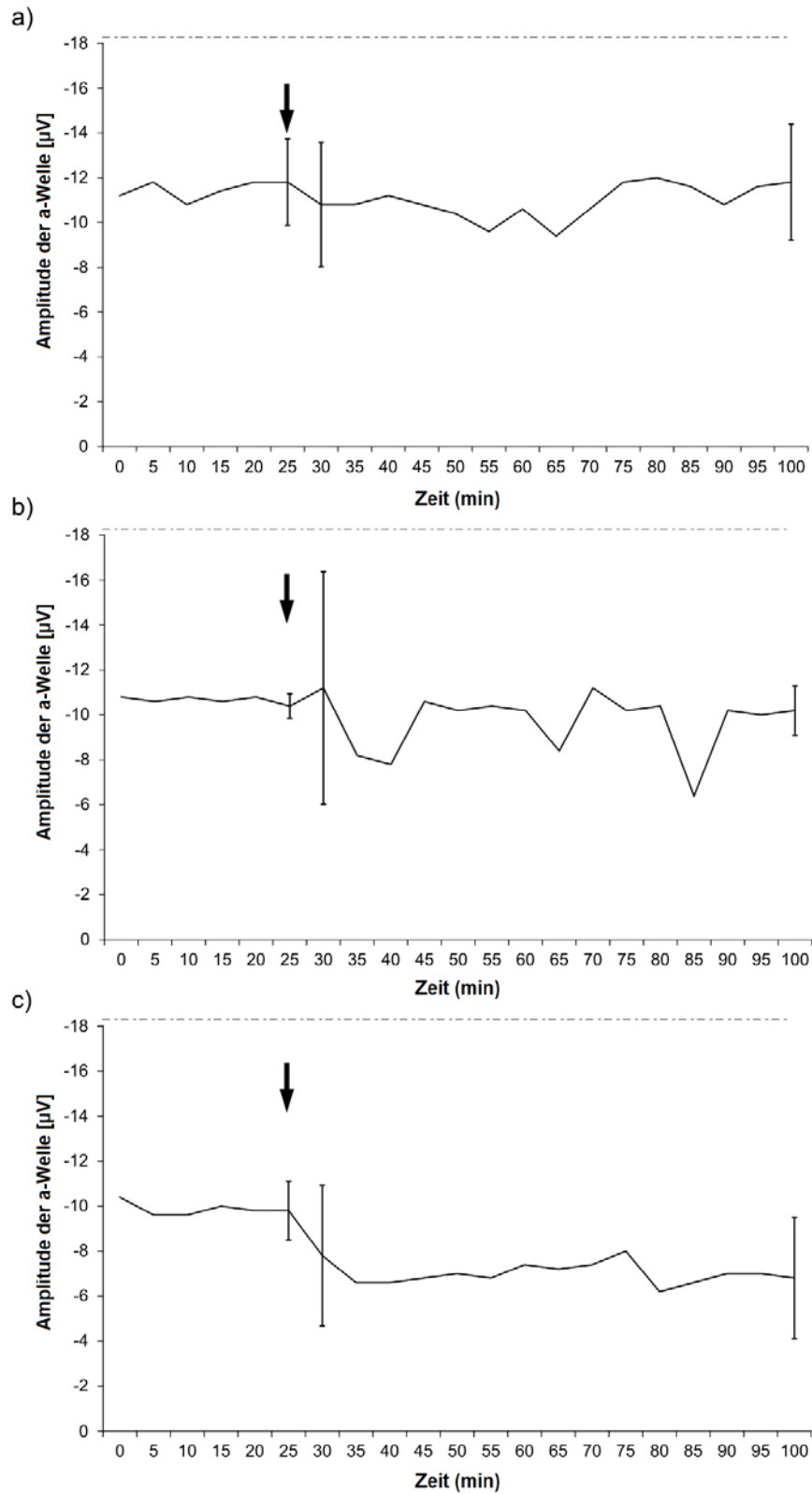


Abbildung 19: Der Verlauf der a-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 30 s (a), 60 s (b) und 120 s (c). Die gestrichelte horizontale Linie stellt den Zusatz von 1mM Aspartat in der Perfusionslösung dar.

Zeit [min]	ILM-Blue® (BBG mit 4% Polyethylenglykol)			ILM-Blue® (BBG mit 4% Polyethylenglykol)			ILM-Blue® (BBG mit 4% Polyethylenglykol)		
	30 s			60 s			120 s		
	Mittelwert der a-Wellen	SD		Mittelwert der a-Wellen	SD		Mittelwert der a-Wellen	SD	
	Amplitude [μ V]	[μ V]		Amplitude [μ V]	[μ V]		Amplitude [μ V]	[μ V]	
0	-11,2	1,30		-10,8	0,45		-10,4	0,89	
5	-11,8	1,92		-10,6	0,55		-9,6	1,14	
10	-10,8	1,48		-10,8	1,30		-9,6	0,89	
15	-11,4	1,52		-10,6	1,14		-10	1,00	
20	-11,8	1,92		-10,8	1,30		-9,8	0,84	
25	-11,8	1,92		-10,4	0,55		-9,8	1,30	
30	-10,8	2,77		-11,2	5,17		-7,8	3,11	
35	-10,8	2,77		-8,2	3,56		-6,6	1,82	
40	-11,2	2,17		-7,8	3,27		-6,6	2,19	
45	-10,8	3,11		-10,6	1,14		-6,8	3,03	
50	-10,4	2,97		-10,2	0,45		-7	2,83	
55	-9,6	3,21		-10,4	1,14		-6,8	2,49	
60	-10,6	3,13		-10,2	1,30		-7,4	2,70	
65	-9,4	4,04		-8,4	4,16		-7,2	2,17	
70	-10,6	3,85		-11,2	2,49		-7,4	2,41	
75	-11,8	4,44		-10,2	0,84		-8	2,00	
80	-12	3,39		-10,4	1,14		-6,2	1,79	
85	-11,6	3,65		-6,4	9,18		-6,6	2,07	
90	-10,8	2,95		-10,2	1,30		-7	2,45	
95	-11,6	2,41		-10	1,87		-7	2,92	
100	-11,8	2,59		-10,2	1,10		-6,8	2,68	

Tabelle 7: Darstellung der Mittelwerte der a-Wellen Amplitude über die Zeit. Die Exposition erfolgte nach 25 min. Unter SD ist die Standardabweichung angegeben.

VII.4 MembraneBlue-Dual®

VII.4.1 Auswirkungen auf die b-Welle

Nach 30 s Expositionszeit zeigte die b-Welle einen Einbruch der Amplitudenhöhe um 41% ($p=0,08$). Am Ende der Auswaschphase bestand eine Reduktion um 20% ($p=0,051$; Abbildung 20a).

Nach 60 s Färbung erfolgte unmittelbar eine statistisch signifikante Reduktion der Amplitudenhöhe um 61% ($p=0,0088$). Nach Auswaschen am Ende der Messreihe lag die Reduktion nur bei 10% und war nicht signifikant ($p=0,07$; Abbildung 20b).

Bei 120 s Exposition bestand unmittelbar eine signifikante Reduktion um 42% ($p=0,0085$), gefolgt von Steigerung von 10% am Ende des Versuchs, die nicht signifikant war ($p=0,07$; Abbildung 20c).

Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte der b-Wellen-Amplitude über die Zeit.

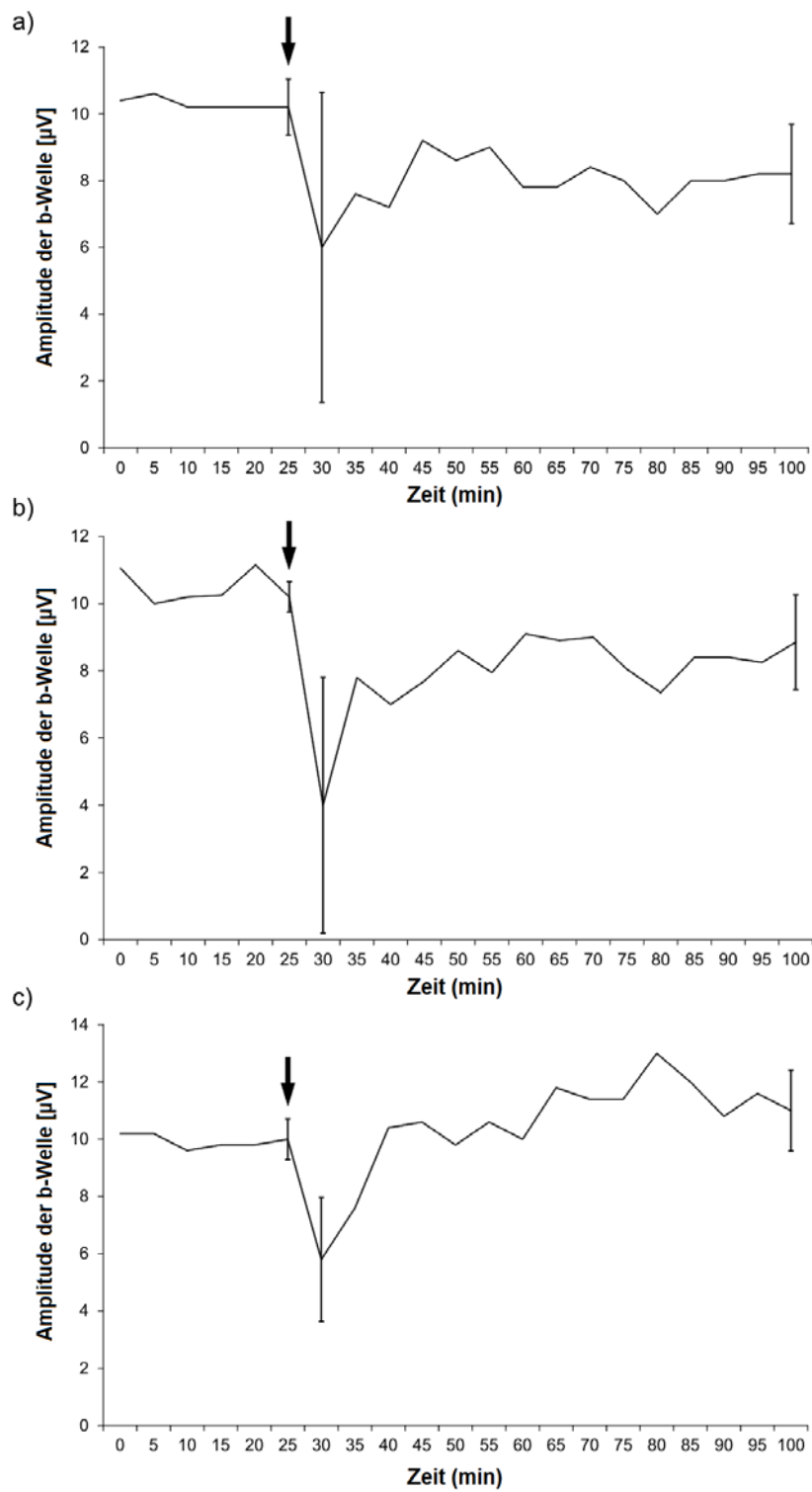


Abbildung 20: Der Verlauf der b-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 30 s (a), 60 s (b) und 120 s (c).

Zeit [min]	MembraneBlue-Dual® (BBG und Trypanblau mit 4% Polyethylenglykol) 30 s			MembraneBlue-Dual® (BBG und Trypanblau mit 4% Polyethylenglykol) 60 s			MembraneBlue-Dual® (BBG und Trypanblau mit 4% Polyethylenglykol) 120 s		
	Mittelwert der b-Wellen		SD	Mittelwert der b-Wellen		SD	Mittelwert der b-Wellen		SD
	Amplitude [μ V]		[μ V]	Amplitude [μ V]		[μ V]	Amplitude [μ V]		[μ V]
0	10,4	1,14	11,05	0,11	10,2	0,45			
5	10,6	0,89	10	1,00	10,2	0,84			
10	10,2	1,10	10,2	1,10	9,6	1,14			
15	10,2	1,10	10,25	0,90	9,8	0,84			
20	10,2	1,10	11,15	1,83	9,8	0,84			
25	10,2	0,84	10,2	0,45	10	0,71			
30	6	4,64	4	3,81	5,8	2,17			
35	7,6	4,39	7,8	1,92	7,6	1,82			
40	7,2	4,71	7	2,00	10,4	3,71			
45	9,2	3,19	7,7	0,84	10,6	1,52			
50	8,6	3,44	8,6	1,14	9,8	1,92			
55	9	3,39	7,95	0,62	10,6	1,67			
60	7,8	2,59	9,1	1,95	10	3,32			
65	7,8	2,59	8,9	2,46	11,8	2,59			
70	8,4	2,51	9	1,87	11,4	1,67			
75	8	1,41	8,05	1,97	11,4	1,95			
80	7	1,87	7,35	1,62	13	4,53			
85	8	2,12	8,4	1,14	12	2,45			
90	8	2,24	8,4	1,14	10,8	3,11			
95	8,2	1,92	8,25	1,89	11,6	3,78			
100	8,2	1,48	8,85	1,41	11	1,41			

Tabelle 8: Darstellung der Mittelwerte der b-Wellen-Amplitude über die Zeit. Die Exposition erfolgte nach 25 min. Unter SD ist die Standardabweichung angegeben.

VII.4.2 Auswirkungen auf die a-Welle

Nach 30 s Expositionsdauer folgte eine unmittelbare Reduktion um 21% ($p=0,07$). Am Ende der Auswaschphase bestand eine signifikante Reduktion um 30% ($p=0,034$; Abbildung 21a).

Bei einer Exposition von 60 s zeigte sich eine Reduktion um 17% ($p=0,20$) und am Ende der Messreihe eine Abnahme von 11% ($p=0,87$; Abbildung 21b).

120 s Expositionszeit führten zu einer unmittelbaren Abnahme um 29% ($p=0,0009$) und einer Reduktion von 20% am Ende, die nicht signifikant war ($p=0,07$; Abbildung 21c).

Tabelle 9 zeigt die Mittelwerte der a-Wellen-Amplitude über die Zeit.

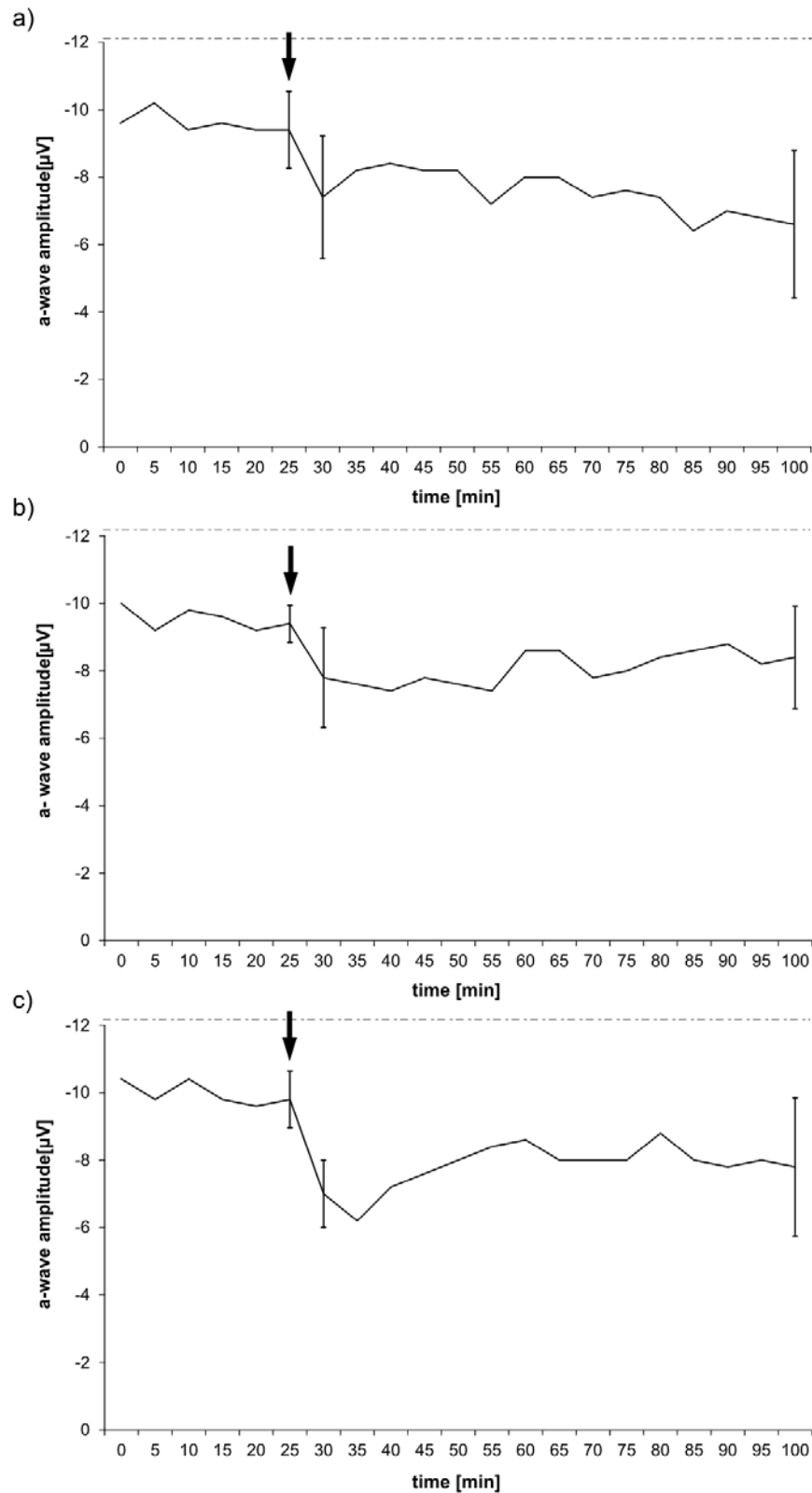


Abbildung 21: Der Verlauf der a-Wellen-Amplitude. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt. Die Dauer der Exposition betrug 30 s (a), 60 s (b) und 120 s (c). Die gestrichelte horizontale Linie stellt den Zusatz von 1mM Aspartat in der Perfusionslösung dar.

Zeit [min]	MembraneBlue-Dual® (BBG und Trypanblau mit 4% Polyethylenglykol) 30 s			MembraneBlue-Dual® (BBG und Trypanblau mit 4% Polyethylenglykol) 60 s			MembraneBlue-Dual® (BBG und Trypanblau mit 4% Polyethylenglykol) 120 s		
	Mittelwert der a-Wellen	SD		Mittelwert der a-Wellen	SD		Mittelwert der a-Wellen	SD	
	Amplitude [μ V]	[μ V]		Amplitude [μ V]	[μ V]		Amplitude [μ V]	[μ V]	
0	-9,6	0,55		-10	1,00		-10,4	1,14	
5	-10,2	0,45		-9,2	0,84		-9,8	0,45	
10	-9,4	0,89		-9,8	0,84		-10,4	0,89	
15	-9,6	0,55		-9,6	0,89		-9,8	0,45	
20	-9,4	1,14		-9,2	0,45		-9,6	0,55	
25	-9,4	1,14		-9,4	0,55		-9,8	0,84	
30	-7,4	1,82		-7,8	1,48		-7	1,00	
35	-8,2	2,28		-7,6	2,30		-6,2	1,10	
40	-8,4	1,52		-7,4	2,07		-7,2	1,64	
45	-8,2	2,17		-7,8	1,64		-7,6	1,95	
50	-8,2	1,79		-7,6	1,34		-8	1,87	
55	-7,2	2,17		-7,4	0,55		-8,4	3,65	
60	-8	1,87		-8,6	0,89		-8,6	2,41	
65	-8	2,12		-8,6	1,14		-8	1,87	
70	-7,4	1,82		-7,8	1,64		-8	2,45	
75	-7,6	1,82		-8	1,58		-8	2,12	
80	-7,4	2,19		-8,4	1,34		-8,8	1,92	
85	-6,4	4,34		-8,6	0,89		-8	2,35	
90	-7	2,12		-8,8	0,84		-7,8	2,05	
95	-6,8	1,79		-8,2	1,10		-8	2,35	
100	-6,6	2,19		-8,4	1,52		-7,8	2,05	

Tabelle 9: Darstellung der Mittelwerte der a-Wellen Amplitude über die Zeit. Die Exposition erfolgte nach 25 min. Unter SD ist die Standardabweichung angegeben.

VIII Diskussion

VIII.1 Zur Methodik

Das Modell der isolierten und perfundierten Netzhaut hat sich als verlässliches Werkzeug zur toxikologischen Testung intravitrealer Pharmaka bewährt (Luke, Weiergraber et al. 2005). Die Methode bietet den Vorteil einer hohen Standardisierung, die einfacher als im Tierversuch zu gewährleisten ist (Richter, Garner et al. 2009). Gegenüber histologischen bzw. biochemischen Untersuchungen besteht häufig eine höhere Sensitivität für toxische Effekte, da nicht nur die Viabilität oder Struktur sondern die funktionelle Integrität des retinalen Gewebes durch die Ableitung eines ERG unmittelbar geprüft wird. Zusätzlich ist die Art der epiretinalen Applikation nach Entfernung des Glaskörpers der klinischen Anwendung der Farbstoffe sehr ähnlich und die Expositionszeiten lassen sich genau einhalten. Die Eigenschaft eines Farbstoffes, Licht zu absorbieren, kann allerdings direkt nach Applikation zu einer erhöhten Standardabweichung bzw. Reduktion der Reizantwort führen, die nicht unmittelbar auf Toxizität zurückgeführt werden darf. Die Auswaschphase von 75 Minuten konnte eine Eliminierung des Farbstoffes gewährleisten. Somit lieferte der letzte Messwert im Vergleich mit dem Wert vor Applikation eine zuverlässige Information über eine Änderung des funktionellen Status der Retina. Obwohl sich die Daten der isolierten bovinen perfundierten Netzhaut scheinbar gut auf den Menschen übertragen lassen, wären weitere Versuche mit humanen Retinae zur Prüfung einer zuvor auf Rindernetzhaut getesteten Substanz wünschenswert. Längere Expositionszeiten als die getesteten sind in der klinischen Praxis nicht gebräuchlich, jedoch können Reste des Farbstoffs durch retinale Defekte auch subretinal verbleiben und so eine längere Exposition verursachen. Histologische Studien können hier Aufschluss über chronische Effekte geben. Da die Perfusion für die Zeit der Applikation gestoppt wird, ist eine Testung für deutlich längere Expositionszeiten mit der verwendeten Methode nicht möglich, da ein toxischer Effekt durch Hypoxie und Mangel an Substrat die Wirkung der Testlösung überlagern und somit die Bewertung erschweren würde.

VIII.2 BBG Brilliant Peel® gemischt mit Glukose

Für die niedrigste verwendete Glukosekonzentration von 4,4% zeigten sich keine signifikanten ERG-Veränderungen direkt nach Applikation bzw. am Ende der Auswaschphase. In unseren Versuchen traten toxische Effekte ab einer Glukosekonzentration von 8% auf, es kam zu einer signifikanten Abnahme der b-Wellen-Amplitude um 23,4% ($p=0,0039$). Bei der höchsten getesteten Konzentration entsprechend 10,9% Glukose zeigte sich dementsprechend eine verstärkte Toxizität mit Abnahme der Amplitudenhöhe um 26% ($p=0,0039$). Die A-Welle zeigte lediglich in der Messreihe mit der höchsten Glukosekonzentration einen temporären Anstieg um 70% direkt nach der Applikation, aber keine Reduktion in dieser oder anderen getesteten Konzentrationen.

Diese Ergebnisse decken sich mit Erfahrungen aus der klinischen Anwendung. Hier wurde für ein BBG-assistiertes Peeling keine Toxizität gesehen, wobei kein Gemisch mit Glukose getestet wurde, sondern BBG alleine (Shimada, Nakashizuka et al. 2009; Henrich, Haritoglou et al. 2010). Lüke, Januschowski et al. konnten ebenfalls keine toxischen Effekte auf das ERG der isolierten bovinen Retina für BBG alleine erkennen (Lüke, Januschowski et al. 2008). In einer Zellkultur-Studie mit humanen Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) konnte für eine fünfprozentige Glukoselösung mit und ohne Zugabe des Farbstoffs Indocyaningrün keine Toxizität festgestellt werden (Stalmans, Van Aken et al. 2002). Nicht veröffentlichte Daten des Herstellers Fluoron ergaben auf isolierten Zellkulturen bereits toxische Effekte ab einer Glukosekonzentration von 1,11%, allerdings erfolgte hier eine längere Exposition (70,5 Stunden Inkubationszeit). Die klinisch verwendete Expositionszeit liegt im Bereich unter einer Minute. Während der Applikation ist zusätzlich eine weitere Verdünnung durch die intraokulare Spüllösung zu berücksichtigen. Die Osmolarität der von uns verwendeten Lösungen lag für 0,4 ml BBG gemischt mit 0,05 ml Glukose 40% bei 537 mOsm/l (SD 19 mOsm/l), für 0,4 ml BBG gemischt mit 0,1 ml Glukose 40% bei 620 mOsm/l (SD 28 mOsm/l) und für 0,4 ml BBG gemischt mit 0,15 ml Glukose 40% bei 787 mOsm/l (SD 19 mOsm/l). Eine Schädigung durch die erhöhte Osmolarität des Gemischs wäre eine Erklärung für den Rückgang der Amplituden, Studien ergaben hier morphologische Veränderungen von Affen- und Kaninchennetzhäuten nach intravitrealer Gabe von diversen hyperosmolaren Lösungen, die ab einer Osmolarität

von 500 mOsm/l begannen und ab 1000 mOsm/l starke Effekte zeigten, darunter Netzhautschwellung und –ablösung, Veränderungen im Bereich der Mikrovilli des RPE und Verringerung der Amplitudenhöhe im ERG. Dabei war die c-Welle besonders stark affektiert, aber auch die b- und die a-Welle zeigten eine Reduktion (Marmor 1979; Marmor, Martin et al. 1980). Dies entspricht auch unseren Ergebnissen. Der Crabtree-Effekt, eine Reduktion der Zellatmung durch höhere Glukosekonzentrationen, wurde bereits für die isolierte Netzhaut beschrieben und kann ebenfalls zur Erklärung beitragen (Sickel 1969; Graymore 1970). Ein Rückgang der Sauerstoffaufnahme um bis zu 40% wurde für die Retina beobachtet (Ibsen 1961). Die Ergebnisse lassen eine klinische off-label-Anwendung von BBG mit 4,4% Glukose sicher erscheinen. Höhere Konzentrationen sollten jedoch vermieden werden, da sich im ERG toxische Effekte zeigten (Januschowski, Mueller et al. 2011).

VIII.3 BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxid)®

BBG gemischt mit Deuteriumoxid zeigte keine signifikanten toxischen Effekte, weder auf die b-Welle als Antwort des höheren neuronalen Netzwerkes, noch auf die a-Welle als Abbild der Photorezeptorfunktion. Die Versuche mit der humanen Retina unterstützen diese Aussage, lassen aber aufgrund der kleinen Fallzahl keine sichere statistische Beurteilung zu. Eine wesentliche Veränderung der Amplitudenhöhe war nicht erkennbar.

Deuteriumoxid (D₂O) wurde bereits in Zellkultur- und tierexperimentellen Studien getestet. Diese ergaben eine Toxizität, die ab einer Konzentration von 30% im Trinkwasser bei systemischer Gabe begann (Thomson 1960; Czajka, Finkel et al. 1961; Katz, Crespi et al. 1962). Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 13% lässt hier einen deutlichen Sicherheitsabstand. Außerdem ist auch hier eine weitere Verdünnung durch die chirurgische Anwendung gegeben, da der Bulbus flüssigkeitsgefüllt ist. Eine nicht homogene Verteilung des Farbstoffes ist beim Absinken auf die Retina zudem wahrscheinlich. Im Gegensatz zu dem Gemisch von BBG und Glukose kann im Falle des Brilliant Peel (Deuteriumoxid)® eine toxische Wirkung durch Hyperosmolarität als unwahrscheinlich angesehen werden. Sie liegt bei dem getesteten Gemisch bei 302 mOsm/l, toxische Effekte wurden ab 500 mOsm/l

beschrieben (Marmor 1979; Marmor, Martin et al. 1980). Eine große Differenz zur Serumosmolarität des Menschen liegt nicht vor (ca. 290 mOsm/l).

Unsere Ergebnisse der bovinen und humanen isolierten Netzhaut lassen eine klinische Anwendung des Farbstoffs bis zu einer Expositionszeit von 120 s sicher erscheinen (Januschowski, Mueller et al. 2012). Diese liegt jedoch gewöhnlich bei unter einer Minute, um eine ausreichende Anfärbung zu erreichen.

VIII.4 ILM-Blue® und MembraneBlue-Dual®

ILM-Blue® besteht aus BBG und 4% Polyethylenglykol. Für diesen Farbstoff konnte in unseren Messreihen weder im b-, noch im a-Wellenverlauf eine signifikante Änderung festgestellt werden.

MembraneBlue-Dual® (MBB) ist ein Doppelfarbstoff und enthält somit neben BBG und 4% Polyethylenglykol Trypanblau. Es erfolgt daher auch eine Anfärbung von extrazellulärer Matrix. MBB erwies sich als deutlich intensiver in der Färbecharakteristik. In den Perfusionstudien bestand bei 60 und 120 s Expositionszeit eine signifikante Reduktion der b-Wellen-Amplitudenhöhe unmittelbar nach Start der Reperfusion. Zudem lag hier eine hohe Standardabweichung innerhalb der ersten 30 Minuten vor. Dies traf auch für die a-Wellen zu, wobei hier lediglich für 30 s Exposition eine signifikante Reduktion um knapp 30% am Ende der Auswaschphase bestehen blieb. Die meist transiente Reduktion als auch die hohe Standardabweichung können durch die stärkere und langanhaltendere Anfärbung einerseits und andererseits durch eine unterschiedlich große Menge extrazellulärer Matrix epiretinal verursacht sein. Dies ist durch die Technik der Glaskörperentfernung zu erklären. Verbleibt in den ersten Minuten nach epiretinaler Applikation noch eine deutlichere Anfärbung, so kann dies zu einer Absorption des Lichts führen und alleine durch diese Tatsache eine verminderte Reizantwort hervorrufen. Dies ist aus vorherigen Studien bereits bekannt (Luke, Januschowski et al. 2008). Im Verlauf der Auswaschphase kam es bei nahezu allen Messreihen zu einer Stabilisierung der Antworten. Insbesondere aufgrund der beschriebenen Phänomene, sollte vor allem der letzte Wert der Messreihe für eine Toxizitätsbetrachtung herangezogen und interpretiert werden. Die signifikante Reduktion der a-Welle in der 30 s Messreihe muss vor diesem Hintergrund kritisch gesehen werden, da sie durch die längeren Expositionszeiten nicht bestätigt werden

konnte. Toxische Effekte nehmen gewöhnlicherweise mit Dauer der Exposition oder höherer Dosis zu. Für Trypanblau wurde bereits über eine chronische Zytotoxizität in Zellkulturstudien bei Exposition über 6 Tage berichtet, akute Toxizität bestand nicht (Kodjikian, Richter et al. 2005). Lüke et al. konnten im Modell der isolierten perfundierten Retina bereits nach 15 s Anfärbung mit 0,15% Trypanblau eine Reduktion der b-Wellen-Amplitude nachweisen, die innerhalb der Auswaschzeit von knapp zwei Stunden nur teilweise reversibel war (Luke, Luke et al. 2005). Die Diskrepanz zu den jetzigen Ergebnissen könnte auf einen höheren Reinheitsgrad des Farbstoffs zurückzuführen sein, in der Form wie er von D.O.R.C. vertrieben wurde. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit eine Mischung mit Polyethylenglykol (PEG) getestet. Eine neuroprotektive Eigenschaft dieses Zusatzes könnte eine verminderte Toxizität in den Messreihen erklären. PEG zeigte bereits neuroprotektive Eigenschaften in tierexperimentellen Studien, in der Meerschweinchen mit Rückenmarksläsionen eine deutlich schnellere Erholung gegenüber den mit Scheininjektion behandelten Tieren zeigten. Dies wird auf die membranverbindenden Eigenschaften von PEG zurückgeführt, die auf molekularer Ebene zu einer Wiederherstellung der funktionellen Integrität von Neuronen führen können (Borgens and Shi 2000; Borgens and Bohnert 2001; Borgens, Shi et al. 2002). Neuere Studien, die die Toxizität von Farbstoffen auf ARPE-19 Zellen prüften, scheinen die neuroprotektive Hypothese zu stützen. So konnte nachgewiesen werden, dass Farbstofflösungen, die PEG enthielten, den geringsten toxischen Effekt hatten (Awad, Schrader et al. 2011). Es könnte also postuliert werden, dass die Toxizität von Trypanblau durch den Zusatz von PEG reduziert würde. In Zellkulturversuchen mit RGC-5 Zellen - einer retinalen Ganglienzellreihe der Ratte - konnte weder für ILM-Blue® noch für MembraneBlue-Dual® eine signifikante Reduktion der Lebendzellzahl erkannt werden. Die Expositionszeiten lagen bei diesen Versuchen sogar bei bis zu 320 s (Januschowski, Mueller et al. 2012). Eine eindeutige Toxizität konnte in den Messreihen nicht gefunden werden. Eine bessere Biokompatibilität ist jedoch für ILM-Blue® anzunehmen, was besonders bei wiederholtem intraoperativen Anfärben berücksichtigt werden sollte.

IX Zusammenfassung

Pathologien im Bereich der vitrerenalen Grenzschrift können insbesondere bei Beteiligung der Makula zu erheblicher Visusminderung führen. Ursächlich für die Ausbildung eines Makulaforamens oder einer epiretinalen Gliose sind semitransparente Membranen, die häufig nur eine Dicke von wenigen Mikrometern aufweisen. Die Entfernung dieser Strukturen („Peeling“) stellt daher eine chirurgische Herausforderung dar. Hilfreich sind Farbstoffe zur selektiven Kontrastierung, um eine restlose Entfernung zu gewährleisten und iatrogene Schäden an der sensiblen neurosensorischen Retina zu vermeiden. Bei Indocyaningrün, das zuvor bereits bei Angiographien verwendet worden war und als sicher galt, führte eine epiretinale Anwendung unter anderem zum Auftreten von Gesichtsfelddefekten. Vor der klinischen Anwendung neuer Farbstoffe sollte daher eine sorgfältige Prüfung der retinalen Biokompatibilität erfolgen.

In dieser Arbeit wurden Farbstoffe bzw. Farbstoffgemische auf retinale Toxizität getestet, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, in der intraokularen Spülflüssigkeit auf die Netzhaut abzusinken. Dies führt zu einer besseren Anfärbung der Zielstrukturen und Umgehung des ansonsten notwendigen Flüssigkeits-Gas-Austauschs. Über die Ableitung eines Elektroretinogramms (ERG) vor und nach Exposition mit der jeweiligen Testsubstanz konnten Rückschlüsse auf die Biokompatibilität gezogen werden. Hierfür wurde das Modell der isolierten und perfundierten Netzhaut verwendet, das sich in der Vergangenheit bereits als verlässliches Werkzeug für toxikologische Prüfungen intravitrealer Pharmaka bewährt hat.

BBG Brilliant Peel® gemischt mit Glukose erschien in Konzentrationen bis 4,4% als sichere off-label-Anwendung. Höhere Konzentrationen sollten vermieden werden, da sich ab einer Glukosekonzentration von 8% eine signifikante Reduktion der b-Welle zeigte. **BBG Brilliant Peel (Deuteriumoxide)®** zeigte bis zu einer Expositionszeit von 120 s keine Toxizität. Die klinisch gebräuchliche Färbedauer liegt normalerweise bei weniger als einer Minute, sodass die klinische Anwendung in unserem Modell sicher scheint. Für **ILM-Blue®** und **MembraneBlue-Dual®** konnte eine eindeutige Toxizität durch die Messungen ebenfalls nicht gefunden werden.

ILM-Blue® könnte aber durch das Fehlen von Trypanblau eine bessere Biokompatibilität aufweisen. Polyethylenglykol als Zusatz zeigte Hinweise auf neuroprotektive Eigenschaften und stellt damit einen interessanten Zusatz auch für weitere intraokuläre Farbstoffe bzw. Pharmaka dar.

Durch die elektrophysiologische Toxizitätsprüfung von Farbstoffen vor der intraoperativen klinischen Anwendung kann für die Patienten ein großer Sicherheitsgewinn erreicht werden. Die verwendete Methode bietet eine hohe Sensitivität für toxische Effekte, da die funktionelle Integrität des retinalen Gewebes durch die Ableitung eines ERG unmittelbar geprüft wird. Für die Zukunft kann mit der Entwicklung neuer hoch spezifischer Farbstoffe gerechnet werden. Beispielsweise könnten Antikörper oder Aptamere gegen spezifische Strukturen im Auge entwickelt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Eine elektrophysiologische Untersuchung dieser Substanzen vor der klinischen Anwendung wäre wünschenswert.

X Literaturverzeichnis

- Abdelkader, E. A., V. A. McBain, et al. (2011). "In vivo safety of trypan blue use in vitreoretinal surgery." Retina **31**(6): 1122-1127.
- Almony, A., E. Nudleman, et al. (2012). "Techniques, rationale, and outcomes of internal limiting membrane peeling." Retina **32**(5): 877-891.
- Appiah, A. P. and T. Hirose (1989). "Secondary causes of premacular fibrosis." Ophthalmology **96**(3): 389-392.
- Awad, D., I. Schrader, et al. (2011). "Comparative toxicology of trypan blue, brilliant blue G, and their combination together with polyethylene glycol on human pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(7): 4085-4090.
- Bacsal, K. M. and S. P. Chee (2006). "Trypan blue-associated retinal toxicity post complicated cataract surgery." Eye (Lond) **20**(11): 1310-1311.
- Bartz-Schmidt, U., P. Szurman, et al. (2008). "[New developments in retinal detachment surgery]." Ophthalmologie **105**(1): 27-36.
- Bellhorn, M. B., A. H. Friedman, et al. (1975). "Ultrastructure and clinicopathologic correlation of idiopathic preretinal macular fibrosis." Am J Ophthalmol **79**(3): 366-373.
- Borgens, R. B. and D. Bohnert (2001). "Rapid recovery from spinal cord injury after subcutaneously administered polyethylene glycol." J Neurosci Res **66**(6): 1179-1186.
- Borgens, R. B. and R. Shi (2000). "Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol." FASEB J **14**(1): 27-35.
- Borgens, R. B., R. Shi, et al. (2002). "Behavioral recovery from spinal cord injury following delayed application of polyethylene glycol." J Exp Biol **205**(Pt 1): 1-12.
- Boyland, E., R. T. Charles, et al. (1961). "The Induction of Tumours in Mice by Intravaginal Application of Chemical Compounds." Br J Cancer **15**(2): 252-256.
- Bradley Jr, C. A. and H. C. Urey (1932). "The relative abundance of hydrogen isotopes in natural hydrogen." Physical Review **40**(6): 889.
- Brown, J. P., A. Dorsky, et al. (1980). "Synthesis of ¹⁴C-labelled FD & C Blue No. 1 (Brilliant Blue FCF) and its intestinal absorption and metabolic fate in rats." Food Cosmet Toxicol **18**(1): 1-5.
- Casuso, L. A., I. U. Scott, et al. (2001). "Long-term follow-up of unoperated macular holes." Ophthalmology **108**(6): 1150-1155.
- Chandra, A., D. G. Charteris, et al. (2011). "Posturing after macular hole surgery: a review." Ophthalmologica **226** Suppl 1: 3-9.
- Cheng, S. N., T. C. Yang, et al. (2005). "Ocular toxicity of intravitreal indocyanine green." J Ocul Pharmacol Ther **21**(1): 85-93.
- Christensen, U. C. (2009). "Value of internal limiting membrane peeling in surgery for idiopathic macular hole and the correlation between function and retinal morphology." Acta Ophthalmol **87** Thesis 2: 1-23.
- Czajka, D. M., A. J. Finkel, et al. (1961). "Physiological effects of deuterium on dogs." Am J Physiol **201**: 357-362.

- de Bustros, S. (1994). "Vitreotomy for prevention of macular holes. Results of a randomized multicenter clinical trial. Vitrectomy for Prevention of Macular Hole Study Group." Ophthalmology **101**(6): 1055-1059; discussion 1060.
- Deetjen, S., Hescheler (2005). Physiologie. München, Urban & Fischer Verlag.
- Desatnik, H., G. Treister, et al. (1999). "Spontaneous separation of an idiopathic macular pucker in a young girl." Am J Ophthalmol **127**(6): 729-731.
- Du Bois-Raymond, E. (1849). Untersuchungen über thierische Electricität. Berlin, G. Reimer.
- Ehrlich and Shiga (1907). Berl. Klin. Wochenschr. **44**: 233.
- Enaida, H., T. Hisatomi, et al. (2006). "Preclinical investigation of internal limiting membrane staining and peeling using intravitreal brilliant blue G." Retina **26**(6): 623-630.
- Enaida, H. and T. Ishibashi (2008). "Brilliant blue in vitreoretinal surgery." Dev Ophthalmol **42**: 115-125.
- Enaida, H., T. Sakamoto, et al. (2002). "Morphological and functional damage of the retina caused by intravitreal indocyanine green in rat eyes." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **240**(3): 209-213.
- Ezra, E. and Z. J. Gregor (2004). "Surgery for idiopathic full-thickness macular hole: two-year results of a randomized clinical trial comparing natural history, vitrectomy, and vitrectomy plus autologous serum: Morfields Macular Hole Study Group RAEport no. 1." Arch Ophthalmol **122**(2): 224-236.
- Feron, E. J., M. Veckeneer, et al. (2002). "Trypan blue staining of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy." Arch Ophthalmol **120**(2): 141-144.
- Foster, R. E., M. R. Petersen, et al. (2002). "Negative indocyanine green staining of epiretinal membranes." Retina **22**(1): 106-108.
- Franze, K., J. Grosche, et al. (2007). "Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(20): 8287-8292.
- Freeman, W. R., S. P. Azen, et al. (1997). "Vitreotomy for the treatment of full-thickness stage 3 or 4 macular holes. Results of a multicentered randomized clinical trial. The Vitrectomy for Treatment of Macular Hole Study Group." Arch Ophthalmol **115**(1): 11-21.
- Gandorfer, A., C. Haritoglou, et al. (2012). "Residual cellular proliferation on the internal limiting membrane in macular pucker surgery." Retina **32**(3): 477-485.
- Gandorfer, A., E. M. Messmer, et al. (2001). "Indocyanine green selectively stains the internal limiting membrane." Am J Ophthalmol **131**(3): 387-388.
- Gass, J. D. (1988). "Idiopathic senile macular hole. Its early stages and pathogenesis." Arch Ophthalmol **106**(5): 629-639.
- Gass, J. D. (1999). "Muller cell cone, an overlooked part of the anatomy of the fovea centralis: hypotheses concerning its role in the pathogenesis of macular hole and foveomacular retinoschisis." Arch Ophthalmol **117**(6): 821-823.
- Graymore, C. N. (1970). "Metabolic survival of the isolated retina." Br Med Bull **26**(2): 130-133.
- Grisanti, S., P. Szurman, et al. (2004). "Histopathological analysis in experimental macular surgery with trypan blue." Br J Ophthalmol **88**(9): 1206-1208.
- Hagler, W. S. and U. Aturaliya (1971). "Macular puckers after retinal detachment surgery." Br J Ophthalmol **55**(7): 451-457.
- Halfter, W. (1998). "Disruption of the retinal basal lamina during early embryonic development leads to a retraction of vitreal end feet, an increased number of ganglion cells, and aberrant axonal outgrowth." J Comp Neurol **397**(1): 89-104.

- Halfter, W., S. Dong, et al. (2001). "Temporary disruption of the retinal basal lamina and its effect on retinal histogenesis." Dev Biol **238**(1): 79-96.
- Hanawa, I. and T. Tateishi (1970). "The effect of aspartate on the electroretinogram of the vertebrate retina." Experientia **26**(12): 1311-1312.
- Haritoglou, C., K. Eibl, et al. (2004). "Functional outcome after trypan blue-assisted vitrectomy for macular pucker: a prospective, randomized, comparative trial." Am J Ophthalmol **138**(1): 1-5.
- Haritoglou, C., A. Gandorfer, et al. (2004). "Trypan blue in macular pucker surgery: an evaluation of histology and functional outcome." Retina **24**(4): 582-590.
- Hee, M. R., C. A. Puliafito, et al. (1995). "Optical coherence tomography of macular holes." Ophthalmology **102**(5): 748-756.
- Heilweil, G., I. Komarowska, et al. (2010). "Normal physiological and pathophysiological effects of trypan blue on the retinas of albino rabbits." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(8): 4187-4194.
- Henrich, P. B., C. Haritoglou, et al. (2010). "Anatomical and functional outcome in brilliant blue G assisted chromovitrectomy." Acta Ophthalmol **88**(5): 588-593.
- Hoing, A., M. Remy, et al. (2011). "[An in-vivo evaluation of Brilliant Blue G in macular surgery]." Klin Monbl Augenheilkd **228**(8): 724-728.
- Holmgren, F. (1879). Ueber die Retinaströme., Unters.Physiol.Inst.Univ.Heidelb. 3.
- Hong, J., S. X. Deng, et al. (2012). "Enzymatic vitreolysis with ocriplasmin for vitreomacular traction and macular holes." N Engl J Med **367**(21): 2053; author reply 2054.
- Iannetti, L., M. Accorinti, et al. (2011). "Role of the Intravitreal Growth Factors in the Pathogenesis of Idiopathic Epiretinal Membrane." Investigative Ophthalmology & Visual Science **52**(8): 5786-5789.
- Ibsen, K. H. (1961). "The Crabtree effect: a review." Cancer Res **21**: 829-841.
- Jamison, J. A., R. A. Bush, et al. (2001). "Characterization of the rod photoresponse isolated from the dark-adapted primate ERG." Vis Neurosci **18**(3): 445-455.
- Januschowski, K. (2010). Elektrophysiologische Toxizitätsuntersuchungen intravitrealer Pharmaka am Modell der isolierten und umströmten Vertebratennetzhaut Tübingen, Eberhard-Karls-Universität.
- Januschowski, K., S. Mueller, et al. (2012). "Investigating the biocompatibility of two new heavy intraocular dyes for vitreoretinal surgery with an isolated perfused vertebrate retina organ culture model and a retinal ganglion cell line." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **250**(4): 533-545.
- Januschowski, K., S. Mueller, et al. (2011). "The effects of the intraocular dye brilliant blue G (BBG) mixed with varying concentrations of glucose on retinal function in an isolated perfused vertebrate retina." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **249**(4): 483-489.
- Januschowski, K., S. Mueller, et al. (2012). "Evaluating retinal toxicity of a new heavy intraocular dye, using a model of perfused and isolated retinal cultures of bovine and human origin." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.
- Januschowski, K., S. Mueller, et al. (2012). "Evaluating retinal toxicity of a new heavy intraocular dye, using a model of perfused and isolated retinal cultures of bovine and human origin." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **250**(7): 1013-1022.
- Kadonosono, K., N. Itoh, et al. (2000). "Staining of internal limiting membrane in macular hole surgery." Arch Ophthalmol **118**(8): 1116-1118.

- Kang Derwent, J. J. and R. A. Linsenmeier (2001). "Intraretinal analysis of the a-wave of the electroretinogram (ERG) in dark-adapted intact cat retina." Vis Neurosci **18**(3): 353-363.
- Kanski, J. J., B. Bowling, et al. (2011). Clinical ophthalmology : a systematic approach. Edinburgh ; New York, Elsevier/Saunders.
- Karpe, G. (1946). The basis of clinical electroretinography, Einar Munksgaard.
- Karwoski, C. J. and X. Xu (1999). "Current source-density analysis of light-evoked field potentials in rabbit retina." Vis Neurosci **16**(2): 369-377.
- Katz, J. J., H. L. Crespi, et al. (1962). "Course of deuteriation and some physiological effects of deuterium in mice." Am J Physiol **203**: 907-913.
- Kelly, N. E. and R. T. Wendel (1991). "Vitreous surgery for idiopathic macular holes. Results of a pilot study." Arch Ophthalmol **109**(5): 654-659.
- Kernt, M., C. Hirneiss, et al. (2012). "Indocyanine green increases light-induced oxidative stress, senescence, and matrix metalloproteinases 1 and 3 in human RPE cells." Acta Ophthalmol **90**(6): 571-579.
- Kim, J. W., W. R. Freeman, et al. (1995). "Baseline characteristics, natural history, and risk factors to progression in eyes with stage 2 macular holes. Results from a prospective randomized clinical trial. Vitrectomy for Macular Hole Study Group." Ophthalmology **102**(12): 1818-1828; discussion 1828-1819.
- Kodjikian, L., T. Richter, et al. (2005). "Toxic effects of indocyanine green, infracyanine green, and trypan blue on the human retinal pigmented epithelium." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **243**(9): 917-925.
- Kokame, G. T. and S. de Bustros (1995). "Visual acuity as a prognostic indicator in stage I macular holes. The Vitrectomy for Prevention of Macular Hole Study Group." Am J Ophthalmol **120**(1): 112-114.
- Kwok, A. K., T. Y. Lai, et al. (2003). "Internal limiting membrane staining with various concentrations of indocyanine green dye under air in macular surgeries." Am J Ophthalmol **136**(2): 223-230.
- Laqua, H. (1979). "[Pars plana vitrectomy--results and complication of 100 consecutive cases (author's transl)]." Klin Monbl Augenheilkd **175**(5): 602-611.
- Lee, J. E., T. J. Yoon, et al. (2003). "Toxicity of indocyanine green injected into the subretinal space: subretinal toxicity of indocyanine green." Retina **23**(5): 675-681.
- Lewis, M. L., S. M. Cohen, et al. (1996). "Bilaterality of idiopathic macular holes." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **234**(4): 241-245.
- Lincoff, H. and I. Kreissig (2000). "Changing patterns in the surgery for retinal detachment: 1929 to 2000." Klin Monbl Augenheilkd **216**(6): 352-359.
- Luke, C., M. Luke, et al. (2005). "Retinal tolerance to dyes." Br J Ophthalmol **89**(9): 1188-1191.
- Luke, M., K. Januschowski, et al. (2008). "Electrophysiological effects of Brilliant Blue G in the model of the isolated perfused vertebrate retina." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **246**(6): 817-822.
- Luke, M., K. Januschowski, et al. (2008). "The effects of triamcinolone crystals on retinal function in a model of isolated perfused vertebrate retina." Exp Eye Res **87**(1): 22-29.
- Luke, M., K. Januschowski, et al. (2010). "The safety profile of alkylphosphocholines in the model of the isolated perfused vertebrate retina." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **248**(4): 511-518.

- Luke, M., K. Januschowski, et al. (2009). "The effects of ranibizumab (Lucentis) on retinal function in isolated perfused vertebrate retina." Br J Ophthalmol **93**(10): 1396-1400.
- Luke, M., K. Januschowski, et al. (2010). "Effects of pegaptanib sodium on retinal function in isolated perfused vertebrate retina." Curr Eye Res **35**(3): 248-254.
- Luke, M., K. Januschowski, et al. (2007). "The retinal tolerance to bevacizumab in co-application with a recombinant tissue plasminogen activator." Br J Ophthalmol **91**(8): 1077-1082.
- Luke, M., M. Weiergraber, et al. (2005). "The isolated perfused bovine retina--a sensitive tool for pharmacological research on retinal function." Brain Res Brain Res Protoc **16**(1-3): 27-36.
- Machemer, R. (1974). "A new concept for vitreous surgery: 7. two instrument techniques in pars plana vitrectomy." Archives of Ophthalmology **92**(5): 407-412.
- Machemer, R., H. Buettner, et al. (1971). "Vitrectomy: a pars plana approach." Transactions-American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology **75**(4): 813.
- Mackenzie, S. E., A. Gandorfer, et al. (2010). "Ultrastructure and retinal imaging of internal limiting membrane: a clinicopathologic correlation of trypan blue stain in macular hole surgery." Retina **30**(4): 655-661.
- Marmor, M. F. (1979). "Retinal detachment from hyperosmotic intravitreal injection." Invest Ophthalmol Vis Sci **18**(12): 1237-1244.
- Marmor, M. F., L. J. Martin, et al. (1980). "Osmotically induced retinal detachment in the rabbit and primate. Electron microscopy of the pigment epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **19**(9): 1016-1029.
- McCannel, C. A., J. L. Ensminger, et al. (2009). "Population-based Incidence of Macular Holes." Ophthalmology **116**(7): 1366-1369.
- McCarty, D. J., B. N. Mukesh, et al. (2005). "Prevalence and associations of epiretinal membranes in the visual impairment project." American Journal of Ophthalmology **140**(2): 288-294.
- Medina, D. C., X. Li, et al. (2005). "Pharmaco-thermodynamics of deuterium-induced oedema in living rat brain via ¹H₂O MRI: implications for boron neutron capture therapy of malignant brain tumours." Phys Med Biol **50**(9): 2127-2139.
- Melles, G. R., P. W. de Waard, et al. (1999). "[Staining the lens capsule with trypan blue for visualizing capsulorhexis in surgery of mature cataracts]." Klin Monbl Augenheilkd **215**(6): 342-344.
- Miller, B. (1997). "Epiretinal macular membranes: pathogenesis and treatment." Dev Ophthalmol **29**: 61-63.
- Missner, S. and U. Kellner (2012). "Comparison of different screening methods for chloroquine/hydroxychloroquine retinopathy: multifocal electroretinography, color vision, perimetry, ophthalmoscopy, and fluorescein angiography." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **250**(3): 319-325.
- Narayanan, R., M. C. Kenney, et al. (2005). "Toxicity of indocyanine green (ICG) in combination with light on retinal pigment epithelial cells and neurosensory retinal cells." Curr Eye Res **30**(6): 471-478.
- Oakley, B., 2nd and D. G. Green (1976). "Correlation of light-induced changes in retinal extracellular potassium concentration with c-wave of the electroretinogram." J Neurophysiol **39**(5): 1117-1133.

- Park, D. W., P. U. Dugel, et al. (2003). "Macular pucker removal with and without internal limiting membrane peeling: pilot study." Ophthalmology **110**(1): 62-64.
- Recchia, F. M., I. U. Scott, et al. (2010). "Small-gauge pars plana vitrectomy: a report by the American Academy of Ophthalmology." Ophthalmology **117**(9): 1851-1857.
- Richter, S. H., J. P. Garner, et al. (2009). "Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments?" Nat Methods **6**(4): 257-261.
- Schmid-Kubista, K. E., P. D. Lamar, et al. (2010). "Comparison of macular function and visual fields after membrane blue or infracyanine green staining in vitreoretinal surgery." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **248**(3): 381-388.
- Schmidt-Erfurth, U. (2002). "[Macular holes. A treatable disease picture with unsolved problems]." Ophthalmologie **99**(8): 609-612.
- Shimada, H., H. Nakashizuka, et al. (2009). "Double staining with brilliant blue G and double peeling for epiretinal membranes." Ophthalmology **116**(7): 1370-1376.
- Sickel, W. (1966). The isolated retina maintained in a circulating medium. Combined optical and electrical investigations of metabolic aspects of the generation of the electroretinogram. Clinical Electroretinography. Oxford, Pergamon Press: 115-124.
- Sickel, W. (1969). "Energy metabolism of the retina." Exp Eye Res **8**(2): 252.
- Stalmans, P., M. S. Benz, et al. (2012). "Enzymatic vitreolysis with ocriplasmin for vitreomacular traction and macular holes." N Engl J Med **367**(7): 606-615.
- Stalmans, P., E. H. Van Aken, et al. (2002). "Toxic effect of indocyanine green on retinal pigment epithelium related to osmotic effects of the solvent." Am J Ophthalmol **134**(2): 282-285.
- Stockton, R. A. and M. M. Slaughter (1989). "B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity." J Gen Physiol **93**(1): 101-122.
- Stoddart, M. J. (2011). "Cell viability assays: introduction." Methods Mol Biol **740**: 1-6.
- Tanner, V. and T. H. Williamson (2000). "Watzke-Allen slit beam test in macular holes confirmed by optical coherence tomography." Arch Ophthalmol **118**(8): 1059-1063.
- Thaler, S., F. Schuttauf, et al. (2009). "[Biocompatibility of dyes for vitreoretinal surgery]." Ophthalmologie **106**(1): 11-15.
- Thompson, J. T., B. M. Glaser, et al. (1994). "Effects of intraocular bubble duration in the treatment of macular holes by vitrectomy and transforming growth factor-beta 2." Ophthalmology **101**(7): 1195-1200.
- Thomson, J. F. (1960). "Physiological effects of D20 in mammals." Ann N Y Acad Sci **84**: 736-744.
- Ting, F. S. and A. K. Kwok (2005). "Treatment of epiretinal membrane: an update." Hong Kong Med J **11**(6): 496-502.
- Tsui, I., C. K. Pan, et al. (2012). "Ocriplasmin for vitreoretinal diseases." J Biomed Biotechnol **2012**: 354979.
- van Dooren, B. T., W. H. Beekhuis, et al. (2004). "Biocompatibility of trypan blue with human corneal cells." Arch Ophthalmol **122**(5): 736-742.
- Veckeneer, M., K. van Overdam, et al. (2001). "Ocular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rabbit eyes." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **239**(9): 698-704.
- von Jagow, B., A. Hoing, et al. (2009). "Functional outcome of indocyanine green-assisted macular surgery: 7-year follow-up." Retina **29**(9): 1249-1256.

- Wang, M. Y., D. Nguyen, et al. (2009). "Vitreopapillary adhesion in macular hole and macular pucker." Retina **29**(5): 644-650.
- Williamson, T. H. (2008). Vitreoretinal surgery. Berlin ; New York, Springer.
- Wollensak, G. (2008). "Biomechanical changes of the internal limiting membrane after indocyanine green staining." Dev Ophthalmol **42**: 82-90.
- Wu, Y., W. Zhu, et al. (2012). "Indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling in macular hole surgery: a meta-analysis." PLoS One **7**(11): e48405.
- Yuen, D., J. Gonder, et al. (2009). "Comparison of the in vitro safety of intraocular dyes using two retinal cell lines: a focus on brilliant blue G and indocyanine green." Am J Ophthalmol **147**(2): 251-259 e252.

XI Danksagung

Ich danke meinen Eltern Manfred und Elisabeth Müller für Ihre Unterstützung, ohne sie wäre dies nicht möglich gewesen. Ebenso meinem Bruder Matthias und meiner Schwester Bettina Müller.

Julia Deibert für ihre Geduld, Zuspruch, Motivation und Unterstützung in sämtlichen Lebenslagen, sowie ihrer Familie.

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Dr. med. Kai Januschowski bedanken, der mit viel Energie und Kreativität diese Dissertation vorangetrieben und mich stets motiviert und angespornt hat.

Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Peter Szurman und Prof. Dr. med. Karl Ulrich Bartz-Schmidt für die sympathische und einladende Aufnahme an der Klinik, für die Überlassung des Themas und stete Unterstützung.

Den Kollegen aus dem Breuningerbau, insbesondere Prof. Dr. med. Martin Spitzer, Dr. rer. nat. Sven Schnichels, Johanna Hofmann und Dr. med. Max Schultheiß für die tolle Zusammenarbeit, Hilfe und Humor.

Veterinärmedizinerin Frau Natalia Quindt und Herrn Waldemar Quindt, deren Unterstützung wesentlich zum Erfolg beigetragen hat.

Frau Hofer für die besten Poster.

Der Feinmechanischen Werkstatt für innovatives Design.

XII Bisher aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

- 1) Januschowski, K., S. Mueller, et al. (2011). "The effects of the intraocular dye brilliant blue G (BBG) mixed with varying concentrations of glucose on retinal function in an isolated perfused vertebrate retina." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **249**(4): 483-489.

- 2) Januschowski, K., S. Mueller, et al. (2012). "Evaluating retinal toxicity of a new heavy intraocular dye, using a model of perfused and isolated retinal cultures of bovine and human origin." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **250**(7): 1013-1022.

- 3) Januschowski, K., S. Mueller, et al. (2012). "Investigating the biocompatibility of two new heavy intraocular dyes for vitreoretinal surgery with an isolated perfused vertebrate retina organ culture model and a retinal ganglion cell line." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **250**(4): 533-545.