Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen

Universitäts-Augenklinik

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

Triesence®

vs.

Volon-A® und Kenalog®

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Kathrin Ellen Rinker
aus
VS-Schwenningen

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Spitzer

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Lüke

Gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 8

1.1. GLUKOKORTIKOIDE IN DER AUGENHEILKUNDE 8
1.2. TRIAMCINOLON 9
1.2.1. EIGENSCHAFTEN DES TRIAMCINOLONS 10
1.2.1.1. Antiinflammatorische Wirkung 10
1.2.1.2. Antiödematöse Wirkung 10
1.2.1.3. Antiproliferative Wirkung 10
1.2.1.4. Antiangiogene Wirkung 11
1.2.1.5. Löslichkeit von Triamcinolon 11
1.2.2. KLINISCHE INDIKATIONEN DER INTRAVITREALEN TRIAMCINOLONGABE 11
1.2.3. DIE INTRAVITREALE INJEKTION 12
1.2.4. KLINISCHE NEBENWIRKUNGEN 13
1.2.5. VORANGEHENDE STUDIEN ZUM WIRKSTOFF TRIAMCINOLON 13
1.2.6. VORANGEGANGENE STUDIEN DER AUGENKLINIK TÜBINGEN ZUM WIRKSTOFF TRIAMCINOLON 14
1.3. VERWENDETE MEDIKAMENTE MIT DEM WIRKSTOFF TRIAMCINOLON 15
1.3.1. VOLON-A® 15
1.3.2. KENALOG® 16
1.3.3. TRIESENCE® 16
1.3.4. DIE DREI MEDIKAMENTE IM VERGLEICH 17
1.4. FRAGESTELLUNG 18

2. MATERIAL UND METHODIK 19

2.1. VERWENDETE MATERIALIEN 19
2.1.1. REAGENZIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN 19

2.1.2. VERWENDETE GERÄTE 20
2.1.3. VERWENDETE ZELLKULTUREN 21
2.1.3.1. ARPE-19-Zellkultur 21
2.1.3.2. RGC-5-Zellkultur 22
2.1.3.3. Kultivierung der Zelllinien 22
2.1.3.4. Der Glaskörper- Corpus vitreum 24
2.1.4. VERWENDETE NÄHRMEDIEN 24
2.1.4.1. ARPE-19-Zellmedium 24
2.1.4.2. RGC-5-Zellmedium 25
2.1.4.3. Starving Medium 25
2.2. VORBEREITUNG DER ZELLKULTUREN 25
2.3. VORBEREITUNG DER GLASKÖRPER 26
2.4. VORBEREITUNG DER MEDIKAMENTE TRIESENCE, VOLON-A UND KENALOG 26
2.4.1. PRINZIP DER BOYDEN-KAMMER 27
2.5. VERWENDETE METHODEN 28
2.5.1. MTT-TEST 28
2.5.1.1. Herstellung des MTT1 28
2.5.1.2. Herstellung des MTT2 28
2.5.1.3. Wirkungsweise 29
2.5.2. LIVE-DEAD-TEST 30
2.5.2.1. Herstellung 30
2.5.2.2. Wirkungsweise 30
2.5.2.3. Versuchsablauf 30
2.5.3. Statistische Analysen 31
2.5. VERSUCHSPROTOKOLL 32

3. ERGEBNISSE 34

3.1. ARPE-19-ZELLEN 34
3.1.1. TOXIZITÄTSTEST 34
3.1.1.1. Toxizität von Triesence und Volon-A bei direkter Exposition der ARPE-19-Zellen 34

3.1.1.2. Toxizität von Triesence und Volon-A bei direkter und indirekter Exposition der ARPE-19-Zellen 35
3.1.1.3. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog bei direkter Exposition der ARPE-19-Zellen..... 36
3.1.1.4. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog bei indirekter Exposition der ARPE-19-Zellen..... 37
3.1.2. LIVE-DEAD-FLUORESZENZ-TEST 39
3.1.2.1. Viabilität der ARPE-19-Zellen nach direkter Exposition mit Volon-A und Triesence 39
3.1.2.2. Viabilität der ARPE-19 nach direkter und indirekter Exposition mit Volon-A, Triesence und Kenalog 41
3.2. RGC-5-ZELLEN 44
3.2.1. TOXIZITÄTSTEST 44
3.2.1.1. Toxizität von Triesence und Volon-A bei direkter und indirekter Exposition der RGC-5 44
3.2.1.2. Toxizität von Triesence und Volon-A bei direkter und indirekter Exposition der RGC-5 bei einer Konzentration von 0,1mg/ml..... 45
3.2.1.3. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog bei direkter Exposition der RGC-5 46
3.2.1.4. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog bei direkter Exposition der RGC-5 47
3.2.1.5. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog bei direkter und indirekter Exposition der RGC-5 49
3.2.1.6. Toxizität von zentrifugiertem Kenalog und dessen Konservierungsmittel Benzylalkohol 50
3.2.1.7. Toxizität von Kenalog auf die RGC-5 bei direkter Exposition nach Zentrifugation und nach Sterilfiltration 51
3.2.1.8. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog auf die RGC-5-Zellen mit und ohne vorhandenem Glaskörper 52
3.2.2. LIVE-DEAD-FLUORESZENZ-TEST 54
3.2.2.1. Viabilität der RGC-5-Zellen nach direkter Exposition mit Volon-A und Triesence 54

3.2.2.2. Viabilität der RGC-5-Zellen nach direkter und indirekter Exposition mit Volon-A und Triesence 56
3.2.2.3. Viabilität der RGC-5-Zellen nach direkter und indirekter Exposition mit Volon-A, Triesence und Kenalog 58

4. DISKUSSION 60

4.1. EINFLUSS DER UNTERSCHIEDLICHEN TRIAMCINOLONPRÄPARATE AUF ARPE-19- UND RGC-5-ZELLEN 60
4.2. TOXISCHE WIRKUNG DES KORTIKOSTEROIDS TRIAMCINOLON 61
4.3. KONSERVIERUNGSMITTELFREIHEIT DES TRIESENCE 63
4.4. KONSERVIERUNGSMITTEL BENZYLAKOHOL IM PRÄPARAT KENALOG 63
4.5. TRIESENCE UND KENALOG 64
4.6. ABHÄNGIGKEIT DER TOXIZITÄT VON DER AGGREGATGRÖßE DER TRIAMCINOLONPRÄPARATE 66
4.7. DISKREPANZ ZWISCHEN KLINISCHEN UND EXPERIMENTELLEN IN VITRO ERGEBNISSEN 68
4.8. TRIESENCE VS. KENALOG UND VOLON-A 69

5. ZUSAMMENFASSUNG 70

6. SUMMARY 71

7. LITERATURVERZEICHNIS 72

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ARPE-19	Adulte retinale Pigmentepithel-19-Zellen
D-MEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EthD-1	Ehtidium homodimer-1
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
GK	Glaskörper
KL	Kenalog
KM	Konservierungsmittel
KTR	Kontrolle
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid
PBS	Phosphate buffered saline
PFTA	vom Konservierungsmittel befreites Volon-A (preservative-free triamcinolone acetonide)
RGC-5	Retinale Ganglienzellen
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TA	Triamcinolon
TR	Triesence

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel des Triamcinolons

Abb. 2: Intravitreale Injektion [16]

Abb. 3: Digital erstellte Aufnahme von adulten retinalen Pigmentepithelzellen (ARPE-19)

Abb. 4: Digital erstellte Aufnahme von retinalen Ganglienzellen (RGC-5)

Abb. 5: Boyden-Kammer

Abb. 6: Reduktion des MTT zu Formazan [51]

Abb. 7: Diagramm MTT-Test, ARPE-19; TR, PFTA, 1mg/ml, ohne Inserts

Abb. 8: Diagramm MTT-Test; ARPE-19; TR, PFTA, 1mg/ml, mit und ohne Inserts

Abb. 9: Diagramm MTT-Test; ARPE-19; TR, PFTA, KL, ohne Inserts

Abb. 10: Diagramm MTT-Test; ARPE-19; TR; PFTA,KL, mit Inserts

Abb. 11: Aufnahmen des Live-Dead-Tests mit PFTA und TR, 1mg/ml, ohne Inserts

Abb. 12: Diagramm zur Auswertung des Live-Dead-Tests der ARPE-19 mit TR und PFTA, 1mg/ml, ohne Inserts

Abb. 13: Aufnahmen des Live-Dead-Tests mit PFTA, TR und Kenalog der ARPE-19 bei 1mg/ml, mit und ohne Inserts

Abb. 14: Diagramm zur Auswertung des Live-Dead-Tests der ARPE-19 mit

Abb. 15: Diagramm MTT-Test, RGC-5; TR, PFTA, 1mg/ml mit und ohne Inserts PFTA, TR und KL, 1mg/ml, mit und ohne Inserts

Abb. 16: Diagramm MTT-Test, RGC-5; TR, PFTA, 0,1mg/ml ohne Inserts

Abb. 17: Diagramm MTT-Test, RGC-5; TR, PFTA, KL, 1mg/ml, ohne Inserts

Abb. 18: Diagramm MTT-Test, RGC-5; TR, PFTA; KL, 1mg7ml, mit Inserts

Abb. 19: Unterschiedliche kristalline Form der Triamcinolonpräparate

Abb. 20: Diagramm MTT-Test, RGC-5; TR, PFTA, KL, ohne Inserts, TR, PFTA mit Inserts, KL zenrifugiert, 1mg/ml

Abb. 21: Diagramm MTT-Test, RGC-5; KL zentrifugiert 1mg/ml, KM Benzylalkohol

Abb. 22: Diagramm MTT-Test, RGC-5; KL, mit und ohne Inserts, KL sterilfiltriert, 1mg/ml

Abb. 23: Diagramm MTT-Test; RGC-5, mit und ohne Glaskörper bedeckt; TR, PFTA, KL, 1mg/ml

Abb. 24: Aufnahmen des Live-Dead-Tests mit PFTA und TR der RGC-5, ohne Filter, 1mg/ml

Abb. 25: Diagramm zur Auswertung des Live-Dead-Test der RGC-5 mit PFTA und TR, ohne Inserts

Abb. 26: Aufnahmen des Live-Dead-Tests der RGC-5 mit PFTA und TR, 1mg/ml, mit und ohne Inserts

Abb. 27: Diagramm zur Auswertung des Live-Dead-Tests der RGC-5 mit PFTA und TR, mit und ohne Inserts

Abb. 28: Aufnahmen des Live-Dead-Tests der RGC-5 mit PFTA, TR und Kenalog, mit und ohne Filter, KL zentrifugiert, 1mg/ml

Abb. 29: Diagramm zur Auswertung des Live-dead-Tests der RGC-5 mit PFTA, TR und KL, 1mg/ml, mit und ohne Inserts, KL zentrifugiert

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Versuchsprotokoll

Tab. 2: Aggregatgröße der Triamcinolonpräparate

1. Einleitung

Glukokortikoide sind aus der heutigen Medizin nicht mehr wegzudenken. Durch ihr breites Wirkungsspektrum werden sie in den verschiedensten Fachbereichen eingesetzt.

Unter anderem bewirken sie die Immunsuppression bei Organtransplantationen, lindern Gingivitis in der Zahnheilkunde und wirken antiinflammatorisch bei okulären Augenentzündungen.

Natürliche Glukokortikoide sind Steroidhormone, die in den Nebennieren aus Cholesterin synthetisiert werden. Für den menschlichen Stoffwechsel spielen sie eine zentrale Rolle.
Sie bewirken eine Steigerung der Glukoneogenese und damit einen Anstieg des Blutzuckers. Zudem verursachen sie einen verstärkten Proteinkatabolismus. Die daraus gewonnenen Aminosäuren werden größtenteils dazu verwendet, wiederum Glucose aufzubauen. Außerdem bewirken sie, dass der Körper vermehrt Lipolyse betreibt, wobei Ketonkörper entstehen. Glukokortikoide dienen somit dazu in Stresssituationen gespeicherte Energie zu mobilisieren. Eine der wichtigsten Wirkungen dieser Hormongruppe ist die Hemmung von Immunprozessen [17].

Neben den körpereigenen Glukokortikoiden gibt es von der Pharmaindustrie synthetisch hergestellte Glukokortikoide, die speziell modifiziert wurden und in der Medizin zur Therapie unterschiedlichster Erkrankungen eingesetzt werden.

1.1. Glukokortikoide in der Augenheilkunde

Die Anwendung von Glukokortikoiden ist bereits seit Jahrzehnten ein wichtiger Bestandteil in der therapeutischen Augenheilkunde [38].
Auf Grund ihrer besonderen Eigenschaften schienen sie hierfür prädestiniert. Sie verfügen neben ihrer antiinflammatorischen und antiödematösen Wirkung zusätzlich über antiproliferative und antiangiogene Effekte.

Machemer war einer der Ersten, der Glukokortikoide direkt in den Glaskörper injizierte, um so den unmittelbaren Kontakt des Wirkstoffs mit dem Erkrankungsherd im menschlichen Bulbus zu erzielen [28, 32]. Anfänglich war jedoch die Wirkungsdauer der löslichen Kortikosteroide durch ihre kurze biologische Halbwertzeit von nur drei Stunden sehr gering [13].

1980 wurde erstmals das synthetische Glukokortikoid Triamcinolon als kristalline Suspension von Tano und Machemer direkt ins Auge injiziert [46]. In dieser Form konnte so ein Depoteffekt erreicht werden, der eine über Monate andauernde Freisetzung des Wirkstoffs im Auge gewährleistete.

Intravitreal injiziertes Triamcinolon gilt heute nach wie vor als eine wichtige Methode zur Behandlung vieler Netzhauterkrankungen [25].

1.2. Triamcinolon

Das synthetisch hergestellte Triamcinolon Acetonid (9α-fluoro-16 α-hydroxy-prednisolon) zählt zu der Gruppe der Glukokortikoide.

Diese Substanz ist ein Derivat des Cholesterins, wie alle Glukokortikoide, und besteht aus 21 Kohlenstoffatomen, die sich zu vier Ringen zusammenlagern. Zwischen C4 und C5 befindet sich eine Doppelbindung, an C1 eine Ketogruppe. Anders als die natürlichen Glukokortikoide trägt es an C9 zusätzlich ein Fluoratom [11].

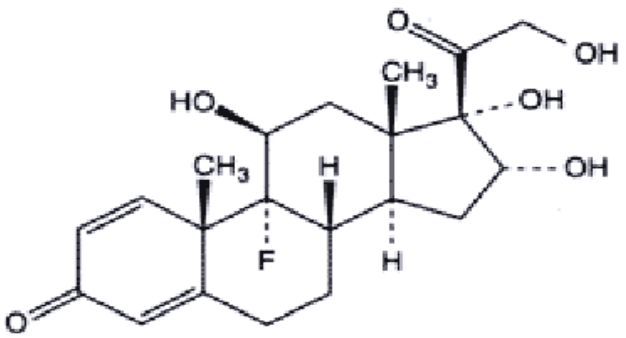


Abb. 1: *Strukturformel des Triamcinolons*

1.2.1. Eigenschaften des Triamcinolons

Es besitzt eine antiinflammatorische, antiödematöse, antiproliferative, sowie antiangiogene Wirkung und weist ein geringes Löslichkeitsprodukt auf.

Durch diese Eigenschaften eignet sich der Wirkstoff Triamcinolon zur Therapie vieler Erkrankungen. In der Augenheilkunde kommt es bei der intravitrealen Injektion zur Linderung mehrerer intraokularer Erkrankungen und zur Visualisierung des Glaskörpers bei der Vitrektomie zum Einsatz.

1.2.1.1. Antiinflammatorische Wirkung

Triamcinolon wirkt entzündungshemmend, indem es die Prostaglandinsynthese hemmt und die Freisetzung von Arachidonsäure verhindert [6]. Zudem hemmt es die Migration von Leukozyten, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und die Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen [37].

1.2.1.2. Antiödematöse Wirkung

Der antiödematöse Effekt des Präparats kann bisher vom Mechanismus her nicht nachvollzogen werden. Erklärt wird dieser vor allem durch eine allgemeine Verringerung der vaskulären Durchlässigkeit der Steroide. Klinische Studien haben diese antiödematose Wirkung im Bereich der Netzhaut bereits nachgewiesen [18, 30].

1.2.1.3. Antiproliferative Wirkung

Triamcinolon wirkt durch direkte Hemmung der Fibroblasten antiproliferativ [7]. Zusätzlich werden die Kollagenfreisetzung [31] und das Zytokin TGFβ1, das die Zellproliferation reguliert, gehemmt [8].

1.2.1.4. Antiangiogene Wirkung

Die antiangiogene Wirkung entsteht durch die indirekte Hemmung der Migration und Aktivierung von Entzündungszellen [19], die die Produktion von Heparin, Wachstumsfaktoren und weiteren proangiogenen Stoffen auslösen[36]. Zudem stört das Präparat den Umbau der extrazellulären Matrix [47], außerdem werden die Endothelzellen direkt gehemmt [41].

1.2.1.5. Löslichkeit von Triamcinolon

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist, dass Triamcinolon in kristalliner Form vorliegt und ein geringes Löslichkeitsprodukt besitzt.

Die Entstehung von Triamcinolonkristallen setzt ein, wenn dessen Konzentration über sein Löslichkeitsprodukt von 36 µg/ml steigt [5, 14].

Das bedeutet, dass in wässriger Lösung nur geringe Anteile der Kristalle in Lösung gehen, bis eine bestimmte Konzentration erreicht ist. Solange die Konzentration aufrecht erhalten bleibt, liegen die Kristalle unverändert vor. Erst wenn die Konzentration wieder absinkt, geht das Medikament weiter in Lösung.

Somit entsteht ein Depoteffekt und das Präparat kann seine Wirkung über längere Zeit entfalten. Nach Injektion von 4mg beträgt dessen Halbwertszeit 18,6 Tage und besitzt deshalb eine Wirkungsdauer von 13 Wochen [4].

1.2.2. Klinische Indikationen der intravitrealen Triamcinolongabe

Indikationen für die intravitreale Injektion sind unter anderem Makulaödeme nach venösen Netzhautverschlüssen, die sympathische Ophtalmie, chronische Uveitis [2], das diabetische Makulaödem [22, 29], altersbedingte Makuladegeneration [9, 24] oder auch postoperative zystoide Makulaödeme (Irvine-Gass Syndrom). Zudem wird es zu Visualisierung des Glaskörpers bei der Vitrektomie, also der Entfernung des Glaskörpers, angewandt [54].

1.2.3. Die intravitreale Injektion

Die Injektion von Medikamenten in den Glaskörperraum des Auges ist eine wichtige Therapie bei Erkrankungen von Retiana oder Makula, die eine erhebliche Beeinträchtigung der Sehstärke auslösen können.

Bei der intravitrealen Injektion werden Medikamente direkt in den Glaskörper gespritzt. Das Auge wird zuerst per Tropfenanästhesie betäubt [48]. Die Bindehaut und die Lidhaut werden mit einer Povidon-Jod-Lösung desinfiziert, durch Einsetzen eines Spekulums wird der Lidschlag unterdrückt. Der Einstich erfolgt, um Verletzung von Linse oder Netzhaut zu vermeiden, über die Pars plana, ein 3,5- 4mm breites Band am hinteren Teil des Ziliarkörpers, das sich auf die Bindehaut projiziert [3]. Die Pars plana bietet einen risikoarmen Zugang in das Augeninnere, da sie weder große Gefäße, noch funktionell unersetzliches Gewebe enthält [58]. Die 12mm lange Kanüle wird sechs bis sieben Millimeter bis zur Bulbusmitte eingeführt. Anschließend folgt eine gleichmäßige, vorsichtige Injektion des Medikaments [1].

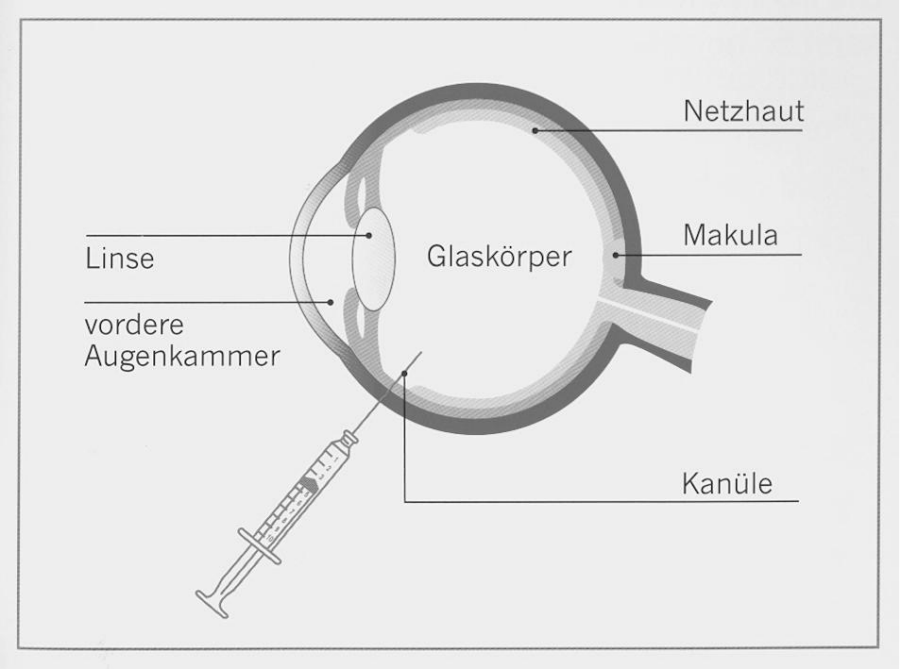


Abb.2: *Intravitreale Injektion[16]*

1.2.4. Klinische Nebenwirkungen

Triamcinolon kann unter anderem zum Steroidglaukom führen [12, 21]. Über ein Drittel der mit diesem Wirkstoff therapierten Patienten wiesen einen pathologisch erhöhten Augendruck auf, wobei fast 10% ein potenziell Visus bedrohendes Niveau erreichten. In Einzelfällen musste operativ eingegriffen werden [23].

Zudem wurde über Jahre hinweg die sterile Pseudoendophthalmitis bei mit Triamcinolon therapierten Patienten beobachtet. Die Entstehung dieser Erkrankung wurde auf das im Präparat enthaltene Konservierungsmittel oder andere Inhaltsstoffe der Suspension zurückgeführt [43].

Ferner kann es zu iatrogenen Netzhautablösungen, Glaskörperblutungen oder Linsenverletzungen kommen. Die gefürchtetste, obgleich glücklicherweise recht seltene Komplikation, stellt eine infektiöse Endophthalmitis dar.

1.2.5. Vorangehende Studien zum Wirkstoff Triamcinolon

Mehrere Studien belegten die klinische Sicherheit des Medikaments [9, 21]. Bestätigt wurde dieses Ergebnis zusätzlich durch Tierversuche [26, 32].

Jedoch wurde bereits früh vermutet, dass das enthaltene Konservierungsmittel einen zytotoxischen Effekt ausübte [15].

Nachdem das Medikament deshalb vor dessen Verwendung durch spezielle Techniken zusätzlich aufgereinigt wurde, konnte die Rate der sterilen Pseudoendophthalmitiden deutlich gesenkt werden [20, 35]. Jedoch zeigte sich bei in vitro Versuchsreihen, bei denen Triamcinolon konservierungsmittelfrei gemacht wurde, dass die Toxizität nicht vom Konservierungsmittel herrührte, sondern vom Wirkstoffs selbst [59].

Auch andere Studien belegen eine ausgeprägte Toxizität von Triamcinolon [44]. Außerdem wurde festgestellt, dass besonders in unmittelbarer Nähe

verklumpter Triamcinolonkristalle schon bei niedrigen Konzentrationen vermehrtes Zellsterben stattfindet [34, 39].

1.2.6. Vorangegangene Studien der Augenklinik Tübingen zum Wirkstoff Triamcinolon

Die Tübinger Arbeitsgruppe „Ophthalmologische Biotechnologie“ beschäftigt sich bereits seit mehreren Jahren mit dem Glukokortikoid Triamcinolon.

Sie verglich die Auswirkungen von aufgereinigtem und nicht aufgereinigtem Triamcinolon in unterschiedlichen Konzentrationen auf ARPE 19- Zellen, wobei sie dabei die Zellen einerseits dem direkten Kontakt des Präparats, andererseits den Zelllayer mittels Boyden-Kammer nur dem gelösten Stoff aussetzten. Zusätzlich wurde der Einfluss des Konservierungsmittels Benzylalkohol in unterschiedlichen Konzentrationen getestet [44].

Es zeigte sich, dass aufgereinigtes Triamcinolon, das nur indirekt mit den Zellen in Kontakt kam, genauso wie das Konservierungsmittel, selbst bei hohen Konzentrationen keinerlei zytotoxische Effekte ausübte.

Die Versuche mit dem nicht aufgereinigtem Triamcinolon zeigten bei Einsatz der Boyden-Kammer konzentrationsabhängig einen leicht negativen Einfluss auf die Zellviabilität.

Ohne Filter hingegen, kam es innerhalb 24 Stunden zu einem apoptotischen Effekt, dessen Intensität mit der Konzentration des Medikaments zunahm.

Zudem stellte die Arbeitsgruppe fest, dass unter Einsatz von Filtern die wachstumshemmende Wirkung des Triamcinolon bei klinisch relevanten Dosen komplett reversibel ist, wohingegen es bei direktem Kontakt, unabhängig von der verwendeten Konzentration, einen irreversiblen toxischen Effekt auf die Zellen ausübt [44].

Eine weitere in vitro Studie belegte, dass die Apoptose nicht wie vermutet durch das ausgeübte Gewicht der Triamcinolonkristalle auf die Zellen ausgelöst wird.

Triamcinolonpartikel besitzen eine Größe von bis zu 80µm. So wurden Glasperlen entsprechender Größe direkt auf RGC-5-Zellen gegeben. Ein Verlust der Viabilität war dadurch nicht feststellbar [45].

1.3. Verwendete Medikamente mit dem Wirkstoff Triamcinolon

Triamcinolon ist der Wirkstoff der Medikamente Volon-A®, Kenalog® und Triesence®. Alle drei Medikamente tragen als geschützte Produktbezeichnungen das Registered Trade Mark-Symbol ®, auf welches ich jedoch im Folgenden verzichten möchte.

1.3.1. Volon-A®

Volon-A wird bereits seit den 70er Jahren zur intraokulären Injektion verwendet [28] und ist in Deutschland das bisher einzige zugelassene Triamcinolon-präparat.

Dessen Gebrauch für die intraokuläre Injektion, obgleich seit langem durchgeführt, ist off-label.

Vor dessen Anwendung wird es durch ein Aufreinigungsverfahren, welches in Tübingen von der Klinikapotheke durchgeführt wird, vom Konservierungsmittel befreit.

Die in vivo belegte Sicherheit [9, 21] steht noch immer im Widerspruch mit den in vitro Studien, die bei direktem Zellkontakt des Präparats eine ausgeprägte Toxizität nachweisen konnten [44, 59].

Die Kosten für einen Milliliter Volon-A liegen bei ungefähr 10 € [40].

1.3.2. Kenalog®

Spitzer et al. haben das Zulassungsverfahren durch die Food and Drug Administration (FDA) für Kenalog und Triesence untersucht [42].

Kenalog (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA) war zuerst das einzige Triamcinolonpräparat, das in den USA zugelassen war. Die Anwendung erfolgte auch off-label, war aber nicht kontraindiziert.

Im Herbst 2006 wurde von der FDA ein Antrag für Etikettenänderung genehmigt, damit das Produkt künftig mit der Aufschrift „not for intraocular use“ gekennzeichnet werden soll, da eine intravitreale Injektion des Medikaments Netzhautablösungen, Endophthalmitiden, Katarakte und Sekundärglaukomen auslösen könne [49].

Laut Packungsbeilage sind keine Studien durchgeführt worden, die die klinische Sicherheit für die ophthalmologische Anwendung belegen. Zudem wird nun ausdrücklich darauf hingewiesen, das Medikament keinesfalls intraokulär zu injizieren, da vom Konservierungsmittel Benzylalkohol eine potentielle Toxizität ausginge.

Die Kosten für einen Milliliter Kenalog betragen derzeit ungefähr 5 US$ [57].

1.3.3. Triesence®

Triesence (Alcon, Fort Worth, TX, USA) erhielt in den USA seine Zulassung im Jahr 2007. Auf dem europäischen Markt hat das Medikament bisher keine Zulassung. Hersteller ist Alcon, der weltweite Marktführer für augenärztliche Produkte.

Das Präparat enthält keinerlei Konservierungsmittel und wird daher als äußerst verträglich beworben. Spitzer et al. stellten fest: Alcon hat mit dem Präparat selbst keinerlei Studien durchgeführt und stützt sich dabei auf die langjährigen Erfahrungen mit Kenalog. „The applicant did not perform any human pharmacocinetic assessments of Triesence injectable ophthalmic suspension…

Ocular and systemic exposure to Triamcinolon acetonide following intravitreal injections has been adequately characterized in peer-reviewed publications" [42].

Als Indikation gelten laut Gutachten der FDA die sympathische Ophthalmie, die Visualisierung des Glaskörpergerüsts während einer Vitrektomie, die Arteriitis temporalis, sowie Uveitiden oder intraokulare Entzündungszustände, die therapierefraktär auf topische Steroide sind [54].

Die Kosten für einen Milliliter Triesence belaufen sich auf 149,77 US $ [53].

1.3.4. Die drei Medikamente im Vergleich

Volon-A wird eher in Deutschland verwendet, während Kenalog das gängige Präparat in den USA war, welches nun von Triesence abgelöst werden soll.

Triescence ist konservierungsmittelfrei, die anderen beide Präparate enthalten als Vehikel Benzylalkohol, welcher in einigen in vitro Studien für die schlechten Ergebnisse verantwortlich gemacht wurde [15].

Deshalb wird das konservierungsmittelhaltige Volon-A, ebenso wie Kenalog, vor deren intravitrealen Injektion speziell aufbereitet, um das Vehikel zu entfernen. Dieser Schritt ist bei der Anwendung von Triesence hinfällig.

Vergleicht man die Inhaltsstoffe von Triesence und Kenalog stimmen diese bis auf das Konservierungsmittel über ein. „The concentration … of triamcinolon acetonide is the same as in Kenalog-40 and ... pharmaceutically is therapeutically equivalent to Kenalog-40 [54].

Alle der drei Medikamente enthalten pro Milliliter 40mg Triamcinolon.

1.4. Fragestellung

Die über Jahre gute klinische Erfahrung mit dem Glukokortikoid Triamcinolon steht im Widerspruch zu den schlechten, in vitro erzielten Ergebnissen.

Auf den ersten Blick gibt es zwei wesentliche Unterschiede zwischen Triesence und den beiden älteren Präparaten. Der erste liegt bei der Konservierungsmittelfreiheit des Triesence, der zweite liegt offensichtlich im Preis. Die Kosten für einen Milliliter Triesence belaufen sich derzeit auf umgerechnet 115 €, für Volon-A auf 10 €, bei Kenalog auf umgerechnet knapp 4€.

Die Konservierungsmittelfreiheit des neusten Medikaments Triesence lässt auf eine innovative Neuerung hoffen, die durch gute in vitro Ergebnisse die klinische Verträglichkeit unterstützt, die Zweifel der Anwender beseitigt und dadurch die hohen Kosten rechtfertigt.

Um dieser Frage nachzugehen wurden die Einflüsse von Triesence, aufgereinigtem Volon-A und Kenalog auf retinale Pigmentepithel-19-Zellen (ARPE-19) und retinale Ganglienzellen (RGC-5) getestet.

2. Material und Methodik

2.1. Verwendete Materialien

2.1.1. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT), Sigma , # 5655
- 6, 12 & 24 Well Platten, Costar
- Adulte retinale Pigmentepithel-19-Zellen (ARPE-19-Zellen) , ATCC, Manassas, VA, USA
- Benzylalkohol (1%)
- D-MEM, GIBCO, # 31885-023
- D-PBS, GIBCO, # 14190-094
- DMSO, Merck, # 102950
- Essigsäure (100%), Merck, # 100063
- Heparinspritzen 1ml, Dispomed
- Kanülen 0,7mm, Sterican
- Kenalog 40mg/ml, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA
- Live-Dead-Kit, Molecular Probes
- Millex GS 0,22 µm filter unit, Millipore, Billerica, MA, # SLGSO33SS
- Penicillin/ Streptomycin, GIBCO, # 15070-063
- Pippettenspitzen (20 µl, 100µl, 1000 µl), Greiner bio-one
- Retinale Ganglienzellen (RGC-5-Zellen) , UNT Health Science Center, Fort Worth, TX, USA
- Schweineaugen (Schlachthof Rottenburg)
- Sodium dodecyl sulphate (SDS), Serva, # 20783
- Sterilfilter (0,45 µm), Millipore Corporation USA
- Tetrabutylammoniumbromid, Sigma-Aldrich # 193119
- Triesence 40mg/ml, Alcon, Fort Worth, TX, USA
- Trypsin/ EDTA (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA), GIBCO, # 25200-720

- Viability/ Cytotoxicity Kit, Invitrogen, Lot. 41599A, L3224,Eugene, OR, USA
- Volon-A, aufgereinigt, 40mg/ml
- Zellkulturinserts (6 Well), Porengröße 0,4 µm, Schubert und Weiss # 353493
- Zellkulturinserts (12 Well), Porengröße 0,4 µm, Schubert und Weiss # 353494
- Zellkulturinserts (24 Well), Porengröße 0,4 µm, Schubert und Weiss #353495
- Zellkulturflaschen Cellstar, Greiner bio one

2.1.2. Verwendete Geräte

- ELISA-Reader, SLT 400 ATX u.
- Magnetrührer, Heidolph; Reax 1R
- Mikroskope: 1. Nikon TMS
  2. Zeiss Axiovert 135
- Zeiss Axiocam
- 5,10,25 ml-Pipetten, Eppendorf
- Rad
- Reagenzglasschüttelgerät
- Schüttelmaschine für die Mikrotiterplatten, CAT SH 26
- Waage, Sartorius LA 120 S
- Wasserbad, GFL
- Zellkulturschrank/ CO_2-Inkubator, Heraeus
- Zentrifuge, Heraeus Biofuge fresco

2.1.3. Verwendete Zellkulturen

2.1.3.1. ARPE-19-Zellkultur

Die humane RPE-Zelllinie ARPE-19 stammt von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) und wurde 1986 von Amy Aotaki-Keen aus den Augen eines 19-jährigen, der bei einem Autounfall ums Leben gekommen war, isoliert.

Die Zelllinie wurde durch selektive Trypsinierung der primären humanen RPE-Kulturen entwickelt, wodurch eine einheitliche Population von hoch epithelialisierten Zellen mit einem großen Wachstumspotential hervorging. Auf geeigneter Unterlage bilden sie einen Monolayer.

Es konnte gezeigt werden, dass ARPE-19-Zellen strukturelle und funktionelle Eigenschaften von humanen RPE-Zellen in vivo besitzen, woraus sich schließen lässt, dass diese Kultur für in vitro Studien der Physiologie des retinalen Pigmentepithels geeignet ist [10].

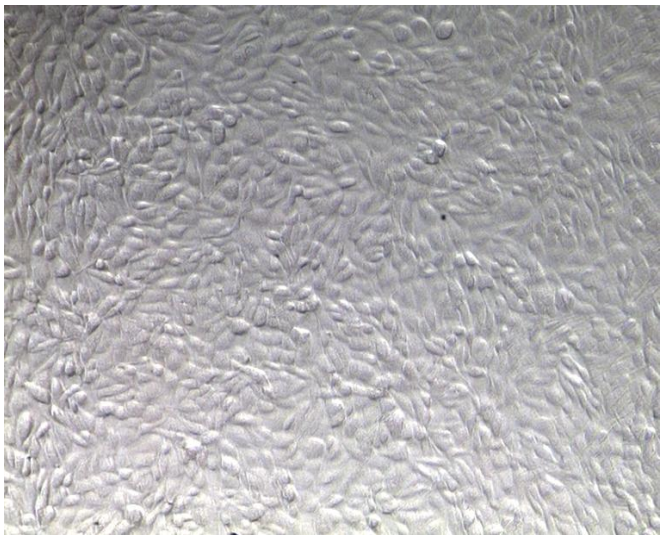


Abb.3: *Digital erstellte Aufnahme von adulten retinalen Pigmentepithelzellen (ARPE-19)*

2.1.3.2. RGC-5-Zellkultur

Die RGC-5-Zellkultur wurde uns freundlicherweise von Professor Neeraj Agarwal (UNT Health Science Center, Fort Worth, TX) überlassen.

Die Isolation dieser retinalen Ganglienzellen wurde an neugeborenen Ratten, einen Tag postnatal, durchgeführt [27].
Diese Zellen sind gut dazu geeignet die direkte Netzhaut-Toxizität verschiedener Medikamente zu repräsentieren, da die Ganglienzell- und Nervenfaserschicht den nächsten Kontakt zu injizierten Präparaten haben [59].

Abb. 4: *Digital erstellte Aufnahme von retinalen Ganglienzellen (RGC-5)*

2.1.3.3. Kultivierung der Zelllinien

Die Toxizitätstestung der unterschiedlichen Medikamente wurde an ARPE-19- und RGC-5-Zellkulturen durchgeführt.

Beide in Kulturflaschen gelagerten Zelltypen wurden im Zellkulturschrank bei 37° Celcius, 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert und mit jeweils individuell hergestelltem D-MEM-Medium (s. Kapitel 2.1.4.1.) genährt.

Um eine sterile Umgebung zu gewährleisten wurde ausschließlich unter der Sterilbank gearbeitet.

Das Medium wurde, um Metabolite und eventuell abgestorbene Zellen zu entfernen und die Vitalität und Proliferation aufrechtzuerhalten, jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt.

Dazu wurde das Medium und die Spüllösung PBS im Wasserbad auf 37C° erwärmt. Das alte Medium wurde aus der Zellkulturflasche abpipettiert, mit zehn Milliliter PBS wurde gespült, anschließend wurden 12ml des frischen Mediums zugegeben.

Zur nachhaltigen Kultivierung beider Zellarten, wurden in regelmäßigen Abständen die Kulturen bei konfluentem Zellrasen passagiert.

Hierbei wurde das alte Medium abgesaugt und mit ungefähr 5ml PBS zwei Mal gespült. Danach wurden 4ml vorgewärmtes Typsin/EDTA zugegeben und im Zellkulturschrank inkubiert. Dadurch kam es zu Ablösung des Monolayers.

Mit sogenannten CAMs, den cell adherend molecules, können Zellen an Glas- und Plastikoberflächen haften. Diese Haftproteine werden durch das eiweißspaltende Trypsin angedaut. Da Zellen, insbesondere Epithelzellen, Kationen benötigen um Anzuheften, werden diese Ionen durch das zugesetzte EDTA gebunden und der Kultur entzogen. Durch diese Vorgänge lösen sich die Zellen von ihrem Untergrund ab [52].

Je nach Zelllinie dauerte die Ablösung unterschiedlich lange.

Sobald man im Mikroskop beobachten konnte, dass alle Zellen sich vom Boden gelöst hatten und frei im Medium schwammen, gab man die doppelte Menge des Mediums zur Neutralisierung des Trypsins dazu. Anschließend wurde die Lösung mit einer Pipette aufgenommen und in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben.

Die Suspension wurde danach bei 800 U/min für drei Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugalkraft setzten sich die Zellen als sogenanntes Pellet am Boden des Röhrchens ab.

Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, um die Trypsin/EDTA-Lösung zu entfernen. Das Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert.

Dabei gab man mit der Pipette fünf Milliliter Kulturmedium ins Zentrifugenröhrchen und durchmengte mit vorsichtigem Auf- und Abziehen die Zellen mit der Flüssigkeit.

Die Zellsuspension wurde daraufhin auf zwei neue Zellkulturflaschen aufgeteilt, danach wurden zusätzlich je zehn Milliliter des Mediums zugegeben.

2.1.3.4. Der Glaskörper- Corpus vitreum

Die verwendeten Glaskörper wurden von Schweineaugen entnommen, welche von einem Schlachthof in Rottenburg zur Verfügung gestellt wurden. Die Präparation des Glaskörpers aus dem Auge erfolgte direkt nach der Entnahme aus dem Schwein.

2.1.4. Verwendete Nährmedien

2.1.4.1. ARPE-19-Zellmedium

Für die ARPE-19-Kulturen wurde dem Zellmedium D-MEM der Firma GIBCO fötales Kälberserum in 10%iger Konzentration als Nährstoff zugesetzt. Außerdem wurden Penicillin und Streptomycin, je in 5%iger Konzentration, zur Kontaminationsprophylaxe zugegeben. Die Lagerung des Mediums erfolgte im Kühlschrank, vor der Applikation wurde die Lösung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.1.4.2. RGC-5-Zellmedium

Das Medium der RGC-5-Zellen wurde mit 5%igem FCS und jeweils 2,5% Penicillin und Streptomycin angereichert. Da diese immortalisierten Ganglienzellen sehr schnell proliferieren wurden nur 25ml FCS auf einen halben Liter D-MEM verwendet. Das hergestellte Medium wurde ebenfalls im Kühlschrank gelagert und vor dessen Verwendung auf 37°C erwärmt.

2.1.4.3. Starving Medium

Für die Verdünnung der in den Versuchen verwendeten Medikamente Triesence, Volon-A und Kenalog wurde ein D-MEM-Medium ohne nährstoffreiche Zusätze verwendet. Durch die Anwendung des Starving Mediums wurde die Zellproliferation der getesteten Kulturen gehemmt, damit während der Inkubationszeit mit den Medikamenten die Zellzahl konstant blieb.

2.2. Vorbereitung der Zellkulturen

Das Medium, das PBS und die Trypsin/EDTA-Lösung wurden zuerst im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Anschließend wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und der Zellrasen zwei Mal mit je fünf Milliliter PBS gespült.

Danach wurde vier Milliliter Trypsin/EDTA auf die Kultur gegeben, wodurch die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst wurden. Mit D-MEM wurde die Lösung neutralisiert und in ein steriles Zentrifugenröhrchen umpipettiert. Nach der Zentrifugation und Entfernung des Überschusses erfolgte die Resuspension mit frischem Medium. Die Zellkulturen wurden auf 6-, 12-, beziehungsweise 24-Well-Platten von Costar appliziert.

Am nächsten Tag erfolgte dann nach dem Festwachsen der Zellen die Applikation der verschiedenen Medikamente.

2.3. Vorbereitung der Glaskörper

Durch Verwendung von Glaskörpern sollte der Effekt von TA-Kristallen, die sich ins Glaskörpergerüst einlagern, verdeutlicht werden.

Die verwendeten Schweineaugen aus dem Schlachthof Rottenburg wurden unmittelbar nach deren Entnahme im Labor präpariert. Dabei wurde am Limbus corneae mit einem Skalpell zirkulär inzidiert, anschließend konnte der Glaskörper mit einer Pinzette entnommen werden.

2.4. Vorbereitung der Medikamente Triesence, Volon-A und Kenalog

Die jeweiligen Triamcinolonpräparate sind in 1ml-Ampullen mit der Konzentration von 40mg/ml erhältlich.

Um physiologische Bedingungen zu schaffen, wurden die Präparate auf eine Konzentration von 1mg/ml verdünnt.

Der menschliche Glaskörper besitzt ein ungefähres Volumen von 4ml. Bei intravitrealer Injektion werden dem Patienten 0,1ml des Medikaments gespritzt. Somit besitzt das Arzneimittel in der Glaskörperflüssigkeit eine Konzentration von 1mg/ml.

Um die gleiche Verdünnung zu erlangen, wurden die Präparate mit D-MEM-Starving-Medium auf 1mg/ml verdünnt. Zusätzlich wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Medikamente auf 0,1mg/ml gestreckt wurden.

Mit Hilfe des Reagenzglasschüttelgeräts wurden die Suspensionen kurz vor der Applikation vermengt, damit die Kristalle gleichmäßig im Gemisch verteilt waren.

Nachdem die Zellen am Boden festgewachsen waren, wurde jedes Well mit einem Milliliter PBS gewaschen und die vorbereitete Volon-A- bzw. Triesence- oder Kenalog-Lösung zugegeben.
Um die unterschiedlichen Einflüsse der Medikamente bei direktem oder indirektem Zellkontakt zu untersuchen wurden Zellkulturinserts verwendet, durch die die Wells zu einer sogenannten Boyden-Kammer wurden.

2.4.1. Prinzip der Boyden-Kammer

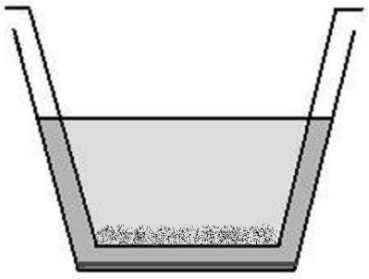


Abb. 5: *Boyden-Kammer*

Durch den Einsatz von Inserts entstehen in einem Well zwei Kompartimente. Die Wände des Inserts bestehen aus Kunststoff, der Boden besteht aus einer dünnen Membran, die in unseren Versuchen eine Porengröße von 0,4µm besaß. Durch diese Poren können gelöste Stoffe diffundieren, Partikel, die größer sind, setzen sich jedoch am Insertboden ab.
Im Versuch wurden nach dem Waschen der Zellen die Inserts vorsichtig mit einer sterilen Pinzette in die Wells eingesetzt. Anschließend wurden die vorbereiteten Triamcinolon-Lösungen in die entsprechenden Inserts pipettiert.
Dadurch wurde erreicht, dass die Triamcinolonkristalle sich im Insert absetzen, nicht aber direkt auf der Zellkultur. Die getesteten Zellen standen so nur mit dem gelösten Triamcinolon in Kontakt.

Um die unterschiedlichen Einflüsse zu testen, wurden die Versuche mit und ohne Inserts durchgeführt.

Nach Zugabe der verdünnten Präparate wurden die Zellkulturwells für 24 Stunden im Zellkulturschrank bei 37° Grad Celsius, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 inkubiert.

Nach der Inkubationszeit erfolgten dann die unterschiedlichen Tests.

2.5. Verwendete Methoden

2.5.1. MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Toxizitätstest. Mit ihm wurde der Einfluss der drei Kortikosteroide auf die Viabilität der ARPE-19- und RGC-5-Zellen gemessen.

Für dieses Experiment werden zwei unterschiedliche Reagenzien benötigt.

2.5.1.1. Herstellung des MTT1

MTT (Sigma Nr. 5 M 5655) ist als gelbes Pulver im Fachhandel erhältlich.

Um es in Lösung zu bringen mischt man es mit PBS im Verhältnis 5mg MTT pro Milliliter PBS. Die benötigte Menge wurde auf einer Waage der Firma Sartorius abgemessen und in einem 50ml Zentrifugenröhrchen mit PBS vermischt. Um das Gemisch vor Lichteinflüssen zu schützen, wurde das Röhrchen mit Alufolie umwickelt.

Anschließend wurde es 60 Minuten auf einem Zentrifugenrad resuspendiert und danach mit einem Filter mit der Porengröße von 0,22µm sterilfiltriert.

Die Lösung konnte geschützt in Alufolie mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.5.1.2. Herstellung des MTT2

Es wurden 99,4ml Dimethylsulfoxid (DMSO) mit 0,6ml 100%iger Essigsäure gemischt, dazu wurden 10g Sodium dodecyl sulphate (SDS) gegeben. Die Lösung wurde auf dem Magnetrührer vermischt, bis sich das SDS aufgelöst hatte.

Das MTT2 konnte dauerhaft bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.5.1.3. Wirkungsweise

MTT steht für 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-dipheniyl-tetrazolium Bromid, welches eine gelbe Farbe hat. Gibt man die Lösung 1 zu den Testkulturen, setzen die mitochondrialen Reduktasen der lebenden Zellen das gelbe MTT in dunkelblau bis violettes Formazan um. MTT2 bewirkt anschließend die Lyse der Zellen und das Formazan wird freigesetzt. Der Grad der Färbung ist proportional mit der Zahl vorhandener noch lebender Zellen.

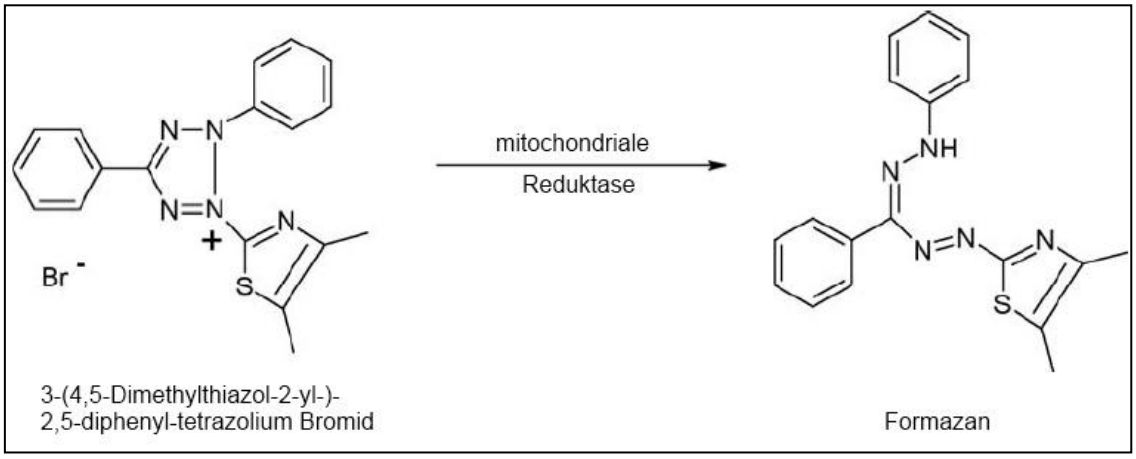


Abb. 6: *Reduktion des MTT zu Formazan [51]*

Nachdem die Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät, festgewachsen und für 24 Stunden mit den Medikamenten inkubiert worden waren, wurde jedes Well mit einem Milliliter PBS gewaschen.

Anschließend wurden 200µl MTT1 in jedes Well pipettiert.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von drei Stunden im Zellkulturschrank wurde das MTT2 appliziert. Dadurch kam es zur Zerstörung aller Zellmembranen und das metabolisierte Formazan wurde freigesetzt.

Je nachdem wieviel lebende Zellen sich noch nach Medikamenteneinwirkung im Well befanden kam es zu unterschiedlich starker Violettfärbung.

Um eine gleichmäßige Verteilung der Färbung zu erlangen, wurden die Well-Platten für einige Minuten auf der Schüttelmaschine bewegt.

Mit Hilfe des Elisa-Readers wurde dann die Extinktion der Proben bei den Wellenlängen 570 und 620nm digital gemessen und statistisch ausgewertet.

2.5.2. Live-Dead-Test

Der Live-Dead-Test ist ein 2-Farben-Fluoreszenstest der amerikanischen Firma Molecular Probes aus Eugene, Oregon, bestehend aus den Komponenten Calcein und Ethidium homodimer-1. Der Live-Dead-Test ist ein Vitalitäts- beziehungsweise Zytotoxizitätstest.

2.5.2.1. Herstellung

Zur Herstellung der Testlösung wurden 10ml PBS in einem Zentifugenröhrchen mit 5µl Calcein AM und 20µl Ethidium homodimer-1 versetzt und auf dem Reagenzglasschüttler vermischt. Um die Fluoreszenz des Gemischs nicht zu beeinträchtigen, wurde es mit Alufolie vor Lichteinwirkung geschützt.

2.5.2.2. Wirkungsweise

Das nicht fluoreszierende Calcein AM dringt in lebende Zellen ein und wird von der intrazellulären Esterase in das grün-fluoreszierende Calcein umgesetzt.

Ethidium homodimer-1 hingegen kann nur geschädigte Zellmembranen durchdringen und bindet intrazellulär an Nukleinsäuren, wodurch eine Rotfloureszenz hervorgerufen wird [56].

2.5.2.3. Versuchsablauf

Nachdem die Zellkulturen auf die Platten ausgesät und bereits 24 Stunden mit den Medikamenten inkubiert waren, wurden pro Well 100µl der hergestellten Lösung appliziert und durch den Schüttler vorsichtig verteilt. Für die

Einwirkdauer von 30-45 Minuten wurden die Platten lichtgeschützt in Alufolie im Zellkulturschrank aufbewahrt.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss wurden dann die Auswirkungen der verschiedenen Präparate sichtbar gemacht. Tote Zellen stellten sich rot dar, die lebenden grün. Um diese Ergebnisse festzuhalten wurden mit der Zeiss Axiocam digitale Bilder erstellt.

Dabei wurden pro Mikroskopieeinstellung drei unterschiedliche Bilder aufgenommen. Je ein Durchlichtbild, eine Dead- und eine Live-Aufnahme.

Verglichen wurde das Verhältnis der toten zu den lebenden Zellen bei gleicher Kameraeinstellung. Die Zellen wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Image-J ausgezählt und statistisch ausgewertet.

Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte eine Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni.

2.5.3. Statistische Analysen

Die statistische Auswertung des MTT-Tests erfolgte durch Bestimmung der Mittelwerte und deren Standardabweichung der gemessenen Extinktionen. Die Ergebnisse wurden mittels Diagramm dargestellt.

Bei der statistischen Analyse des Live-Dead-Tests wurden in jeder Aufnahme die toten, sowie die lebenden Zellen gezählt. Die toten Zellen wurden prozentual ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt und mit deren Standardabweichung in ein Diagramm übertragen.

Zur Ermittlung, ob es zwischen den Vergleichsproben signifikante Unterschiede gab, wurde der Zwei-Stichproben Student t-Test verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei p=0,05, so dass ein signifikantes Testresultat vorlag, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war. Ein hoch signifikantes Testresultat lag vor, wenn der p-Wert kleiner als 0,005 war. Die durch den t-Test erzielten Ergebnisse wurden mit JMP Version 9.0 nachgeprüft.

2.5. Versuchsprotokoll

Die Versuchsreihen wurden immer an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Am ersten Tag wurden die kultivierten Zellen auf die 6-, 12- bzw. 24-Well-Platten verteilt, am zweiten Tag wurden die unterschiedlichen Medikamente appliziert. Je nach Versuchsreihe erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen direkt auf die Zellen oder es wurden zuerst Inserts in die Wells eingesetzt, um den direkten Kontakt zu unterbinden. Meist wurden beide Alternativen durchgeführt, um im direkten Vergleich die unterschiedlichen Auswirkungen zu untersuchen. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgten der Live-Dead-, beziehungsweise der MTT-Test.

Datum	Zelllinie	Verwendete Medikamente	Konzentration	Verwendung von Inserts	MTT-Test	Live-Dead-Test
05.11.08	ARPE 19	TR / PFTA	1mg/ml	ø	✓	✓
13.11.08	ARPE 19	TR / PFTA	1mg/ml	ø	✓	✓
20.11.08	ARPE 19	TR / PFTA	1mg/ml	ø / ✓	✓	✓
26.11.08	ARPE 19	TR / PFTA	0,01/0,1/1mg/ml	ø / ✓	✓	ø
03.12.08	ARPE 19	TR / PFTA	0,1mg/ml	ø / ✓	✓	✓
11.12.08	ARPE 19	TR / PFTA	1mg/ml	ø / ✓	✓	✓
17.12.08	ARPE 19	TR / PFTA	1mg/ml	ø / ✓	ø	✓
14.01.09	ARPE 19	TR / PFTA	0,01/0,1mg/ml	ø / ✓	✓	✓
23.01.09	ARPE 19	TR / PFTA	1mg/ml	ø / ✓	ø	✓
30.01.09	RGC5	TR / PFTA	1mg/ml	ø / ✓	ø	✓
23.01.09	ARPE 19	TR / PFTA	1mg/ml	ø / ✓	✓	✓
05.02.09	RGC 5	TR / PFTA	0,1/1mg/ml	ø / ✓	✓	✓
11.02.09	RGC 5	TR / PFTA	1mg/ml	ø / ✓	✓	ø
17.02.09	RGC 5	TR / PFTA	0,1mg/ml	ø / ✓	✓	ø
04.03.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	ø / ✓	ø	✓
11.03.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	ø / ✓	✓	✓
18.03.09	ARPE 19	TR / PFTA / KL	1mg/ml	ø	✓	ø
01.04.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	ø / ✓	✓	ø
01.04.09	ARPE 19	TR / PFTA / KL	1mg/ml	ø	✓	ø

07.04.09	ARPE 19	TR / PFTA / KL	1mg/ml	Ø / ✓	Ø	✓
07.04.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	Ø / ✓	✓	✓
24.04.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	Ø	✓	Ø
30.04.09	ARPE 19	TR / PFTA / KL	1mg/ml	✓	✓	Ø
18.07.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	Ø / ✓	✓	Ø
19.08.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	Ø / ✓	✓	Ø
19.09.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	✓	✓	Ø
25.09.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	Ø / ✓	✓	Ø
09.10.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	Ø / ✓	✓	✓
13.10.09	RGC 5	TR / PFTA / KL	1mg/ml	Ø / ✓	Ø	✓
11.01.10	RGC5/GK	TR / PFTA / KL	TR / PFTA / KL	Ø	✓	Ø
18.01.10	RGC5/GK	TR / PFTA / KL	TR / PFTA / KL	Ø	✓	Ø

Tab. 1: *Versuchsprotokoll*

TR: Triesence

PFTA: aufbereitetes Volon-A

KL: Kenalog

GK: Glaskörper

3. Ergebnisse

3.1. ARPE-19-Zellen

3.1.1. Toxizitätstest

Die Toxizität der TA-Medikamente wurde durch den MTT-Test ermittelt. Dieser Test erlaubt nach der Medikamenteninkubation die Visualisierung der momentan vorhandenen Zellvitalität. Die Stärke der Einfärbung ist proportional zur Anzahl der noch lebenden Zellen.
Die Herstellung und Durchführung des Versuchs wurde in Kapitel 2.5.1. beschrieben.

3.1.1.1. Toxizität von Triesence und Volon-A bei direkter Exposition der ARPE-19-Zellen

Zuerst wurden die vorbereiteten Lösungen von Triesence und Volon-A in einer Konzentration von 1mg/ml direkt auf den ARPE-19-Zellrasen gegeben. Nach 24 Stunden wurde ein MTT-Test durchgeführt, um die Viabilität der Zellen zu untersuchen.

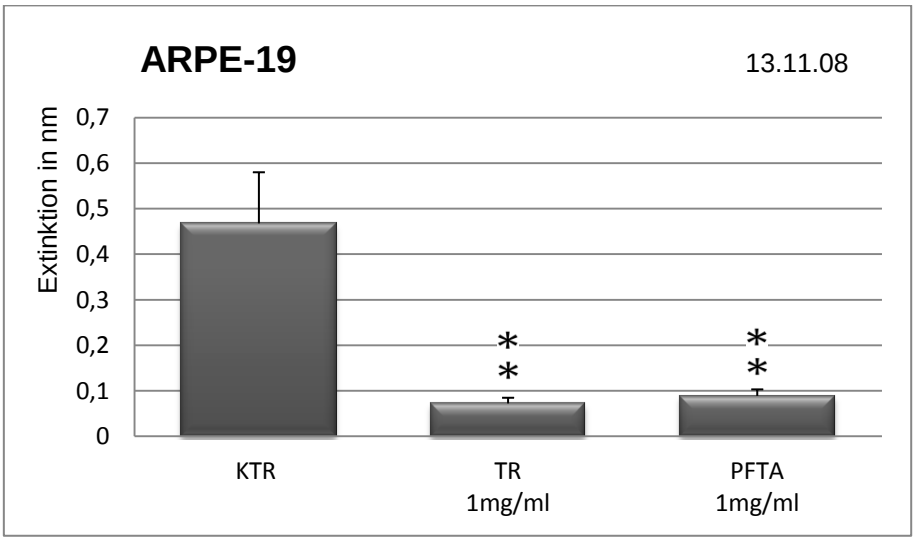


Abb. 7

Abb. 7: *Das Testergebnis zeigte, dass der direkte Einfluss, sowohl von Volon-A (PFTA), als auch von Triesence (TR) im Vergleich zur Kontrolle (KTR) stark apoptotisch auf die ARPE-19-Zellen wirkte. Der Unterschied zur Kontrolle war in beiden Fällen höchst signifikant (**p< 0,005). Das neue Präparat Triesence wies sogar noch eine toxischere Wirkung als das PFTA auf.*

3.1.1.2. Toxizität von Triesence und Volon-A bei direkter und indirekter Exposition der ARPE-19-Zellen

Da bereits ältere Studien über den Wirkstoff Triamcinolon belegen, dass der indirekte Kontakt des Medikaments für die ARPE-19-Zellen gut verträglich ist, wurden sie im darauffolgenden Versuch direkt und indirekt den Medikamenten ausgesetzt. Um die Berührung der Kristalle mit den Zellen zu unterbinden wurden Zellkulturinserts verwendet. Die Partikel wurden so durch deren Membran am Absinken auf den Zellrasen gehindert. Nur der gelöste Wirkstoff gelangte dann an die Zellen.

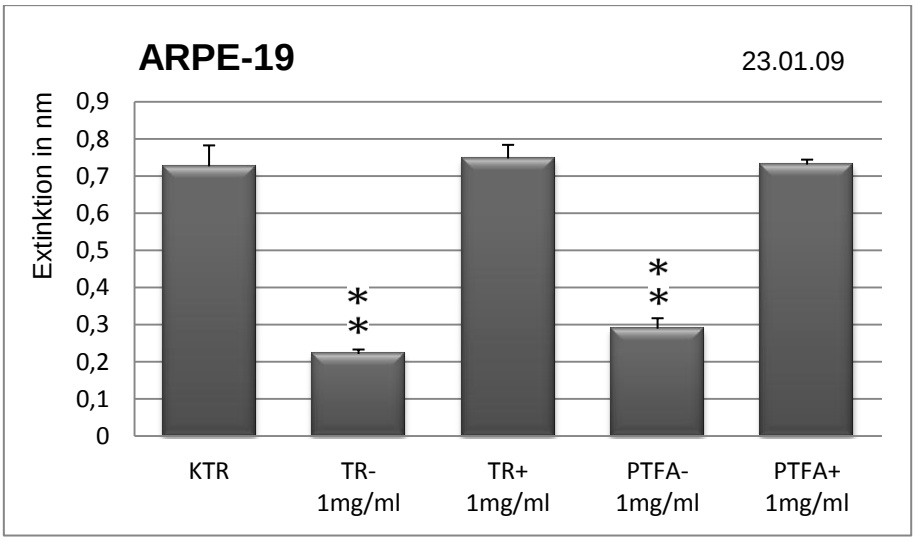


Abb. 8

Abb. 8: *Wie erwartet, wurde das aufbereitete Volon-A bei indirekter Exposition (PFTA+) von den Zellen gut toleriert. Auch Triesence zeigte bei der Verwendung von Inserts (TR+) keine toxischen Einflüsse. Die starke apoptotische Wirkung bei direktem Kontakt ohne Inserts von Volon-A (PFTA-) und Triesence (TR-) zwischen den Zellen und beiden Präparaten war auch hier im Vergleich zur Kontrolle (KTR) höchst signifikant (**p<0,005).*

3.1.1.3. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog bei direkter Exposition der ARPE-19-Zellen

In der dritten Versuchsreihe wurde zusätzlich zu den beiden anderen Medikamenten als drittes Präparat Kenalog untersucht, welches ebenfalls den Wirkstoff Triamcinolon enthält.

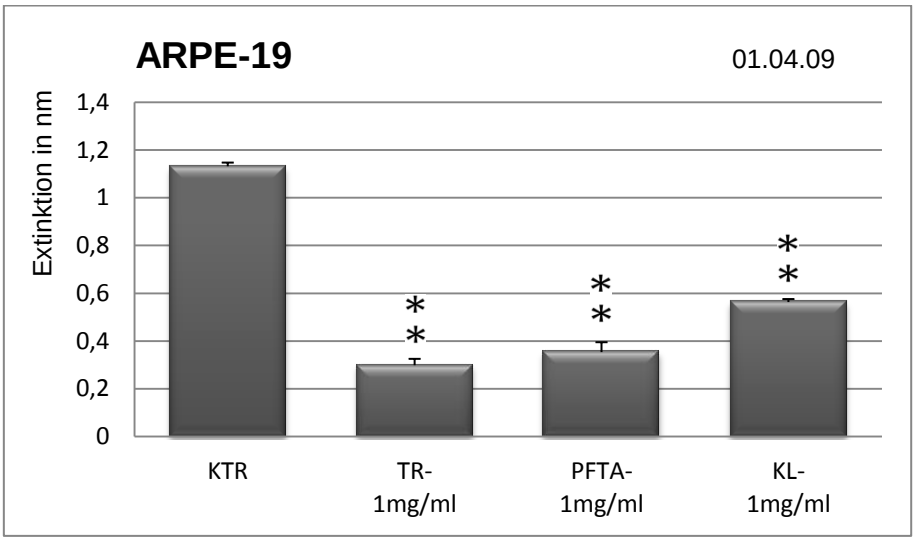


Abb. 9:

Zwar wiesen alle drei Arzneimittel bei direkter Exposition mit den Medikamenten eine ausgeprägte Toxizität auf, jedoch war auffällig, dass Kenalog (KL-) hier die geringsten toxischen

*Effekte auf die ARPE-19 ausübte, gefolgt von Volon-A (PFTA-). Die stärkste apoptotische Wirkung ging von Triesence aus, was die bisher erlangten Ergebnisse bekräftigte. Zur Kontrolle gab es bei allen drei Präparaten eine höchst signifikante Differenz (**p< 0,005).*

3.1.1.4. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog bei indirekter Exposition der ARPE-19-Zellen

Um den indirketen Einfluss des Kenalogs mit Triesence und Volon-A zu vergleichen wurden die drei präparierten Lösungen mittels Zellkulturinserts auf ARPE-19-Zellen gegeben.

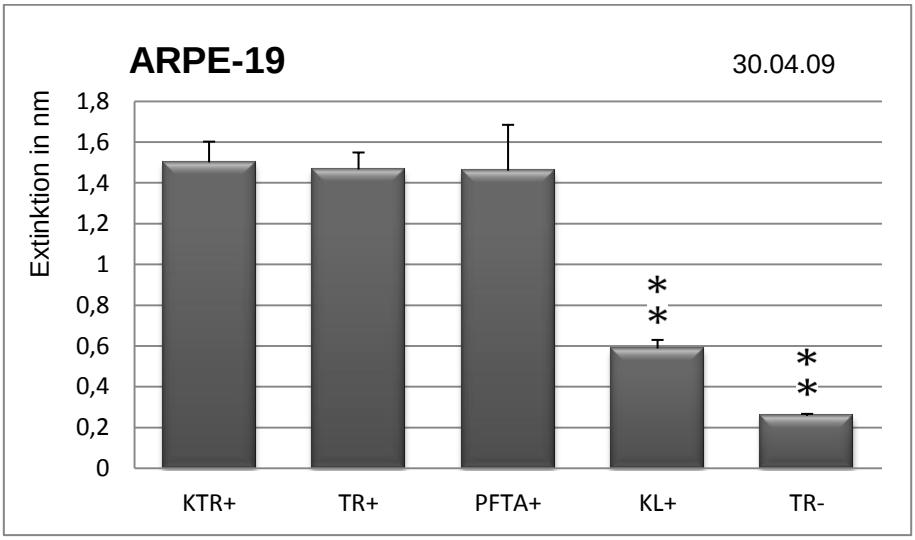


Abb. 10:

Bei der Verwendung von Zellkulturinserts zeigten die ARPE-19-Zellen für Volon-A (PFTA+) und Triesence (TR+) eine gute Verträglichkeit. Kenalog (KL+) stach durch eine überraschende toxische Wirkung hervor, trotz Zellkulturinserts. Eigentlich war

*hier bei indirektem Kontakt eine ähnlich gute Toleranz der Zellen gegenüber dem Präparat zu erwarten gewesen, wie bei Triesence und Volon-A. Die Ergebnisse von KL+ und TR- wiesen höchst signifikante Differenzen (**p>0,005) zur Kontrolle (KTR+) auf.*

3.1.2. Live-Dead-Fluoreszenz-Test

Der Live-Dead-Test ist ein Vitalitäts- beziehungsweise Zytotoxizitätstest. Er ermöglicht durch Fluoreszenz die Visualisierung von lebenden und toten Zellen. Vitale Zellen werden grün, abgestorbene Zellen werden rot dargestellt. Mit der Axiocam von Zeiss wurden die Ergebnisse digital dokumentiert. Es erfolgte die Zählung aller Zellen, anschließend wurde das Verhältnis der avitalen Zellen zu der Gesamtzellzahl ausgewertet. Die Vorbereitung und Durchführung des Versuchs wurde in Kapitel 2.4.2. abgehandelt.

3.1.2.1. Viabilität der ARPE-19-Zellen nach direkter Exposition mit Volon-A und Triesence

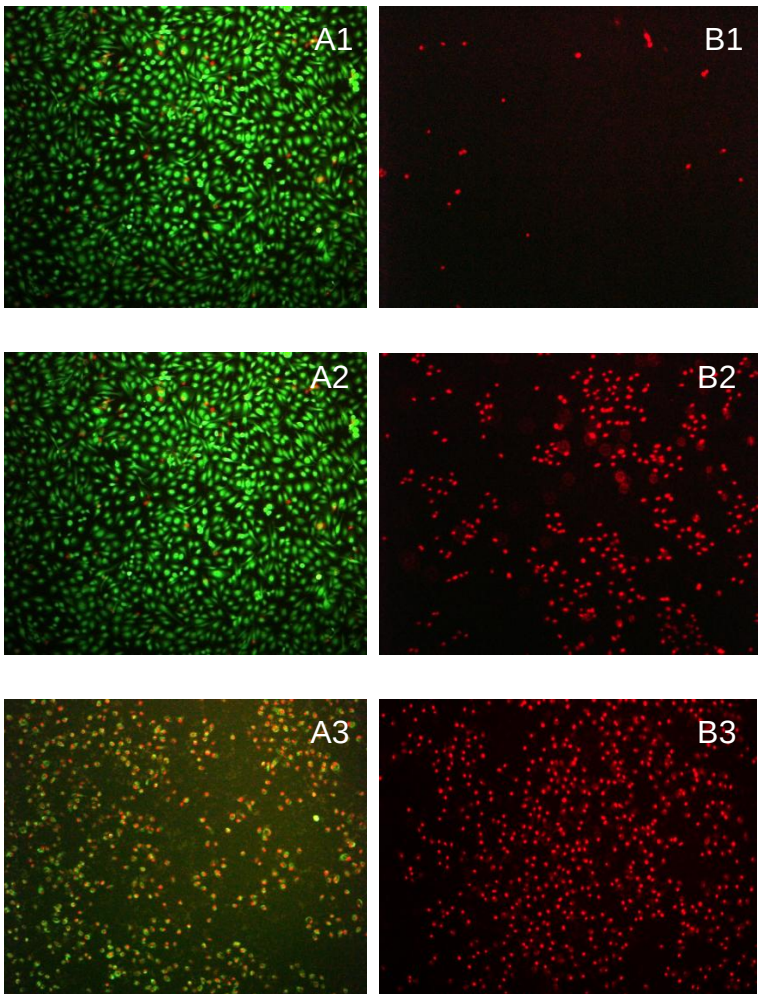


Abb. 11:

A1+B1:
Lebendkontrolle (KTR)

A2+B2:
aufgereinigtes Volon-A (PFTA-)

A3+B3:
Triesence (TR-)

Abb. 11: *Aufnahmen des Live-Dead-Tests mit Volon-A und Triesence*

Die Mikrofotografien der Abbildung 11 sind die digital dokumentierten Ergebnisse des Live-Dead-Tests. Die gesamte A-Reihe zeigt die vitalen Zellen, die durch eine Grünfluoreszenz markiert sind. In der B-Reihe sind durch Rotfluoreszenz die avitalen Zellen abgebildet. Von jeder Mikroskopeinstellung wurde je eine Live- und eine Dead-Aufnahme angefertigt um das Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen darzustellen.

In A1 und B1 werden Bilder der Lebendkontrolle gezeigt. Es befindet sich nur eine geringe Zahl toter Zellen in der Dead-Aufnahme. Die Abbildungen A2 und B2 dokumentieren den Einfluss von Volon-A auf die ARPE-19-Zellen. Die Dead-Aufnahme demonstriert durch die hohe Anzahl an toten Zellen die toxische Wirkung von Volon-A bei direktem Kontakt. A3 und B3 zeigen die zytotoxische Wirkung von Triesence. In der Dead-Einstellung liegen deutlich mehr abgestorbene Zellen vor als bei Volon-A.

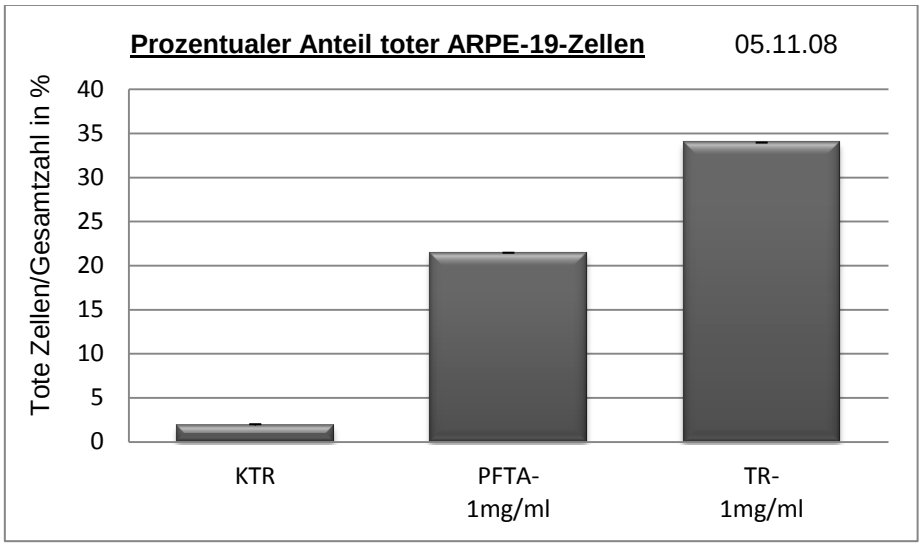


Abb. 12:

Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der abgestorbenen ARPE-19-Zellen nach 24-stündiger direkter Exposition mit aufgereinigtem Volon-A (PFTA-) und Triesence (TR-) im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen. Die Kontrolle (KTR) wies 1,86% abgestorbener Zellen auf, Volon-A 21,45% und Triesence 33,95%.

3.1.2.2. Viabilität der ARPE-19 nach direkter und indirekter Exposition mit Volon-A, Triesence und Kenalog

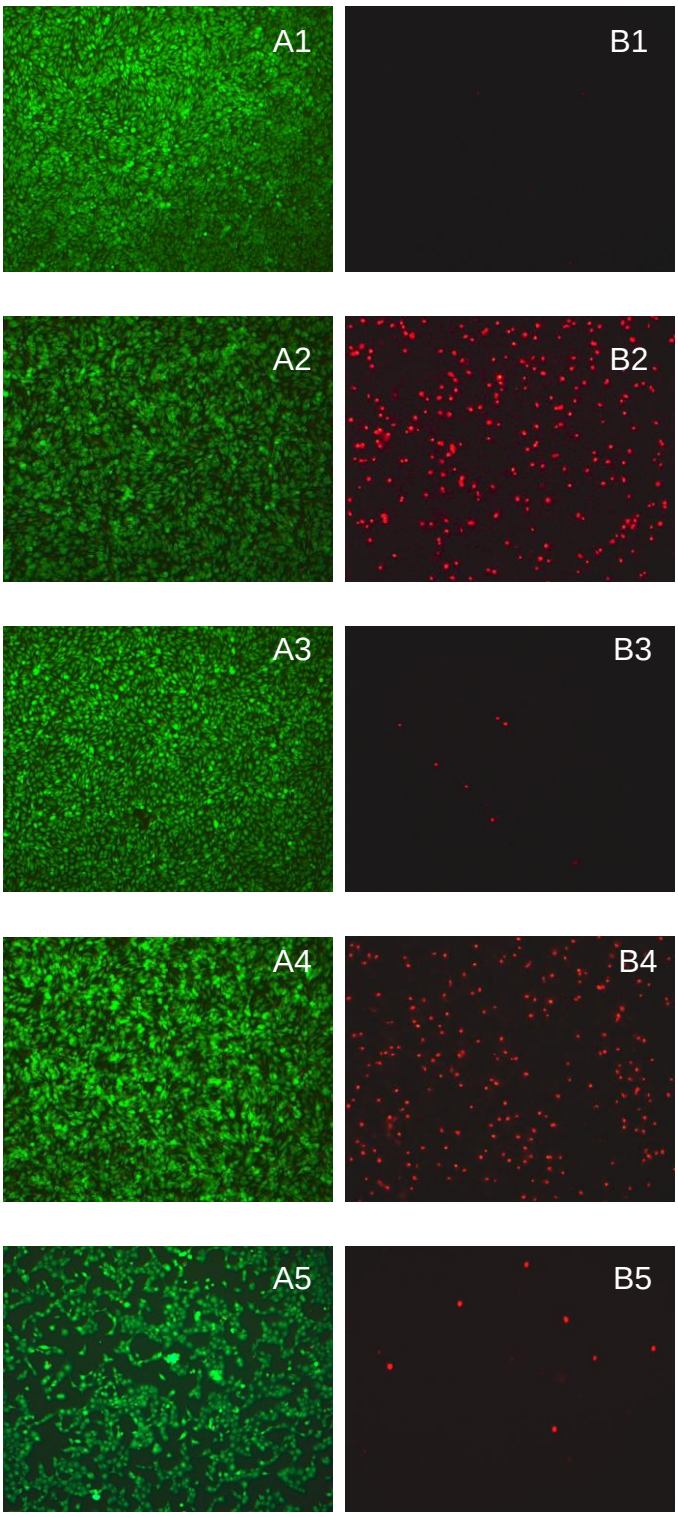


Abb. 13:

A1+ B1:

Lebendkontrolle (KTR)

A2 +B2:

aufgereinigtes Volon-A; direkte Exposition der Zellen (PFTA-)

A3+B3:

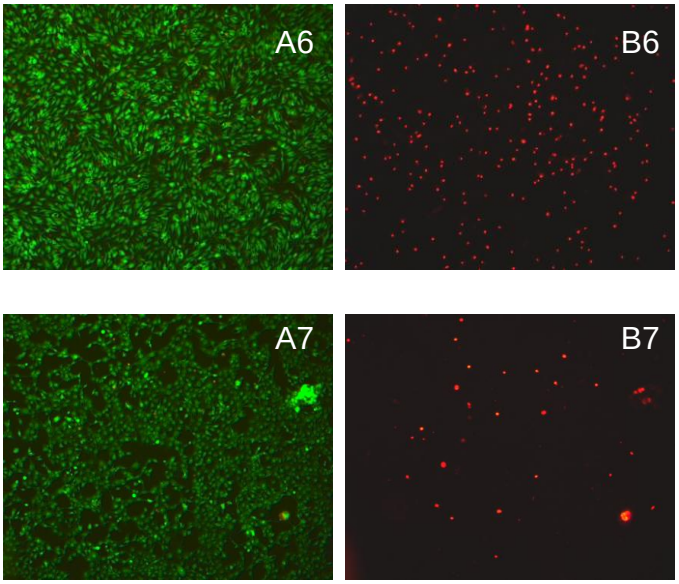
aufgereinigtes Volon-A; Verwendung von Zellkulturinserts (PFTA+)

A4+B4:

Triesence; direkte Exposition der Zellen (TR-)

A5+B5:

Triesence; Verwendung von Zellkulturinserts (TR+)



A6+B6:

Kenalog; direkte Exposition der Zellen (KL-)

A7+B7:

Kenalog; Verwendung von Zellkulturinserts (KL+)

Abb. 13: *Aufnahmen des Live-Dead-Tests mit Volon-A, Triesence und Kenalog mit und ohne Zellkulturinserts*

Die Mikrofotografien in der Abbildung 13 zeigen in der Reihe A die vitalen ARPE-19-Zellen (grün), in der Reihe B sind die avitalen Zellen abgebildet. Beide Aufnahmen fanden bei gleicher Kameraeinstellung statt.

Die Lebendkontrolle (A1 und B1) weist keine toten Zellen auf. A2 und B2 dokumentieren die direkte Wirkung von Volon-A auf die Zellen. In der Dead-Aufnahme ist deutlich eine größere Anzahl abgestorbener Zellen zu erkennen (B2).

Auch der toxische Einfluss von Triesence (B4) und Kenalog (B5) wird eindrücklich durch viele avitale Zellen dargestellt.

Die Verträglichkeit der Zellen bei indirektem Kontakt von Volon-A (B3) und Triesence (B5) durch Verwendung von Zellkulturinserts wird durch nur vereinzelt auftretende avitale Zellen bestätigt.

In dieser speziellen Aufnahme wiederholte sich bei der indirekten Exposition der ARPE-19 mit Kenalog das zuvor beim MTT-Test erlangte Ergebnis. Trotz Verwendung von Inserts trat eine leichte toxische Wirkung auf die Zellen ein.

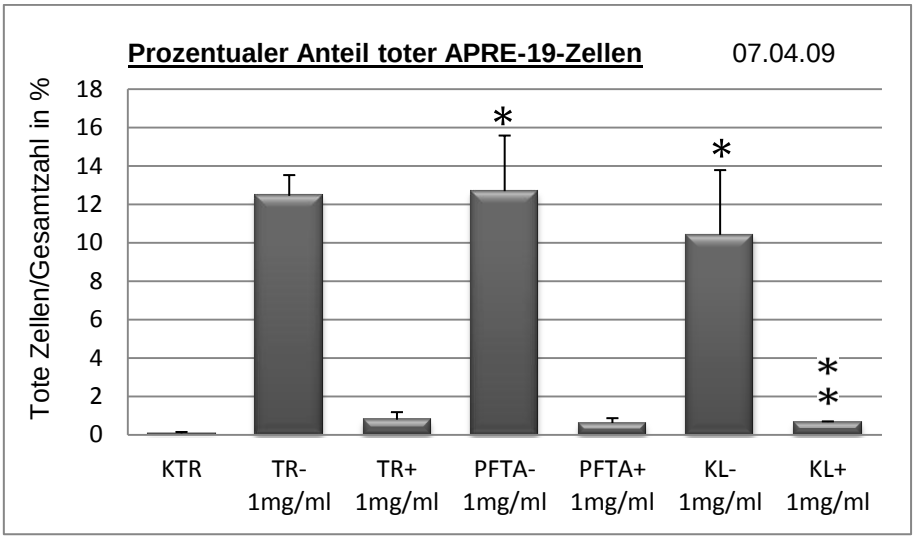


Abb. 14:

Das Diagramm der Abbildung 14 zeigt den prozentualen Anteil der abgestorbenen Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl.

Ohne die Verwendung von Filtern kam es zum Zelltod der ARPE-19-Zellen. Die toxische Wirkung von aufgereinigtem Volon-A (PFTA-) und Triesence (TR-) waren bei diesem Versuchsdurchlauf mit 12,69% (PFTA-) und 12,45% (TR-) ungefähr gleich ausgeprägt.

Der avitale Anteil der Kenalog-Probe (KL-) bei direktem Kontakt lag bei 10,42%.

In der Kontrolle (KTR), sowie in den Proben mit Insertverwendung lag eine Prozentzahl von unter 0,8% vor. Auffallend war hier die gute Verträglichkeit von Kenalog (KL+).

*Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich bei KL- und PFTA- eine signifikante (*p<0,05) bei KL+ und TR- eine höchst signifikante (**p>0,005) Differenz.*

3.2. RGC-5-Zellen

3.2.1. Toxizitätstest

Um die Toxizität der drei Triamcinolonpräparate zu überprüfen wurde auch bei den Ganglienzellen der MTT-Test angewandt. Durch diesen Test wird nach Medikamenteninkubation die Visualisierung der vorhandenen Zellvitalität ermöglicht. Die Stärke der Einfärbung ist proportional zur Anzahl der noch lebenden Zellen.

Die Herstellung und Durchführung des Versuchs wurde in Kapitel 2.5.1. beschrieben.

3.2.1.1. Toxizität von Triesence und Volon-A bei direkter und indirekter Exposition der RGC-5

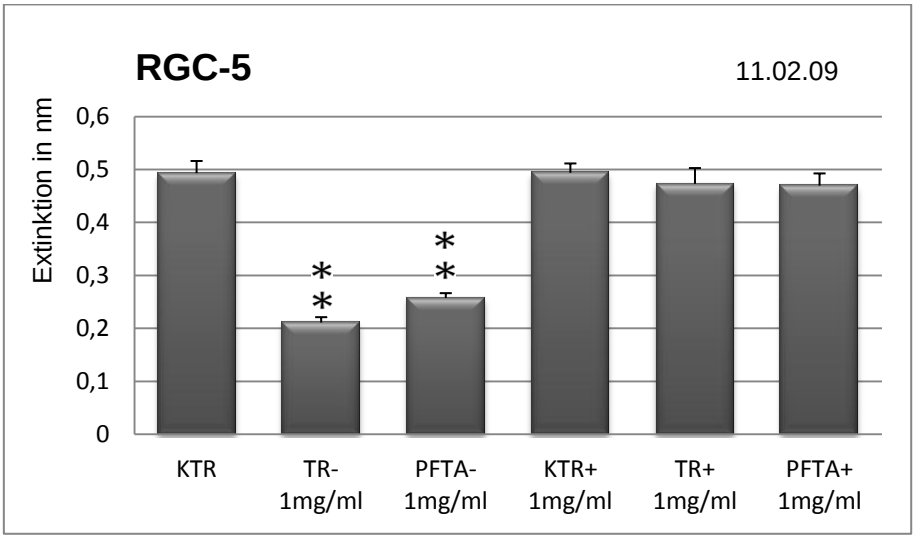


Abb. 15:

Der direkte Einfluss beider Medikamente bei 1mg/ml zeigte auch eine starke zytotoxische Wirkung auf die RGC-5-Zellen. Triesence (TR-) wies dabei eine größere toxische Wirkung auf die Zellen auf, als das aufgereinigte Volon-A (PTFA-). Bei

Verwendung von Inserts wurden die Präparate (TR+ und PFTA+) gut toleriert.

*Höchst signifikante Unterschiede (**p< 0,005) zur Kontrolle zeigten Triesence (TR-) und Volon-A (PFTA-) bei direktem Kontakt zu den Zellen.*

3.2.1.2. Toxizität von Triesence und Volon-A bei direkter und indirekter Exposition der RGC-5 bei einer Konzentration von 0,1mg/ml

Um den Einfluss von Triesence und Volon-A auf die RGC-5-Zellen bei geringenen Konzentrationen zu ermitteln, wurden die Medikamente auf 0,1mg/ml verdünnt.

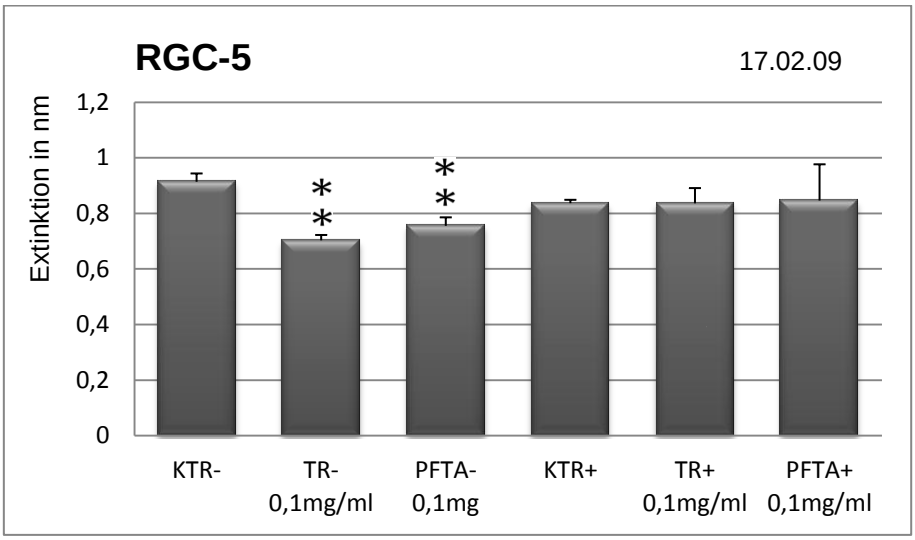


Abb. 16:

Mit Verdünnung der Medikamente sank auch deren Toxizität. Bei der Konzentration von 1mg/ml zeigte sich in den Versuchen zuvor eine Senkung der Zellvitalität bei Triesence und Volon-A etwa um die Hälfte. Hier ist diese Minderung nicht ganz so stark ausgeprägt. Die stärkere negative Wirkung des Triesence(TR-) im Vergleich zu Volon-A (PFTA-) wurde auch bei diesem

Versuch festgestellt. Der indirekte Kontakt der Präparate (TR+ und PFTA+) wird von den RGC-5-Zellen gut toleriert.

*Im Vergleich zur Kontrolle waren die Ergebnisse von TR- und PFTA- höchst signifikant (**p< 0,005).*

3.2.1.3. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog bei direkter Exposition der RGC-5

Als drittes Medikament wurde auch an den RGC-5-Zellen, zusätzlich zu Triesence und Volon-A, das Präparat Kenalog getestet.

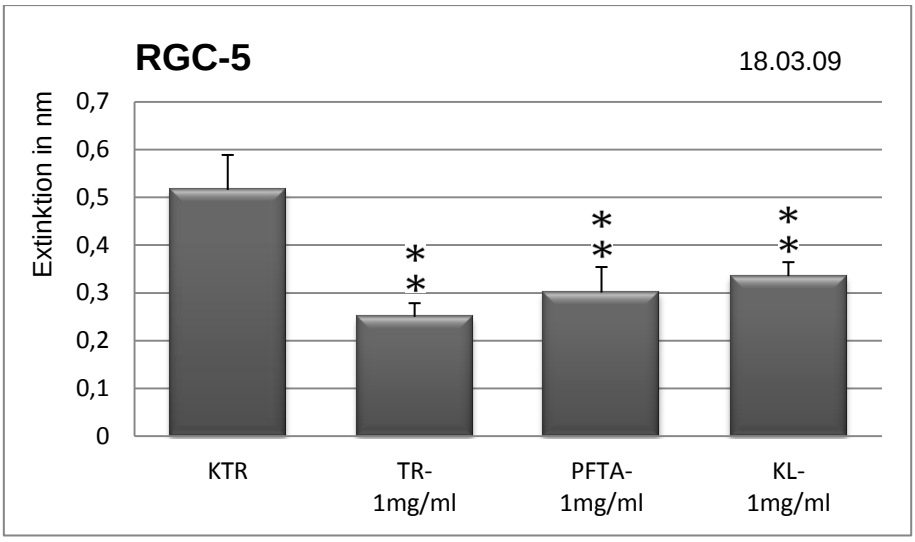


Abb. 17:

Ohne Filter wiesen alle drei eine toxische Wirkung auf die RCG-5-Zellen auf. Dabei Triesence (TR-) am stärksten toxisch, gefolgt von Volon-A (PFTA-), Kenalog (KL-) zeigte sich am wenigsten schädlich.

*Alle getesteten Proben unterschieden sich höchst signifikant (**p< 0,005) zur Kontrolle.*

3.2.1.4. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog bei direkter Exposition der RGC-5

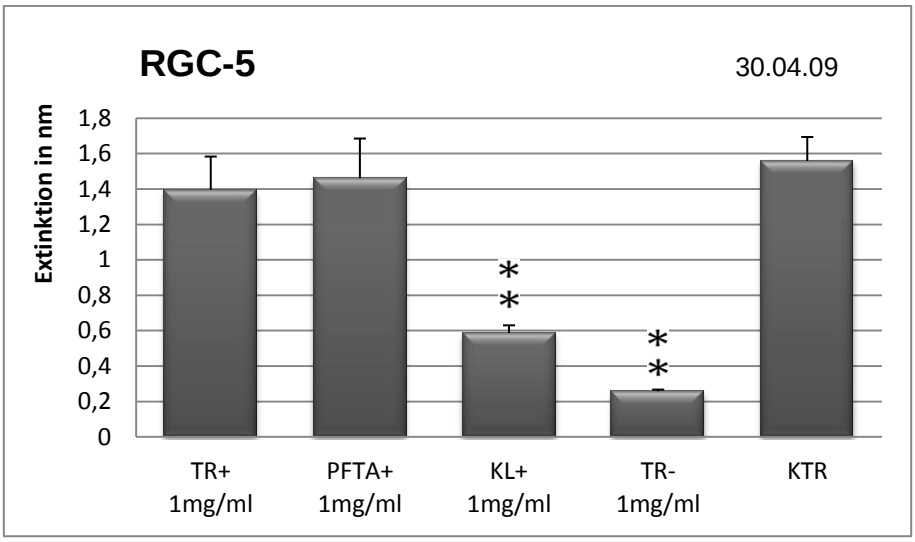


Abb. 18:

Die vorherigen Ergebnisse bei indirektem Kontakt des Triesence (TR+) und des aufgereinigten Volon-A (PFTA+) wurden hier erneut bestätigt. Bei Verwendung von Filtern überraschte jedoch eine ausgeprägte Toxizität des Kenalogs (KL+) auf die RGC-5-Zellen, obwohl der direkte Kontakt eigentlich ausblieb. Erwartet wurde, dass bei Applikation des Medikaments in die Inserts sich, wie bei seinen Konkurrenten, kein negativer Einfluss auf die Zelllinien bemerkbar machen würde. Beim ersten Insertversuch mit Kenalog stellte sich heraus, dass dieses Präparat zwar im direkten Kontakt weniger toxisch, mit Inserts jedoch im fast gleichen Ausmaß toxisch wirkt.

*Die Differenz der Ergebnisse von KL+ und TR- waren im Vergleich zur Kontrolle höchst signifikant (**p< 0,005).*

Vergleicht man mit bloßem Auge alle drei Produkte, erkennt man, dass die Kristalle von Triesence und Volon-A gut sichtbar sind und unregelmäßig und flockig wirken. Bei Kenalog hingegen erscheinen die Kristalle klein und gleichmäßig, wie feines Pulver.

Wir vermuteten, dass der Durchmesser der Insertporen von 0,4µm eventuell zu groß sein könnte für die kleinen Kristalle des Kenalogs. Bestätigt wurde dies, nachdem Kenalog, gelöst in PBS, für einen Tag in einem Insert belassen wurde. Am nächsten Tag waren im Mikroskop nach Entfernung der Inserts Kristalle am Boden des Wells selbst zu sehen. Somit wurde die Vermutung bekräftigt, dass Kenalogkristalle durch die Membran diffundiert waren und somit den Zelltod ausgelöst hatten.

Auch bei den mikroskopisch fotografierten Bildern zeigen sich sichtbare Unterschiede zwischen den Präparaten.

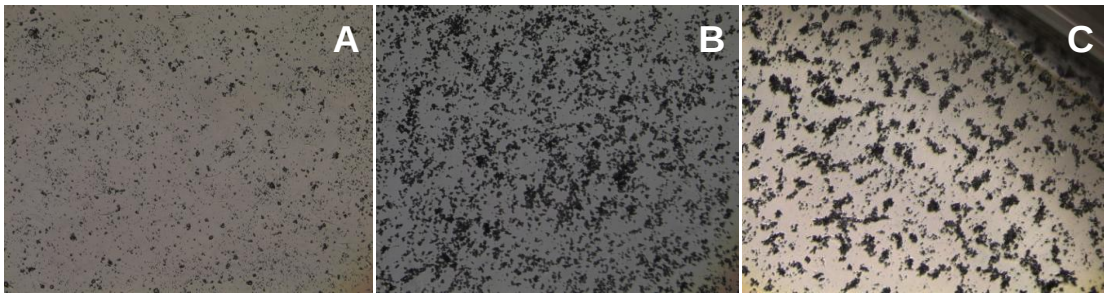


Abb. 19:

Diese Abbildung zeigt die unterschiedlich kristalline Form der drei Triamcinolonpräparate.
Bild A zeigt die feinen Kristalle des Kenalogs, die sich gleichmäßig verteilen. In Bild B ist die Konsistenz des Triesence zu erkennen, in Bild C die des Volon-A. In Bild B und C wird deutlich, dass diese beiden Präparate größere Kristalle besitzen, die sich schlecht verteilen und sich eher zu Clustern zusammenlagern.

3.2.1.5. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog bei direkter und indirekter Exposition der RGC-5

Als Maßnahme zum Entfernen der Kristalle wurde das mit Starving Medium verdünnte Kenalog in der Multifuge S-R 3 von Heraeus für 20 Minuten bei 4400 Umdrehungen zentrifugiert. Am Boden des Zentifugenröhrchens bildete sich ein deutlicher weißer Niederschlag. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und im Anschluss auf die Zellkulturen appliziert.

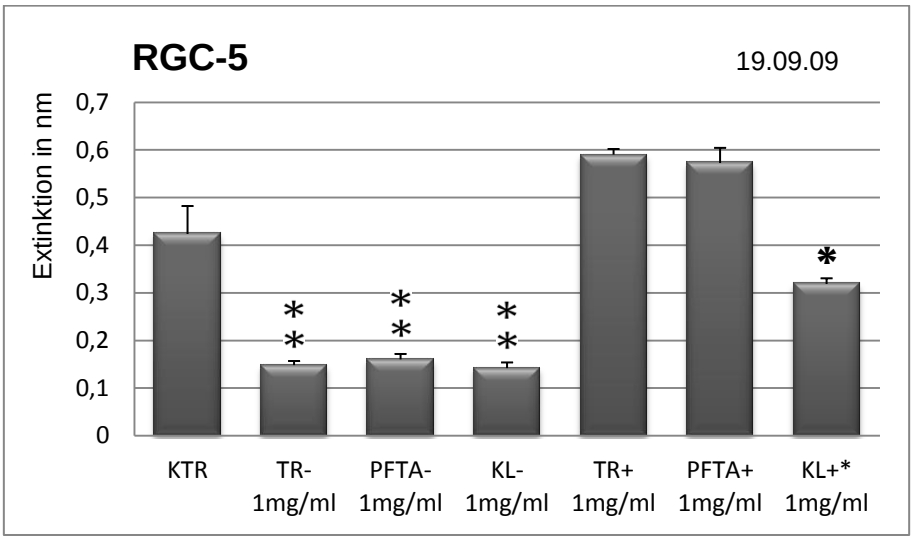


Abb. 20:

Der MTT-Test offenbarte erneut einen toxischen Einfluss des zuvor zentrifugierten Kenalogs (KL+) auf die Zellen, trotz Zentrifugation. Zwar war die toxische Wirkung nicht ganz so ausgeprägt, wie bei der direkten Applikation (KL-), dennoch war sie eindeutig.*

Die Wirkungen von Triesence und Volon-A in direktem und indirektem Kontakt wurden hier erneut bestätigt. Von Triesence (TR-) geht bei direkter Berührung der Zellen die stärkste toxische Wirkung hervor, gefolgt von Volon-A (PFTA-), am wenigsten schädlich ist Kenalog (KL-). Der indirekte Kontakt

von Triesence (TR+) und Volon-A (PFTA+) hatte keinen toxischen Einfluss.

*Die Ergebnisse von TR-, PFTA- und Kenalog wiesen zur Kontrolle eine höchst signifikante (**p< 0,005) und das zentrifugierte Kenalog eine signifikante (*p< 0,05) Differenz auf.*

3.2.1.6. Toxizität von zentrifugiertem Kenalog und dessen Konservierungsmittel Benzylalkohol

Da bereits bei Volon-A die Toxizität auf dessen Konservierungsmittel zurückgeführt wurde, mutmaßte man nun, dass der konservierende Benzylalkohol den Tod der Zellen herbeiführte. Mit diesem Experiment versuchte man dies zu bestätigen und gab zentrifugiertes Kenalog zu den Kulturen und zusätzlich 1%igen Benzylalkohol, im selben Maße verdünnt, dass physiologische Bedingungen erreicht wurden.

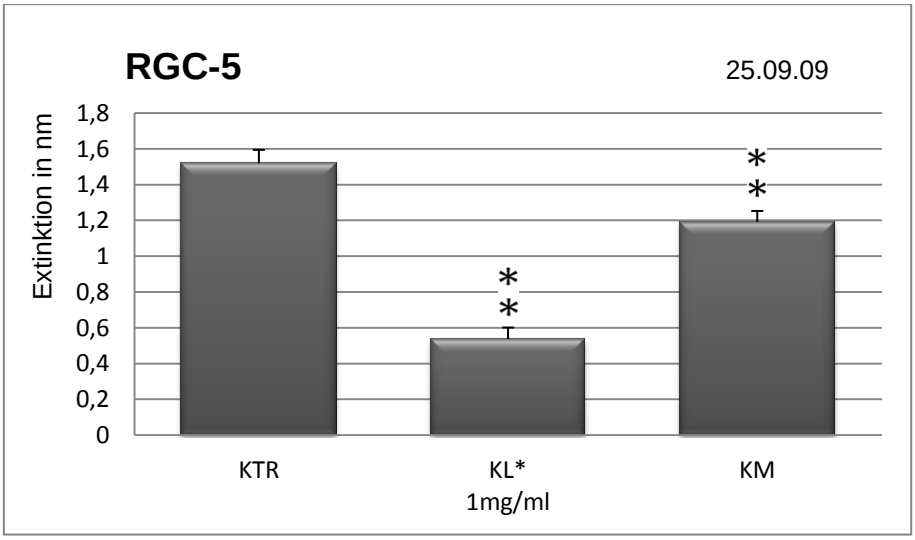


Abb. 21:

Das Resultat zeigte zwar, dass das Konservierungsmittel Benzylalkohol (KM) ebenfalls zum Zelltod führte, jedoch nicht

im selben Ausmaß, wie das präparierte Kenalog (KL). Die Ergebnisse waren zur Kontrolle höchst signifikant (**p< 0,005).*

Die Toxizität muss also entweder von einem anderen Inhaltsstoff herrühren oder daran liegen, dass die feinen Kristalle beim Zentrifugieren nicht vollständig absinken und so noch ein kleiner Teil in der Flüssigkeit verbleibt. Infolgedessen wurde das zentrifugierte Kenalog zusätzlich durch einen Sterilfilter gepresst, der eine Porengröße von 0,22µm besitzt.

3.2.1.7. Toxizität von Kenalog auf die RGC-5 bei direkter Exposition nach Zentrifugation und nach Sterilfiltration

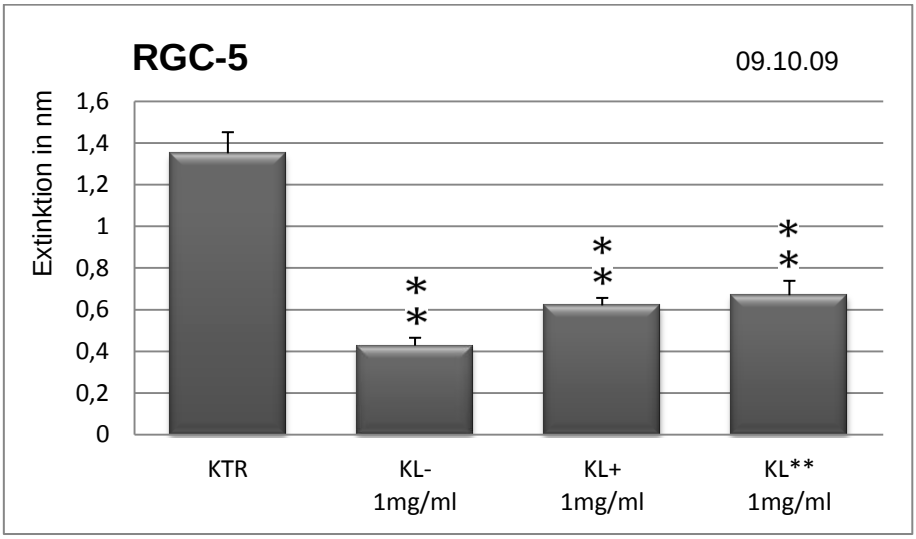


Abb. 22:

*Nach Sterilfiltration des Kenalogs (KL**) zeichnete sich ab, dass auch diese Maßnahme nur zu einer geringfügigen Abschwächung der Toxizität führte. Alle drei Proben waren im Vergleich zur Kontrolle höchst signifikant (**p< 0,005).*

3.2.1.8. Toxizität von Triesence, Volon-A und Kenalog auf die RGC-5-Zellen mit und ohne vorhandenem Glaskörper

Eine weitere Versuchsreihe sollte den Effekt von TA-Kristallen, die sich ins Glaskörpergerüst einlagern, verdeutlichen. Die verwendeten Glaskörper waren zuvor aus Schweineaugen abpräpariert worden.

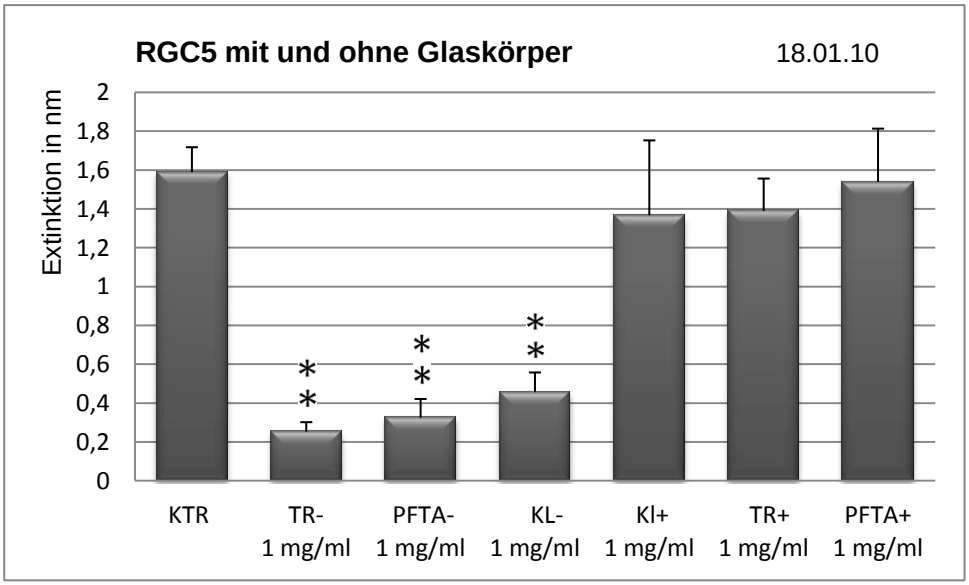


Abb. 23:

In den Bereichen, in denen die RGC-5-Zellen mit Glaskörper bedeckt waren, gab es keine signifikante Senkung der Zellviabilität (Kenalog KL+, Triesence TR+ und aufgereinigtes Volon-A PFTA+).

*War kein Glaskörper auf den Ganglienzellen, war die Wirkung von Triesence (TR-) am toxischsten, gefolgt von Volon-A (PFTA-). Kenalog (KL-) zeigte von allen drei Präparaten die geringsten Auswirkungen auf die Zellen. Die Unterschiede der Proben zur Kontrolle waren im direkten Kontakt der Zellen mit den TA-Kristallen höchst signifikant (**p< 0,005).*

Nach Entfernung des Glaskörpers konnte beobachtet werden, dass die Kristalle stark am Glaskörper hafteten und nur wenige Partikel in direktem Kontakt zu den Zellen verblieben. Die erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Glaskörpergerüst für die Triamcinolonkristalle eine Barriere darstellt und die retinalen Ganglienzellen vor dem toxischen Einfluss der TA-Kristalle schützt.

3.2.2. Live-Dead-Fluoreszenz-Test

3.2.2.1. Viabilität der RGC-5-Zellen nach direkter Exposition mit Volon-A und Triesence

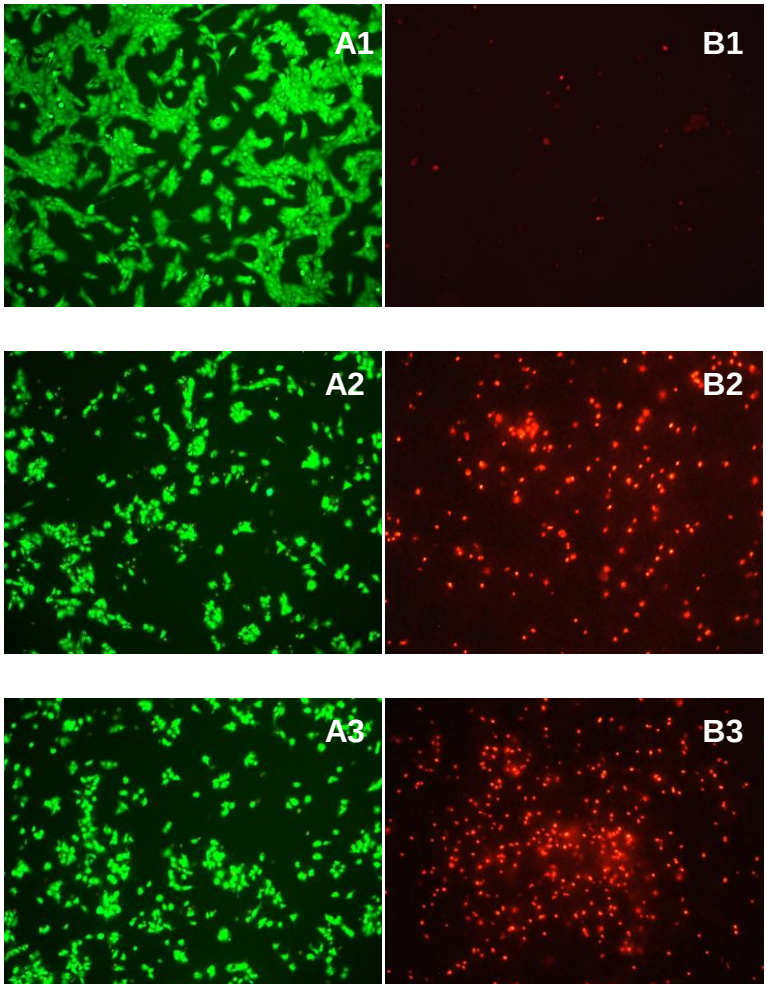


Abb. 24:

A1+B1:

Lebendkontrolle (KTR-)

A2+B2:

aufgereinigtes Volon-A (PFTA)

A3+B3:

Triesence (TR-)

Abb.: 24

Die Mikrofotografien der Abbildung 24 sind die digital dokumentierten Ergebnisse des Live-Dead-Tests. Die gesamte A-Reihe zeigt die vitalen Zellen, die durch eine Grünfluoreszenz markiert sind. In der B-Reihe sind durch Rotfluoreszenz die avitalen Zellen abgebildet. Von jeder Mikroskopeinstellung wurde je eine Live- und eine Dead-Aufnahme angefertigt um das Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen darzustellen.

In A1 und B1 werden Bilder der Lebendkontrolle gezeigt. Es befindet sich nur eine geringe Zahl toter Zellen in der Dead-Aufnahme. A2 und B2 dokumentieren den Einfluss des aufgereinigten Volon-A auf die RGC-5-Zellen. Die Dead-Aufnahme zeigt durch die hohe Zahl an toten Zellen die toxische Wirkung von Volon-A in direktem Kontakt. Die Abbildungen A3 und B3 zeigen die zytotoxische Wirkung von Triesence. In der Dead-Einstellung liegen deutlich mehr abgestorbene Zellen vor als bei Volon-A.

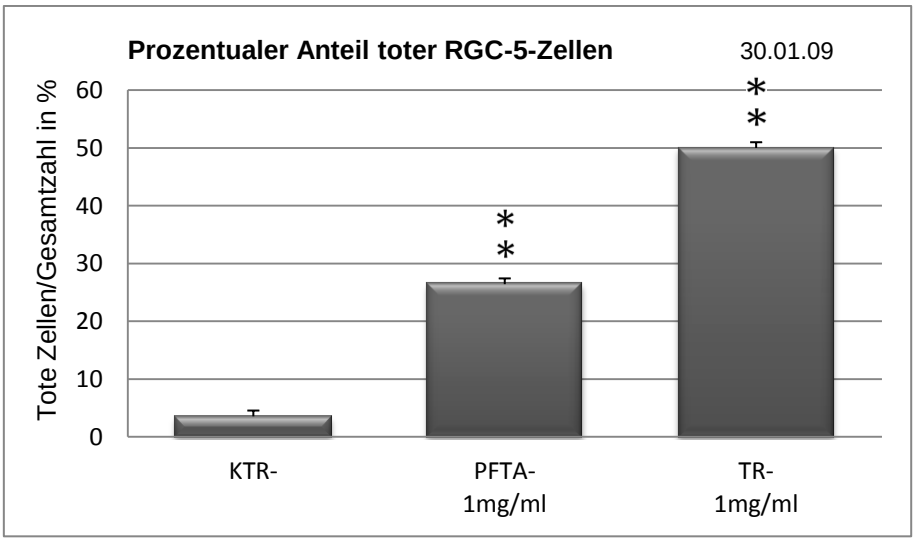


Abb. 25:

*Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der abgestorbenen RGC-5-Zellen nach 24-stündiger direkter Exposition mit aufgereinigtem Volon-A (PFTA-) und Triesence (TR-) im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen. Die Kontrolle (KTR) wies 3,57% abgestorbener Zellen auf, Volon-A 26,44% und Triesence 50,01%. Die Ergebnisse von PFTA- und TR- waren im Vergleich zur Kontrolle höchst signifikant (**p< 0,005).*

3.2.2.2. Viabilität der RGC-5-Zellen nach direkter und indirekter Exposition mit Volon-A und Triesence

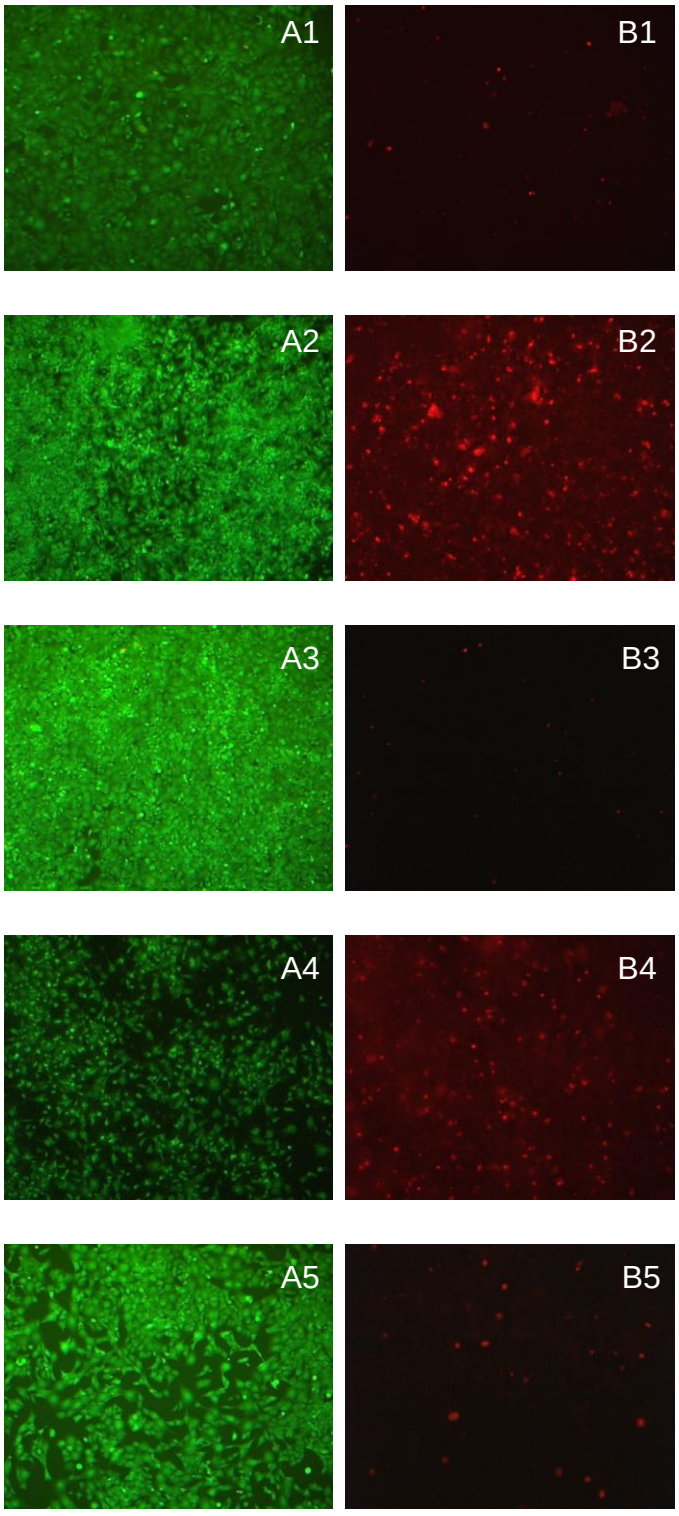


Abb. 26:

A1+B1:

Lebendkontrolle (KTR)

A2+B2:

aufgereinigtes Volon-A; direkte Exposition der Zellen (PFTA-)

A3+B3:

aufgereinigtes Volon-A; Verwendung von Zellkulturinserts (PFTA+)

A4+B4:

Triesence; direkte Exposition der Zellen (TR-)

A5+B5:

Triesence; Verwendung von Zellkulturinserts (TR+)

In Abbildung 26 zeigen die mikroskopisch angefertigten Aufnahmen der A-Reihe die vitalen RGC-5-Zellen (grün), in der B-Reihe sind die avitalen Zellen (rot) abgebildet. Beide Aufnahmen fanden bei der gleichen Kameraeinstellung statt.
In der Lebendkontrolle (A1 und B1) sind nur ganz wenig tote Zellen zu finden. A2 und B2 dokumentieren die direkte Wirkung von aufgereinigtem Volon-A auf die Zellen. In der Dead-Aufnahme sind deutlich eine große Anzahl abgestorbener Zellen zu erkennen (B2). Auch der toxische Einfluss von Triesence (B4) wurde eindrücklich durch viele avitale Zellen dargestellt. Die Verträglichkeit der Zellen bei indirektem Kontakt von Volon-A (B3) und Triesence (B5) durch Verwendung von Zellkulturinserts wird durch nur vereinzelt auftretende avitale Zellen bestätigt.

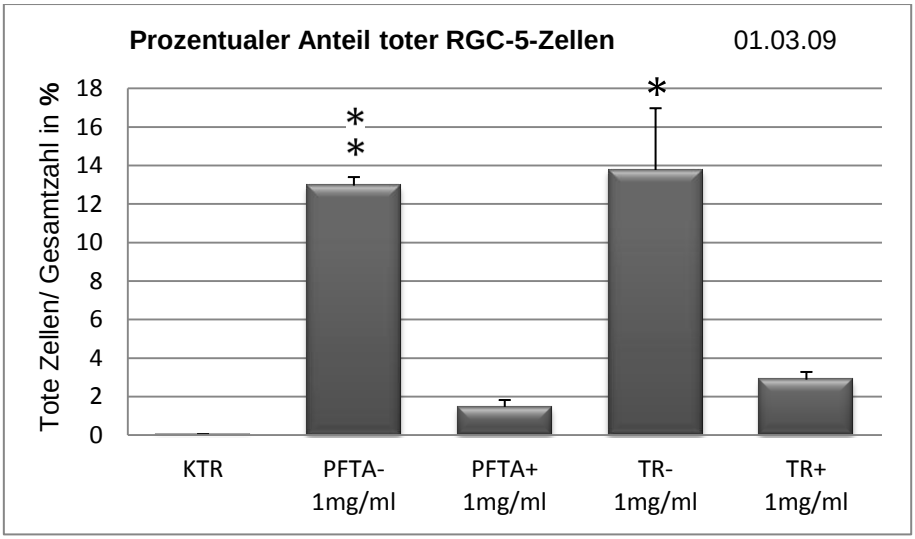


Abb. 27: *Das Diagramm der Abbildung 27 zeigt den prozentualen Anteil der abgestorbenen Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Bei direktem Kontakt der Präparate kam es in hohem Maße zum Zellensterben, der avitale Anteil der Volon-A-Probe (PFTA-) bei direktem Kontakt lag bei 12,95%, bei Triesence (TR-) bei 13,76%. Im Vergleich zur Kontrolle lag zu TR- ein signifikanter (*p< 0,05), zu PFTA- ein höchst signifikanter (**p< 0,005) Unterschied vor.*

3.2.2.3. Viabilität der RGC-5-Zellen nach direkter und indirekter Exposition mit Volon-A, Triesence und Kenalog

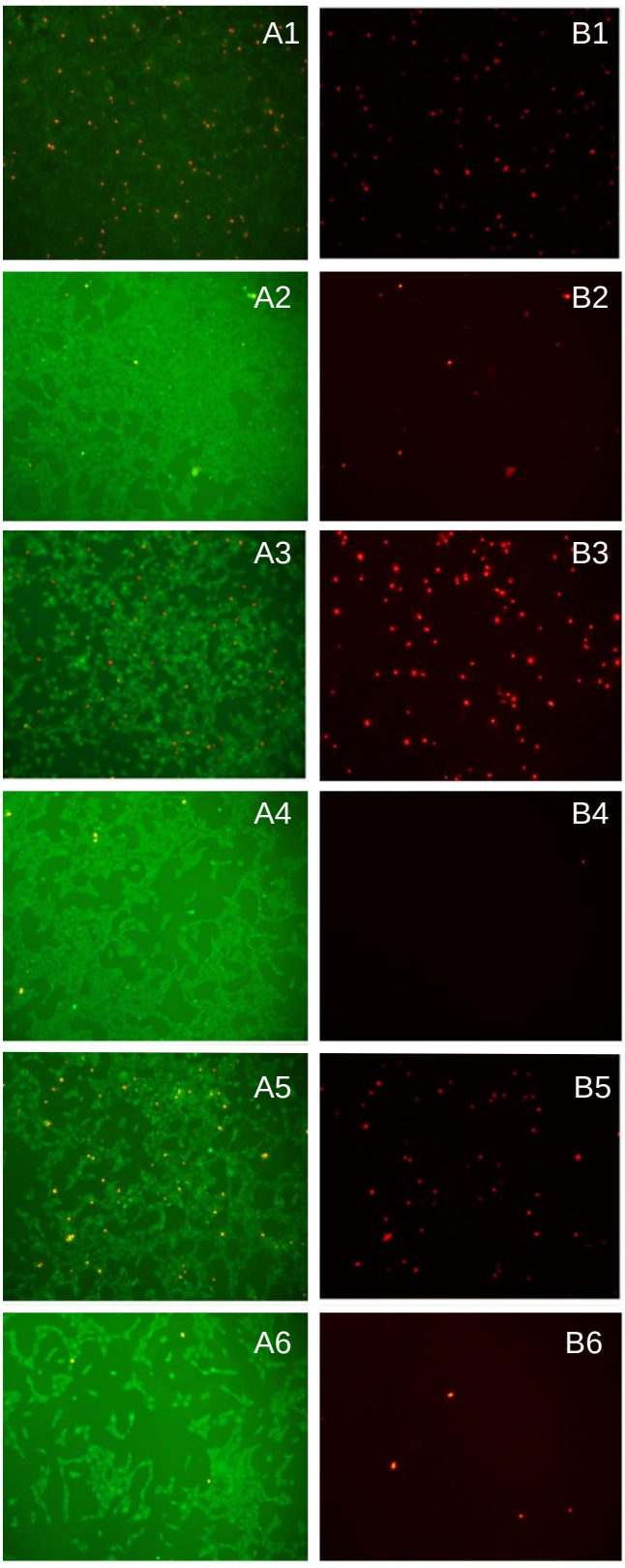


Abb. 28:

A1+B1:

aufgereinigtes Volon-A; direkte Exposition der Zellen (PFTA-)

A2+B2:

aufgereinigtes Volon-A; Verwendung von Inserts(PFTA+)

A3+B3:

Triesence; direkte Exposition der Zellen (TR-)

A4+B4:

Triesence; Verwendung von Inserts (TR+)

A5+B5:

Kenalog; direkte Exposition der Zellen (KL-)

A6+B6:

Kenalog; Verwendung von Inserts (KL+)

Die erstellten Fotografien in Abbildung 28 zeigen in Serie A die vitalen RGC-5-Zellen (grün) und in der B-Serie die avitalen Zellen (rot). Beide Aufnahmen wurden bei gleicher Kameraeinstellung angefertigt.

A1 und B1 zeigen den toxischen Einfluss von aufgereinigtem Volon-A auf die Zellen. In der Dead-Aufnahme sind deutlich eine große Anzahl abgestorbener Zellen zu erkennen (B1). Auch die toxische Wirkung von Triesence (B3) und Kenalog (B5) werden eindrücklich durch viele avitale Zellen dargestellt.

Die Verträglichkeit der Zellen bei indirektem Kontakt von Volon-A (B2) und Triesence (B4) durch Verwendung von Zellkulturinserts wird durch kaum auftretende avitale Zellen bestätigt.

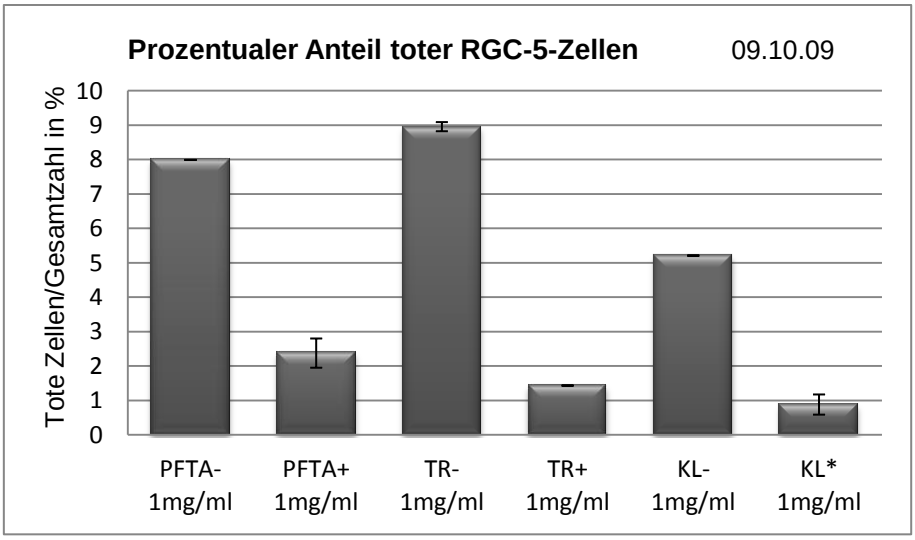


Abb.29

Das Diagramm stellt den prozentualen Anteil der toten Zellen zur Gesamtzahl dar. Es zeigt sich, dass in direktem Kontakt Triesence (TR-) mit 8,96% am toxischsten wirkt, gefolgt von aufgereinigtem Volon-A (PFTA-) mit 7,99% und Kenalog (KL-).

Auffällig ist hier die im Vergleich zu vorherigen Tests geringe Toxizität des zentrifugierten Kenalogs (KL) mit 0,88%.*

4. Diskussion

4.1. Einfluss der unterschiedlichen Triamcinolonpräparate auf ARPE-19- und RGC-5-Zellen

Die Toxizität von Volon-A und Kenalog in vitro bei direktem Kontakt zu adulten retinalen Pigmentzellen und retinalen Ganglienzellen wurde bereits 2003 durch Yeung et al. festgestellt [59] und zudem 2006 durch mehrere andere Autoren bestätigt, darunter auch die Tübinger Arbeitsgruppe Szurman et.al. [44]. Aus diesem Grund erhoffte man sich, dass Triesence bessere Ergebnisse liefert.

Die Ergebnisse der Toxizitätstests zeigten, dass alle drei getesteten Präparate bei direktem Kontakt zu den ARPE-19-Zellen, sowie den RGC-5-Zellen eine zytotoxische Wirkung ausüben. Dabei wurde mehrmals bestätigt, dass von Triesence die größte und von Kenalog die geringste Toxizität ausgeht, das zuvor aufgereinigte Volon-A liegt dabei in der Mitte.

Bei ausbleibendem Kontakt beider Zelllinien mit den Triamcinolonkristallen unter Verwendung von Zellkulturinserts wurden Triesence und das aufgereinigte Volon-A gut toleriert und es kam zu keinem Zellsterben. Kenalog hingegen zeigte hier eine unerwartete Toxizität, die möglicherweise durch dessen geringe Kristallgröße zu erklären war. Doch auch die Zentrifugation und eine anschließende Sterilfiltration durch einen 0,22µm großen Filter, der die Kristallpartikel entfernen sollte zeigte widererwarten keine vollständige Beseitigung der Toxizität.

Weitere Experimente verglichen den toxischen Einfluss des Konservierungsmittels Benzylalkohol zum präparierten Kenalog. Das Ergebnis zeigte zwar, dass das Konservierungsmittel ebenfalls zum Zelltod führte, jedoch nicht im selben Ausmaß wie Kenalog.

Wurden die RGC-5-Zellen mit Glaskörper bedeckt, stellten sich die selben Ergebnisse ein, wie in den Versuchen, bei denen der direkte Kontakt der Zellen durch Inserts unterbunden wurde – die Medikamente, hier ebenfalls auch

Kenalog, waren gut verträglich und verursachten keine signifikante Minderung der Zellviabilität.

Bildlich festgehalten und bestätigt wurden die vorangegangenen Schlüsse durch die parallel laufenden Live-Dead-Fluoreszenz-Tests, die eindrücklich die Toxizität aller drei Präparate veranschaulichen.

4.2. Toxische Wirkung des Kortikosteroids Triamcinolon

Bereits frühere Studien der Tübinger Arbeitsgruppe Szurman beschäftigten sich ausgiebig mit dem Wirkstoff Triamcinolon und dessen Einfluss auf retinale Zellen.

Im Jahr 2006 machte die Tübinger Forschungsgruppe einen großen Fortschritt, welcher prägend für das Verständnis der toxischen Wirkung des Triamcinolons in vitro im Vergleich zu den guten in vivo erzielten Ergebnissen war.

Zu diesem Zeitpunkt gab es bereits mehrere Studien, die die Toxizität des Triamcinolons in vitro untermauerten. Szurman et. al. gelang es, die unterschiedliche Wirkung des Triamcinolons in Abhängigkeit unterschiedlicher Versuchsbedingungen aufzuzeigen. Sie verwendeten in ihren Zellversuchen erstmals die Boyden-Kammer. Diese Kammer unterbindet den direkten Kontakt der kristallinen Partikel mit den retinalen Zellen, nur das gelöste Triamcinolon gelangt so in Kontakt mit den Zellkulturen. So offenbarte sich erstmals die in vivo beobachtete Triamcinolon-Toleranz der Zellen, denn in dieser gelösten Form fand kein toxischer Einfluss auf die Zellen statt.

Die Exposition der retinalen Zellen mit gelösten Triamcinolon allein verursachte zwar eine moderate antiproliferative Wirkung, in dem es die DNA-Synthese hemmte, war jedoch nicht zytotoxisch.

Im Gegensatz dazu stellte sich bei direktem Kontakt zwischen Zellen und Präparat ein schnell fortscheitender und konzentrationsabhängiger Zelltod ein,

der mit einer Änderung der Zellmorphologie einherging , welche zum Verlust der intakten Zellmembran führte [44].

Im darauffolgenden Jahr führte die Arbeitsgruppe um Szurman weitere Versuchsreihen durch, in denen die Auswirkungen von Triamcinolon bei direkter und indirekter Exposition der retinalen Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht wurden.

Bei Applikation der Triamcinolonkristalle unmittelbar auf den Zellrasen kam es bereits bei einer Konzentration von 0,058mg/ml zum rasanten Zellsterben. Diese Konzentration liegt knapp über dem Löslichkeitsprodukt des Triamcinolons, jedoch weit unter den klinisch angewandten Dosen. Zudem zeigte sich, dass mit zunehmender Triamcinolonkonzentration nicht nur vermehrt der Zelltod eintritt, sondern dadurch auch beschleunigt wird.

Bei Verwendung der Boyden-Kammer hingegen wurden sogar Konzentrationen von bis zu 7,7mg/ml toleriert. Sogar bei höchsten Konzentrationen konnte keine Änderung der Zellmorphologie oder ein Zellsterben beobachtet werden.

Zudem wurde untersucht, ob die Zellen nach einwöchiger Triamcinolon-exposition das Potential besitzen sich wieder zu erholen. Wie zu erwarten entfaltete Triamcinolon seine antiproliferative Wirkung, unabhängig davon, ob ein Filter verwendet wurde oder nicht. Allerdings war dieser Effekt bei Verwendung der Boyden-Kammer vollständig reversibel, wohingegen bereits bei minimalsten Dosen der direkte Kontakt zytotoxisch war und den Zelltod auslöste.

Weiterhin erforschten sie bezüglich der guten Biokompatibilität in klinischen Versuchsreihen die Einflüsse des Glaskörpergerüsts und der Basalmembran. Es wurde deutlich, dass beide eine protektive Funktion besitzen, welche die retinalen Zellen vor dem toxischen Effekt des Triamcinolons schützen. In Regionen, die mit dem Glaskörper oder einer Basalmembran bedeckt waren, wurde kein Absterben der Zellen bei Triamcinolonexposition ausgelöst [45].

4.3. Konservierungsmittelfreiheit des Triesence

Bis zur Neuerscheinung des Medikaments Triesence 2007 gab es bislang auf dem Markt nur konservierungsmittelhaltige Triamcinolonpräparate zur intravitrealen Injektion. In Deutschland wurde üblicherweise Volon-A verwendet, in den USA hingegen Kenalog.

Beide Präparate werden jedoch vor ihrer Injektion aufbereitet, um sie von dem Inhaltsstoff Benzylalkohol zu befreien. Benzylalkohol, von dem man bereits lang vermutet, dass von ihm eine retinale Zytotoxizität ausgeht, dient der Konservierung der Medikamente. In speziell dafür entwickelten Aufreinigungsverfahren wird diese Ingredienz entfernt.

Patienten, die konservierungsmittelhaltige Triamcinolon-Injektionen erhielten, entwickelten oftmals eine sterile Endophthalmitis, welche vermutlich vom Benzylalkohol verursacht wurde [43].

Der in Kapitel 3.2.1.6. durchgeführte Versuch bestätigt den Verdacht der Toxizität des Konservierungsmittels, wobei dieser toxische Effekt vergleichsweise recht niedrig ausgeprägt war.

Dadurch, dass Triesence den Bestandteil Benzylalkohol nicht enthält, ist somit die Gefahr einer sterilen Endophthalmitis beseitigt. Zudem fällt die aufwändige Vorbereitung vor der intravitrealen Injektion weg und erspart daher einen Arbeitsschritt. Allerdings ist diese Maßnahme einfach und ohne großen Zeitaufwand und wurde ohnehin von einer Vielzahl der Anwender konsequent durchgeführt.

4.4. Konservierungsmittel Benzylakohol im Präparat Kenalog

Da die schlechten Ergebnisse des Kenalogs bei indirekter Exposition der Zellen mit dem Präparat zuerst nicht erwartet wurden, ging man zunächst davon aus, dass diese Ergebnisse daraus resultierten, dass die vergleichsweise kleinen Triamcinolonkristalle durch die in den Inserts integrierten Membranen

hindurchdiffundierten. Nachdem nach Zentrifugation und Sterilfiltration der physiologisch verdünnten Kenaloglösung dennoch keine besseren Resultate erzielt wurden, dachte man, dass das Konservierungsmittel Benzylalkohol für die toxische Wirkung verantwortlich war. Experimentelle Untersuchungen zeigten aber, dass von ihm zwar eine Zelltoxizität ausgeht, jedoch aber nicht im gleichen Maße, wie vom präparierten Kenalog. Somit konnte in der hier durchgeführten Versuchsreihe nicht eindeutig geklärt werden, woher die toxische Wirkung des Kenalogs herrührt.

Auch die Versuche von Szurman et. al. zeigten 2006, dass das Vehikel Benzylalkohol in den gängigen Triamcinolonpräparaten hinsichtlich der Toxizität nur eine untergeordnete Rolle spielt. Dennoch ist es ratsam prophylaktisch die Präparate durch ein Aufreinigungsverfahren vom Konservierungsmittel zu befreien[44].

Es kann nur gemutmaßt werden, dass die Zentrifugation und die Sterilfiltration der Kenaloglösung keine absolute Freiheit von Kenalogkristallen erzielte und die Zellen trotz aller Maßnahmen dennoch in direkten Kontakt mit den Kenalogpartikeln kamen.

4.5. Triesence und Kenalog

Bis zur Zulassung von Triesence im Jahr 2007 war bisher Kenalog das gängige Therapeutikum zur intravitrealen Injektion in den USA. Bereits im November 2006 wurde eine Änderung der Etikettaufschrift von Kenalog veranlasst [49], die von dort an die intraokuläre Anwendung untersagte. Triesence hingegen wird damit beworben, dass es insbesondere zur intravitrealen Gabe geeignet ist.

Allerdings bezieht sich der Hersteller Alcon bei seinem Zulassungsantrag immer wieder auf die langjährige gute Erfahrung mit Kenalog [42]:

Triescence (triamcinolone acetonide injectable suspension) is a sterile, terminally sterilized, nonpreserved, single-dose, injectable ophthalmic suspension containing 40 mg/mL of triamcinolone acetonide which is

pharmaceutically and therapeutically equivalent to a marketed product KENALOG®-40 (NDA 14-901, Bristol-Myers, Squibb, Princeton, NJ)…There is over a 40 year history of use of the active ingredient, triamcinolone acetonide, in the United States (marketed by Bristol-Myers, Squibb, Princeton, NJ, as KENALOG-40) with adequate demonstration of safety and efficacy for the treatment of sympathetic ophthalmia, temporal arteritis, uveitis and ocular inflammation unresponsive to topical corticosteroids" [42, 54].

Weiterhin erklärt der Hersteller Alcon, dass sein Produkt in Kaninchenversuchen ähnliche Ergebnisse erzielte, wie unter anderem Kenalog: „In rabbit studies, these formulations were found to perform in a similar clinical manner to currently marketed formulations not intended for intraocular use, e.g. KENALOG®-40 " [42, 54].

Die klinische Sicherheit des Produkts wird durch Studien unterstützt, welche ebenfalls zum Großteil mit Kenalog durchgeführt worden waren.

"The applicant reported that in total 30 peer reviewed publications that evaluated triamcinolone acetonide for the treatment of ophthalmic diseases and conditions supported by Kenalog-40 (NDA 14-901) were included in the clinical database of NDA 22-048" [55].

Außerdem steht in der Clinical pharmacology and biopharmaceutics review der FDA über Triesence, dass vom Konzern Alcon bisher keine klinischen Studien am Menschen gibt:

„The Applicant did not perform any human pharmacokinetic assessments of TRIESENCE injectable ophthalmic suspension. To address the requirement for submission of the evidence of bioavailability, the applicant submitted published literature documenting the intraocular and systemic exposure of triamcinolone acetonide following intravitreal administration... No further pharmacology clinical studies are required" [50].

Die Besonderheiten von Triesence im Gegensatz zu Kenalog werden dort wie folgt beschrieben:

„The proposed drug product was developed with no preservative and reduced concentrations of the wetting agent and the suspending agent and with the addition of essential ions, tonicity agent and buffering agents, compared to KENALOG-40” (NDA 22-048/22-223) [50]. Allerdings wird nicht weiter erläutert, um welche Inhaltsstoffe es sich dabei genau handelt und weshalb diese Änderung zur intravitrealen Anwendung besser geeignet sein soll, als andere Triamcinolonpräparate.

4.6. Abhängigkeit der Toxizität von der Aggregatgröße der Triamcinolonpräparate

Bei Betrachtung der drei Medikamente hinsichtlich ihrer Beschaffenheit ist bereits mit bloßem Auge ein Unterschied offensichtlich. In allen drei ist eine kristalline Lösung zu erkennen, jedoch variiert die Größe der Partikel. Während in Kenalog eher sandkornartige Kristalle befinden, kann man in Triesence, sowie in Volon-A unregelmäßig geformte, sich zu Aggregaten zusammenlagernde Kristalle erkennen.

In diesem Zusammenhang veröffentlichten 2009 Moshfeghi et. al. ihre Ergebnisse hinsichtlich der Aggregatgröße dieser drei Medikamente. In ihren Untersuchungen maßen sie die Ausdehnung der Aggregate zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, zuerst unmittelbar nach Applikation und erneut nach zehn Minuten. Die Größe der zusammengelagerten Aggregate war von der ersten Messung zur zweiten deutlich angestiegen [33].

	0 Minuten	10 Minuten
Triesence(TR)	250±30µm^2	516±53 µm^2
Volon-A (PFTA)	132±64µm^2	116±33µm^2
Kenalog (KL)	177±49µm^2	250±62µm^2

***Tab. 2**: Aggregatgröße von Triamcinolonpräparaten [33]*

Dabei bildete Triesence die größten Aggregate, gefolgt von Kenalog und Volon-A mit der geringsten Ausdehnung der Aggregate. Letzteres stach jedoch durch die Anzahl der gebildeten Aggregate vor, die deutlich höher lag als bei den anderen beiden.

Diese Resultate könnten hinsichtlich meiner erlangten Ergebnisse Aufschluss über die auffällig höhere Toxizität des Triesence geben. Die Konzentration des Wirkstoffs steigt lokal mit der Größe der Aggregate und in Folge dessen entfaltet sich dort die Toxizität am stärksten und es kommt vermehrt zum Zelltod der Zellkulturen.

Diese Annahme wird ebenfalls durch die digital erstellten Mikroskopie-fotografien im Zusammenhang mit den Live-Dead-Tests unterstützt. Vergleicht man die Durchlichtaufnahmen mit den Bildern, auf denen die toten Zellen durch eine Rotfluoreszenz gekennzeichnet wurden, kann man in den Regionen, die durch eine verstärkte Triamcinolonansammlung auffallen, ebenfalls eine vermehrte Ansammlung an abgestorbener Zellen erkennen.

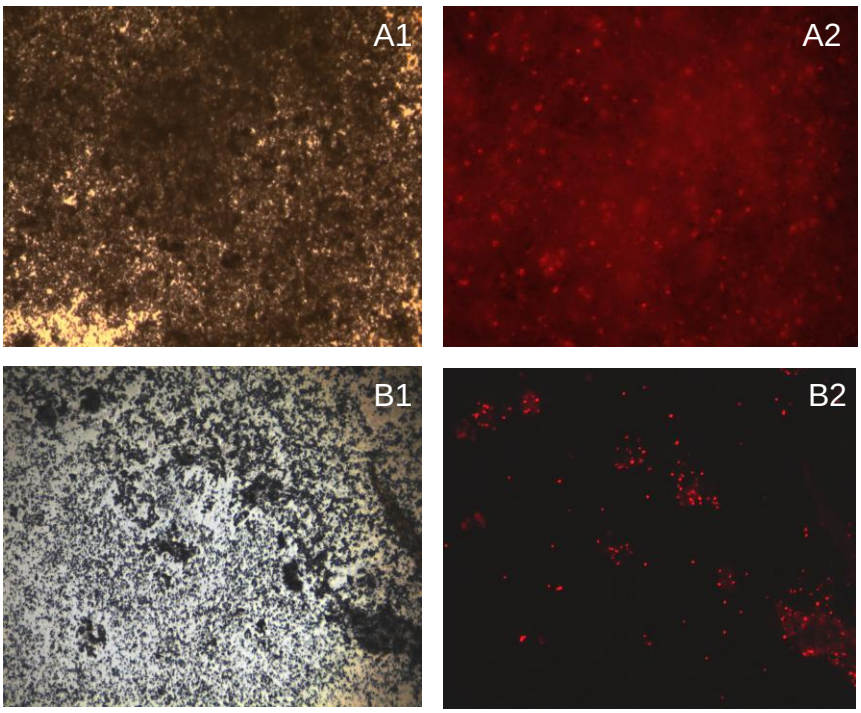


Abb. 30:

A1+A2:

Triesence

B1+B2:

Volon-A

Abb. 30: *Aggregatbildung von Triamcinolonpräparaten*

Das Bild A1 der Abbildung 30 zeigt die Durchlichtaufnahme des mit Triesence bedeckten Zellrasens. Das Medikament liegt großflächig verteilt über der Kultur. In A2 sieht man die dazugehörige Aufnahme der toten Zellen mit Rotfluoreszenz. Verhältnismäßig zur Ausdehnung des Präparats befinden sich überall abgestorbene Zellen.

B1 ist eine Durchlichtaufnahme vom Präparat Volon-A. Vereinzelt sind dichte, große Aggregatbildungen zu erkennen. In B2 wird eindrücklich gezeigt, dass in diesen Clustern verstärkt tote Zellen vorhanden sind.

4.7. Diskrepanz zwischen klinischen und experimentellen in vitro Ergebnissen

Wie bereits mehrfach erwähnt, existieren zum Wirkstoff Triamcinolon zahlreiche Studien. Einerseits wird die klinische Sicherheit der Substanz immer wieder bestätigt, andererseits zeigen in vitro Experimente, wie auch in dieser Arbeit, dass es ausgeprägte Zelltoxizität besitzt.

Der Glaskörperversuch demonstriert, wie sich Triamcinolon bei der intravitrealen Injektion verhält. Die Kristalle lagern sich ins Glaskörpergerüst, ohne angrenzende Zellstrukturen zu berühren, somit kommt es nicht zum Zellsterben. Das Glaskörpergerüst dient also als Schutzbarriere der Zellen.

Bei einer Vitrektomie wird beim Patienten der Glaskörper entfernt. Dieser chirurgische Eingriff ist unter anderem beispielsweise bei Netzhautablösungen oder einer fortgeschrittenen diabetischen Retinopathie erforderlich.

Bei fehlendem Glaskörpergerüst entfällt dessen protektive Funktion. Bei intraokulärer Gabe von Triamcinolon kann es so zur Ablagerung von dessen Kristallen auf der Netzhaut und deren Ganglienzellen kommen und diese schädigen. Somit ist eine intravitreale Injektion bei Patienten, bei denen eine Vitrektomie durchgeführt wurde, nicht zu empfehlen, vor allem, wenn ein Peeling der Membrana limitans intema (ILM) stattgefunden hat, womit die letzte protektive Barriere entfernt wurde.

4.8. Triesence vs. Kenalog und Volon-A

Als Triesence als neues Triamcinolonpräparat eingeführt wurde, waren die Erwartungen groß. Man erhoffte sich, dass dieses Präparat bei Versuchen, die in vitro durchgeführt wurden, besser abschloss, als die bisherig verfügbaren Medikamente.

Diese Versuchsreihe konnte zeigen, dass im Vergleich Triesence am schlechtesten von allen drei getesteten Präparaten abgeschnitten hat. Zudem zeigte sich, dass der Konservierungsmittelfreiheit von Triesence keine große Bedeutung hinsichtlich der Toxizität gegeben werden muss.

Zudem sollte ein weiterer Faktor nicht vernachlässigt werden. Triesence ist um ein Vielfaches teurer als die beiden anderen Präparate. Letztendlich bleiben diese Kosten am Patienten hängen.

Angesichts der unzureichenden Ergebnisse und der daraus resultierenden fehlenden klinischen Sicherheit, andererseits auf Grund des immensen Preisunterschieds ist es erwägenswert, auch im Interesse der Patienten, in Europa Volon-A in der klinischen Anwendung anstelle von Triesence zu bevorzugen.

5. Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen der MTT-Tests, sowie den Live-Dead-Tests zeigten, dass alle drei getesteten Medikamente bei direktem Kontakt zu den ARPE-19-Zellen, sowie den RGC-5-Zellen, eine stark zytotoxische Wirkung ausübten. Triesence wies dabei die größte und Kenalog die geringste Toxizität auf. Das aufbereitete Volon-A lag in der Mitte.

Durch Verwendung der Boyden-Kammer wurde der direkte Kontakt zwischen den Zellkulturen und den Triamcinolonkristallen unterbunden, die Zellen waren so nur den gelösten Substanzen ausgesetzt. Weder bei Triesence, noch dem aufgereinigten Volon-A trat eine Minderung der Zellviabilität ein. Allerdings ging von Kenalog hier eine unerwartete Toxizität aus, welche wohl durch dessen geringe Kristallgröße zu erklären ist. Jedoch brachten weitere Maßnahmen, die die Kristallpartikel entfernen sollten keinen Erfolg. Trotz Zentrifugation und Sterilfiltration blieb Kenalog weiterhin zytotoxisch. Auf Grund dessen verglich man die Auswirkungen des präparierten Kenalogs und des Konservierungsmittels Benzylalkohol auf die Viabilität der retinalen Zellen. Zwar übte der Benzylalkohol eine gewisse Toxizität aus, jedoch nicht im selben Maße wie Kenalog.

Weitere Tests bei denen die RGC-5-Zellkulturen mit Teilen des Glaskörpers bedeckt waren, welche aus Schweineaugen gewonnen worden waren, bestätigten die bekannte gute klinische Verträglichkeit der Triamcinolon-präparate. Der Glaskörper fungierte als protektives Schutzschild vor den Triamcinolonkristallen. Alle drei Medikamente wurden in diesem Versuch von den Zellen gut toleriert und lösten kein Zellsterben aus.

Infolge der hier erlangten Ergebnisse, ist in der klinischen Anwendung die Therapie mit Volon-A der Therapie mit Triesence Vorzug zu geben.

6. Summary

In the context of this thesis a series of experiments were performed, which should reveal the different effects of the three triamcinolone preparations Triesence, Volon-A and Kenalog on ocular cells.

The results showed that all three tested drugs had a strong cytotoxic effect when applied directly to the ARPE-19-cells layer as well as to the RGC-5-cells. Triesence showed the greatest cytotoxicity, whereas the lowest toxicity was displayed by Kenalog.

By the use of a Boyden chamber direct contact between the triamcinolone crystals and the cells was prevented, so the cells were only exposed to the dissolved substances. A reduction of cell viability occurred at neither Triesence nor the purified Volon A. In this trial an unexpected toxicity, which could be explained by its low crystal size, was observed for Kenalog. Further measures, which should remove the crystalline particles, were not successful. Despite centrifugation and sterile filtration, Kenalog remained slightly cytotoxic. Furthermore, we compared the effects of Kenalog and the preservative benzyl alcohol on the viability of the retinal cells. In these experiments benzyl alcohol showed a mild toxicity, however, this was not in a similar dimension like for Kenalog which still induced a cytotoxicity that seemed to be partly independent from the preservative.

In another experiment the RGC-5-cell-cultures were covered with parts of the vitreous body, which had been obtained from pig eyes. The vitreous body functioned as a protective shield that prevented intimate contact between the triamcinolone crystals and the retinal cells. When dispersed within the vitreous gel all three medications were tolerated well and did not trigger any cell death.

Based on the results attained in this study, there is experimental evidence that purified Volon A might be preferable to Triesence for intravitreal therapy.

7. Literaturverzeichnis

1. Aiello LP, Brucker AJ, Chang S, Cunningham ET, Jr., D'Amico DJ, Flynn HW, Jr., Grillone LR, Hutcherson S, Liebmann JM, O'Brien TP, Scott IU, Spaide RF, Ta C, Trese MT (2004) Evolving guidelines for intravitreous injections. Retina 24:S3-19
2. Antcliff RJ, Spalton DJ, Stanford MR, Graham EM, ffytche TJ, Marshall J (2001) Intravitreal triamcinolone for uveitic cystoid macular edema: an optical coherence tomography study. Ophthalmology 108:765-772
3. Bartz-Schmidt KU, Ziemssen F (2008) Intravitreale Pharmakotherapie. Schattauer
4. Beer PM, Bakri SJ, Singh RJ, Liu W, Peters GB, 3rd, Miller M (2003) Intraocular concentration and pharmacokinetics of triamcinolone acetonide after a single intravitreal injection. Ophthalmology 110:681-686
5. Behl CR, Block LH, Borke ML (1976) Aqueous solubility of 14C-triamcinolone acetonide. Journal of pharmaceutical sciences 65:429-430
6. Benhamou N, Massin P, Haouchine B, Audren F, Tadayoni R, Gaudric A (2003) Intravitreal triamcinolone for refractory pseudophakic macular edema. American journal of ophthalmology 135:246-249
7. Blumenkranz MS, Claflin A, Hajek AS (1984) Selection of therapeutic agents for intraocular proliferative disease. Cell culture evaluation. Archives of ophthalmology 102:598-604
8. Carroll LA, Hanasono MM, Mikulec AA, Kita M, Koch RJ (2002) Triamcinolone stimulates bFGF production and inhibits TGF-beta1 production by human dermal fibroblasts. Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al] 28:704-709
9. Danis RP, Ciulla TA, Pratt LM, Anliker W (2000) Intravitreal triamcinolone acetonide in exudative age-related macular degeneration. Retina 20:244-250
10. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM (1996) ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. Experimental eye research 62:155-169
11. Fechner PU, Teichmann KD (2004) Medikamentöse Augentherapie. Georg Thieme Verlag
12. Gillies MC, Simpson JM, Billson FA, Luo W, Penfold P, Chua W, Mitchell P, Zhu M, Hunyor AB (2004) Safety of an intravitreal injection of triamcinolone: results from a randomized clinical trial. Archives of ophthalmology 122:336-340
13. Graham RO, Peyman GA (1974) Intravitreal injection of dexamethasone. Treatment of experimentally induced endophthalmitis. Archives of ophthalmology 92:149-154
14. Gupta VD (1983) Stability of triamcinolone acetonide solutions as determined by high-performance liquid chromatography. Journal of pharmaceutical sciences 72:1453-1456

15. Hida T, Chandler D, Arena JE, Machemer R (1986) Experimental and clinical observations of the intraocular toxicity of commercial corticosteroid preparations. American journal of ophthalmology 101:190-195
16. http://augenpraxis-kotkowski.de (2012) Injektion in den Glaskörper.
17. Huppelsberg J, Walter K (2005) Kurzlehrbuch Physiologie, 2. Auflage edn. Thieme Verlag KG
18. Ip MS, Gottlieb JL, Kahana A, Scott IU, Altaweel MM, Blodi BA, Gangnon RE, Puliafito CA (2004) Intravitreal triamcinolone for the treatment of macular edema associated with central retinal vein occlusion. Archives of ophthalmology 122:1131-1136
19. Ishibashi T, Miki K, Sorgente N, Patterson R, Ryan SJ (1985) Effects of intravitreal administration of steroids on experimental subretinal neovascularization in the subhuman primate. Archives of ophthalmology 103:708-711
20. Jonas JB, Hayler JK, Panda-Jonas S (2000) Intravitreal injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of proliferative vitreoretinopathy. The British journal of ophthalmology 84:1064-1067
21. Jonas JB, Kreissig I, Hugger P, Sauder G, Panda-Jonas S, Degenring R (2003) Intravitreal triamcinolone acetonide for exudative age related macular degeneration. The British journal of ophthalmology 87:462-468
22. Jonas JB, Kreissig I, Sofker A, Degenring RF (2003) Intravitreal injection of triamcinolone for diffuse diabetic macular edema. Archives of ophthalmology 121:57-61
23. Jonas JB, Degenring RF, Kreissig I, Akkoyun I, Kamppeter BA (2005) Intraocular pressure elevation after intravitreal triamcinolone acetonide injection. Ophthalmology 112:593-598
24. Jonas JB, Degenring RF, Kreissig I, Friedemann T, Akkoyun I (2005) Exudative age-related macular degeneration treated by intravitreal triamcinolone acetonide. A prospective comparative nonrandomized study. Eye (Lond) 19:163-170
25. Jonas JB (2006) Intravitreal triamcinolone acetonide: a change in a paradigm. Ophthalmic research 38:218-245
26. Kivilcim M, Peyman GA, El-Dessouky ES, Kazi AA, Cheema R, Hegazy H (2000) Retinal toxicity of triamcinolone acetonide in silicone-filled eyes. Ophthalmic surgery and lasers 31:474-478
27. Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, Vopat K, Lambert W, Sheedlo HJ, Pang IH, Shade D, Wordinger RJ, Yorio T, Clark AF, Agarwal N (2001) Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. Brain research Molecular brain research 86:1-12
28. Machemer R, Sugita G, Tano Y (1979) Treatment of intraocular proliferations with intravitreal steroids. Transactions of the American Ophthalmological Society 77:171-180
29. Martidis A, Duker JS, Greenberg PB, Rogers AH, Puliafito CA, Reichel E, Baumal C (2002) Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema. Ophthalmology 109:920-927
30. Massin P, Audren F, Haouchine B, Erginay A, Bergmann JF, Benosman R, Caulin C, Gaudric A (2004) Intravitreal triamcinolone acetonide for

diabetic diffuse macular edema: preliminary results of a prospective controlled trial. Ophthalmology 111:218-224; discussion 224-215
31. McCoy BJ, Diegelmann RF, Cohen IK (1980) In vitro inhibition of cell growth, collagen synthesis, and prolyl hydroxylase activity by triamcinolone acetonide. Proc Soc Exp Biol Med 163:216-222
32. McCuen BW, 2nd, Bessler M, Tano Y, Chandler D, Machemer R (1981) The lack of toxicity of intravitreally administered triamcinolone acetonide. American journal of ophthalmology 91:785-788
33. Moshfeghi AA, Nugent AK, Nomoto H, Sanislo SR, Kitchens JW, Moshfeghi DM (2009) Triamcinolone acetonide preparations: impact of crystal size on in vitro behavior. Retina 29:689-698
34. Narayanan R, Mungcal JK, Kenney MC, Seigel GM, Kuppermann BD (2006) Toxicity of triamcinolone acetonide on retinal neurosensory and pigment epithelial cells. Investigative ophthalmology & visual science 47:722-728
35. Nishimura A, Kobayashi A, Segawa Y, Sakurai M, Shirao E, Shirao Y, Sugiyama K (2003) Isolating triamcinolone acetonide particles for intravitreal use with a porous membrane filter. Retina 23:777-779
36. Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y (1999) The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. Investigative ophthalmology & visual science 40:1891-1898
37. Penfold PL, Wen L, Madigan MC, Gillies MC, King NJ, Provis JM (2000) Triamcinolone acetonide modulates permeability and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression of the ECV304 cell line: implications for macular degeneration. Clinical and experimental immunology 121:458-465
38. Raizman M (1996) Corticosteroid therapy of eye disease. Fifty years later. Archives of ophthalmology 114:1000-1001
39. Shaikh S, Ho S, Engelmann LA, Klemann SW (2006) Cell viability effects of triamcinolone acetonide and preservative vehicle formulations. The British journal of ophthalmology 90:233-236
40. shop-apotheke.com (2011) Volon-A 40, Ampullen, 5x1ml.
41. Spandau UH, Sauder G, Schubert U, Hammes HP, Jonas JB (2005) Effect of triamcinolone acetonide on proliferation of retinal endothelial cells in vitro and in vivo. The British journal of ophthalmology 89:745-747
42. Spitzer MS, Ziemssen F, Yoruk E, Bartz-Schmidt KU, Schultheiss M, Szurman P (2011) [Preservative-free triamcinolone versus purified triamcinolone preparations]. Klinische Monatsblatter fur Augenheilkunde 228:626-630
43. Sutter FK, Gillies MC (2003) Pseudo-endophthalmitis after intravitreal injection of triamcinolone. The British journal of ophthalmology 87:972-974
44. Szurman P, Kaczmarek R, Spitzer MS, Jaissle GB, Decker P, Grisanti S, Henke-Fahle S, Aisenbrey S, Bartz-Schmidt KU (2006) Differential toxic effect of dissolved triamcinolone and its crystalline deposits on cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) cells. Experimental eye research 83:584-592

45. Szurman P, Sierra A, Kaczmarek R, Jaissle GB, Wallenfels-Thilo B, Grisanti S, Luke M, Bartz-Schmidt KU, Spitzer MS (2007) Different biocompatibility of crystalline triamcinolone deposits on retinal cells in vitro and in vivo. Experimental eye research 85:44-53
46. Tano Y, Chandler D, Machemer R (1980) Treatment of intraocular proliferation with intravitreal injection of triamcinolone acetonide. American journal of ophthalmology 90:810-816
47. Wang YS, Friedrichs U, Eichler W, Hoffmann S, Wiedemann P (2002) Inhibitory effects of triamcinolone acetonide on bFGF-induced migration and tube formation in choroidal microvascular endothelial cells. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie 240:42-48
48. Weindler J, Weindler M, Ruprecht KW (2004) [Local anesthesia in ophthalmic surgery]. Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft 101:847-864; quiz 865
49. www.accessdata.fda.gov (2012) Approval package for Kenalog 40 /14-901 / S-034.
50. www.acessdata.fda.gov (2012) Clinical pharmacology and biopharmaceutics review.
51. www.biocompare.com (2012)
52. www.bphys.unilinz.ac.at (2010) Skriptum ZK.
53. www.drugsdepot.com (2012) Triesence 40mg/ml single dose by Alcon.
54. www.fda.gov (2012) Clinical Review Application Type NDA 22-048 / 22-223 Triesence.
55. www.fda.gov (2012) Statistical Review and Evaluation - Triesence
56. www.lifetechnologies.com (2012)
57. www.universaldrugstore.com/ Kenalog 40 40mg/ml.
58. www.wikipedia.de (2012) Vitrektomie.
59. Yeung CK, Chan KP, Chiang SW, Pang CP, Lam DS (2003) The toxic and stress responses of cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) and human glial cells (SVG) in the presence of triamcinolone. Investigative ophthalmology & visual science 44:5293-5300

Danksagung

Zu allererst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Spitzer für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und für seine Unterstützung während der Promotionsphase.

Ganz besonders dankbar bin ich für seine überaus herzliche und umfassende Betreuung und Beratung und für seine Geduld.

Außerdem gebührt ein großer Dank allen Mitarbeitern des Breuningerbaus der Augenklinik für ihre stets kompetente und freundliche Hilfe während der gesamten Zeit, in der ich dort meine Versuchsreihen durchgeführt habe. Zudem möchte dem Team des Breuningerbaus für die Überlassung sämtlicher Gerätschaften und Materialien danken, die ich für meine Experimente benötigt habe.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für ihre Zuneigung und ihre grenzenlose Unterstützung.

Lebenslauf

Name:	Kathrin Ellen Rinker
Geburtsdatum:	22. Juni 1981
Geburtsort:	VS-Schwenningen
1987 – 1991	Grundschule Oberndorf-Lindenhof
1991 – 1997	Realschule Oberndorf
1997 – 1999	Sozialpädagogische Hauswirtschaftsschule Oberndorf
1999 – 2002	Gewerbliche und hauswirtschaftliche Schule Horb
	Ausbildung zur Zahnarzthelferin
2002 – 2005	Albert-Schweitzer-Schule Villingen
	Ernährungswissenschaftliches Gymnasium
1997	Realschulabschluss
1999	Mittlere Reife
1999 – 2002	Ausbildung zur Zahnarzthelferin
	Praxis Dr. Peter Jung
	72275 Alpirsbach
2005	Abitur
WS 05/06 – Dezember 2011	Studium der Zahnmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
21.03.2007	Zahnärztliche Vorprüfung
01.12.2011	Staatsexamen Zahnmedizin
09.12.2011	Approbation als Zahnärztin

Seit 16.04.2012	Vorbereitungsassistentin bei Dr. Jürgen Peter Königsstr. 35 78628 Rottweil