Die Wirkung von Dorzolamid auf die retinale Struktur und Funktion bei einem Mausmodell der Juvenilen X-chromosomalen Retinoschisis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Zhour, Ahmad

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Zrenner

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Spitzer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis v

Abbildungsverzeichnis vii

1. Einleitung 1

1.1 Das Krankheitsbild der X-chromosomalen Retinoschisis (XLRS) 1

1.2 Ein Versuchstiermodell zur XLRS – die *Rs1h*$^{-/y}$-Maus 3

1.3 Therapieversuch mit Dorzolamid 5

1.4 Ziele dieser Arbeit 7

2. Material und Methoden 8

2.1 Versuchstiere 8

2.2 Versuchsaufbau und Untersuchungsprotokolle 9

2.3 Applikation und Pharmakodynamik des Dorzolamids 10

2.4 *In vivo* Strukturanalyse der Retina 12

2.4.1 Benötigtes Material 12

Optische Kohärenztomographie 12

2.4.2 Anpassung des Spectralis® HRA+OCT 14

2.4.3 Vorbereitung des Tiermodells 15

2.4.4 Software- und Geräteeinstellung 16

2.4.5 Bildaufnahme-Einstellungen und Protokoll 17

2.4.6 Bild- und Datenanalyse 17

2.5 In vivo Funktionsanalyse der Retina 19

2.5.1 Elektroretinographische Untersuchung 19

2.5.2 Analyse und Interpretation der ERG-Daten 20

2.6 Histologische Aufarbeitung 20

2.6.1 Histologie 20

2.6.2 Immunohistochemie 21
3. Ergebnisse 23
3.1 Scanning-Laser-Ophthalmoskopie – qualitative Analyse 23
3.1.1 Fundusveränderungen bei Aufnahmen mit Infrarotlaser und rotfreiem Laser 23
3.1.2 Fundusveränderungen in der Autofluoreszenz Aufnahme 25
3.1.3 Entwicklung der Hyperfluoreszenz über die Zeit 25
3.1.4 Verteilung der Hyperfluoreszenz in der Retina 26
3.1.5 Fluoreszenzangiographie 27
3.2 Optische Kohärenztomographie 27
3.2.1 Optische Kohärenztomographie an der gesunden Netzhaut von Mensch und Maus 27
3.2.2 Strukturelle Veränderungen der Netzhaut bei der *Rs1h*$^{-/y}$-Maus und beim Menschen mit XLRS 29
3.2.3 Direkter Vergleich der OCT-Bilder von behandelter und unbehandelter Netzhaut 29
3.2.4 Quantitative OCT-Analyse – Betrachtung der Schisis 30
3.2.5 Quantitative OCT-Analyse – Dicke der Netzhaut 32
3.2.6 Gesamtdicke der Netzhaut 32
3.2.7 Dicke der äußeren Netzhaut 33
3.2.8 Dicke der inneren Netzhaut 34
3.2.9 Differenz aus Dicke der Netzhaut von rechtem und linkem Auge 35
3.2.10 Dicke der inneren Netzhaut 36
3.2.11 Dicke der äußeren Netzhaut 37
3.2.12 Krankheitsverlauf: Dicke der äußeren Netzhaut im Verlauf 38
3.2.13 Korrelation von hyperfluoreszenten Bereichen der Netzhaut mit Veränderungen in den OCT-Schnittbildern 39

3.3 Histologische Untersuchungen 42
3.3.1 Histochemische Untersuchung 42
3.3.2 Immunohistochemiche Untersuchung 45
3.4 ERG-Analyse – Funktionelle Veränderungen der Netzhaut bei der *Rs1h*$^{-/y}$-Maus 48
3.5 Skotopische Untersuchung 49
3.5.1 a- und b-Wellen-Amplituden 51
3.5.2 a- und b-Wellen-Latenzzeit 53
3.6 Photopische Untersuchung 55
3.6.1 a- und b-Wellen-Amplituden 55
3.6.2 a- und b-Wellen-Latenzzeit 56
4. Diskussion 58
4.1 Synopsis und klinische Relevanz 58
4.2 Abwägung mit aktueller Literatur 59
4.3 Methodenkritik 61
4.4 Diskussion der Ergebnisse 64
4.5 Neue Erkenntnisse und Ausblick auf weitere Studien 66
5. Zusammenfassung 69
6. Literaturverzeichnis 70
7. Veröffentlichung 75
8. Erklärung zum Eigenanteil 76
9. Danksagung 77
10. Lebenslauf 78

Abkürzungsverzeichnis

AF	=	Autofluoreszenz
ARVO	=	Association for Research in Vision and Ophthalmology
CAI	=	Carboanhydrasehemmer
cds/m²	=	Candelasekunden pro Quadratmeter
CME	=	Zystoides Makulaödem
cSLO	=	konfokale Scanning Laser Ophthalmoskopie
DAPI	=	4′,6-Diamidin-2-Phenylindol
ERG	=	Elektroretinographie
ETDRS	=	Early Treatment in Retinopathy Study
FA	=	Fundus Autofluoreszenz
FLA	=	Fluoreszenzangiographie
GCL	=	Ganglion Cell Layer
Hz	=	Hertz (Maßeinheit für die Frequenz, auch 1/s)
ILM	=	Innere limitierende Membran (der Netzhaut)
INL	=	Inner Nuclear Layer (Innere Körnerschicht)
IPL	=	Inner Plexiform Layer (Innere plexiforme Schicht)
IR	=	Infrarotlaser Reflexion
IRT	=	Inner Retinal Thickness (Dicke der inneren Netzhaut)
IS	=	Inner Segment (Innensegmente der Photorezeptorzellen)
kΩ	=	1000 Ohm (Maßeinheit für den elektrischen Widerstand)
log	=	Logarhytmus von x zur Basis 10
MZ	=	Messzeitpunkt
OLM	=	Outer Limiting Membrane (Äußere Grenzmembran)
ONL	=	Outer Nuclear Layer (Äußere Körnerschicht)
OPL	=	Outer Plexiform Layer (Äußere plexiforme Schicht)
ORT	=	Outer Retinal Thickness (Dicke der äußeren Netzhaut)
OS	=	Outer Segment (Außensegmente der Photorezeptorzellen)
PBS	=	Phosphatgepufferte Salzlösung
RF	=	Rotfrei (Laser)
RPE	=	Retinal Pigment Epithelium (Retinales Pigmentepithel)

Rs1	=	Bez. des Gens für Retinoschisin im Menschen
Rs1h	=	Bez. des Gens für Retinoschisin in der Maus
Rs1h$^{-/y}$	=	Bez. für männliche Maus mit knockout des Rs1h-Gens
SD-OCT	=	Spektral-Domänen Optische Kohärenztomographie
TP	=	Timepoint
XLRS	=	Juvenile X-chromosomale Retinoschisis
XLRSh1	=	Juvenile X-chromosomale Retinoschisis im Mausmodell

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Behandlung und Untersuchungen im zeitlichen Verlauf 9
Abbildung 2: Praktikabilität der einseitigen Applikation von Augentropfen am Tiermodell 11
Abbildung 3: Gerätesetup bei der Untersuchung des Tiermodells 15
Abbildung 4: Vergleich der cSLO-Fundusaufnahmen behandelter versus unbehandelter Augen 23
Abbildung 5: Infrarotlaser cSLO; *Rsh1*$^{-/y}$ vs. Wildtyp 24
Abbildung 6: cSLO mit rotfreiem Laser; *Rsh1*$^{-/y}$ vs. Wildtyp 24
Abbildung 7: Fundusaufnahmen im Autofluoreszenzmodus; *Rsh1*$^{-/y}$ vs. Wildtyp 25
Abbildung 8: Hyperfluoreszenz in Abhängigkeit vom Krankheitsfortschritt 26
Abbildung 9: Verteilung der Hyperfluoreszenz 26
Abbildung 10: Fluoreszenzangiographie in *Rs1h*$^{-/y}$-Maus und Wildtyp 27
Abbildung 11: OCT-Schnittbilder von Maus und Mensch 28
Abbildung 12: OCT-Schnittbilder im Vergleich - XLRS bei Mensch und Maus 29
Abbildung 13: OCT-Schnittbilder von der *Rs1h*$^{-/y}$-Maus – Linkes Auge versus rechtes Auge 30
Abbildung 14: Schweregrad der Schisis in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer 31
Abbildung 15: Verteilung der Schisis auf die vier Netzhautquadranten 31
Abbildung 16: Dicke der Netzhaut – behandelte und unbehandelte Augen im Vergleich 33
Abbildung 17: Dicke der äußeren Netzhaut 34
Abbildung 18: Dicke der inneren Netzhaut 35
Abbildung 19: Durchschnittliche Differenz aus Dicke der inneren Netzhaut von rechtem und linkem Auge 36
Abbildung 20: Durchschnittliche Differenz aus Dicke der äußeren Netzhaut von rechtem und linkem Auge 37
Abbildung 21: Dicke der äußeren Netzhaut im Verlauf 39
Abbildung 22: Korrelation von hyperfluoreszenten Bereichen der Netzhaut mit Veränderungen in den OCT-Schnittbildern 41
Abbildung 23: Histologischer Schnitt durch die Netzhaut einer Wildtyp-Maus 43

Abbildung 24: Histologische Schnittbilder durch die Netzhäute von *Rs1h*$^{-/y}$-Mäusen .. 44
Abbildung 25: Histologischer Schnitt durch die Netzhaut einer *Rs1h*$^{-/y}$-Maus..... 45
Abbildung 26: Immunohistologisches Labeling von Wholemounts und Kryoschnitten 47
Abbildung 27: Elektroretinographie von *Rs1h*$^{-/y}$- vs. Wildtypmaus..... 49
Abbildung 28: a- und b-Wellen-Amplituden skotopischer Untersuchungen 52
Abbildung 29: A- und b-Wellen-Latenzzeit skotopischer Untersuchungen 54
Abbildung 30: a- und b-Wellen-Amplituden photopischer Untersuchungen..... 56
Abbildung 31: a- und b-Wellen-Amplituden photopischer Untersuchungen..... 57

1. Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der X-chromosomalen Retinoschisis (XLRS)

Die Juvenile x-chromosomale Retinoschisis (XLRS) ist eine erblich bedingte, degenerative Netzhauterkrankung und wird zu der Untergruppe der vitreoretinalen Dystrophien gezählt. Angeborene degenerative Netzhauterkrankungen präsentieren sich aufgrund der Vielzahl möglicher Gendefekte sehr vielfältig. Manche Formen beispielsweise beschränken sich weitestgehend auf den Bereich der Makula, andere betreffen nur einen bestimmten Photorezeptortyp. Manche Formen, wie die Retinitis Pigmentosa, die häufigste aller hereditären Netzhautdystrophien, haben ihre Ursache primär in der Degeneration von Photorezeptorzellen und dem Pigmentepithel. Häufig führen degenerative Netzhauterkrankungen über unterschiedliche Mechanismen nach und nach zum Untergang von Photorezeptorzellen und je nach Form bei den Betroffenen zum starken oder vollständigen Verlust des Sehvermögens. Je nach Gendefekt ist dieser Sehverlust unterschiedlich früh ausgeprägt, beispielsweise bei der Leber'schen congenitalen Amaurose (LCA) wird er schon bei Geburt manifest, bei der Juvenilen X-chromosomalen Retinoschisis in der frühen Kindheit und beim Morbus Stargardt in der frühen Jugend. Der Erbgang kann autosomal oder x-chromosomal, rezessiv oder dominant sein. Viele hereditäre Netzhauterkrankungen manifestieren sich von Patient zu Patient, trotz gemeinsamer Ursache im gleichen Gen, sehr unterschiedlich in Schwere des Verlaufs und Geschwindigkeit der Progression. Wahrscheinlich ist dies durch noch nicht genau identifizierte genetische und/oder äußere Faktoren bedingt. Zum heutigen Zeitpunkt existiert noch keine zugelassene kausale Therapie für erblich bedingte Netzhauterkrankungen.
Dies gilt auch für die Juvenile x-chromosomale Retinoschisis (XLRS). Sie ist bei männlichen Patienten im Kindes- und Jugendalter die häufigste Ursache für eine progressive Degeneration der Makula. Die Prävalenz wird auf etwa 1:5000 bis etwa 1:20000 geschätzt.(1) Nach der Entdeckung dieser Krankheit 1898 durch den deutschen Ophthalmologen Josef Haas (2) wurde 1913 erstmals von Pagenstecher die Pathogenese durch rezessiv x-chromosomale Vererbung beschrieben. (3) So sind fast ausschließlich

Jungen und Männer betroffen. Der Krankheitsverlauf kann bei der XLRS sehr unterschiedlich sein, in den meisten Fällen jedoch wird sie noch während der ersten Lebensdekade manifest. Die Patienten fallen oft während ihrer ersten Schuljahre auf, da die reduzierte Sehschärfe das Erkennen von Schriftzeichen aus der Ferne zunehmend erschwert. Die Retinoschisis ist charakterisiert durch einen milden bis schweren Verlust der zentralen Sehschärfe und einen langsam progredienten Verlauf, wobei ein Restsehvermögen bis ins hohe Erwachsenenalter bestehen bleiben kann. Jedoch führen typische Komplikationen, wie die Glaskörperblutung und die Netzhautablösung oft schon vorher zu plötzlichem und nicht selten komplettem Sehverlust. (4) Die Pathogenese begründet sich in einem Defekt des RS1-Gens für das Protein Retinoschisin, welches in den Photorezeptorzellen gebildet wird. (5) Es ist für den Zusammenhalt der Netzhautschichten essentiell und wird je nach Art der Mutation im RS1-Gen (6) entweder vermindert oder fehlerhaft sezerniert, oder es ist trotz regelgerechter Sekretion, aber fehlerhafter Struktur nicht hinreichend funktionsfähig. (7) Morphologisch zeigt sich ein allmählich fortschreitender Untergang von Photorezeptorzellen, begleitet von einer Aufspaltung der inneren Netzhautschichten insbesondere im Bereich der Makula. Die resultierende Aufspaltung der Netzhaut kann bei der Funduskopie als charakteristisches „Radspeichenmuster“ imponieren. Deutlich werden die zystenähnlichen Zwischenräume und das Ausmaß der Photorezeptordegeneration insbesondere in hochauflösenden Bildern der Spektral Domänen Optischen Kohärenztomographie (SD-OCT). (8) (Abb. 12) In der elektroretinographischen Untersuchung (ERG) zeigt sich mit dem Fortschritt der Erkrankung eine zunehmende Verminderung der b-Wellen-Amplitude. (9) Der Verlauf der XLRS variiert stark, selbst bei Patienten innerhalb der gleichen Familie. (9, 10) Bislang gibt es keine Therapie für die XLRS, was die Wichtigkeit dieses Therapieversuchs unterstreicht. Aktuelle Versuche aus der Gentherapie an einem entsprechenden Mausmodell (XLRSh1) haben bereits eine Verbesserung der Struktur und Funktion der Mausretina erzielen können. (11, 12) Denn das Retinoschisin ist für den ständigen Erhalt einer gesunden Struktur der Retina notwendig. (1, 13) Das mausspezifische *Rs1h*, das analog dem *RS1* im Menschen, murines Retinoschisin codiert, wurde über einen viralen Vektor in die Netzhaut eingebracht und führte zu einer signifikanten Verbesserung struktureller und funktioneller Parameter, welche auch noch 5 Monate nach Injektion messbar war (11) Gentherapie am menschlichen Auge hat noch keinen Eingang in

den klinischen Alltag gefunden, hat sich allerdings in den letzten Jahren zunehmend zu einem vielversprechenden Ziel der Forschung in der Augenheilkunde entwickelt. Wann die XLRS Gegenstand solcher Versuche wird und ob diese erfolgreich sein werden, ist nach heutigem Wissenstand allerdings nicht sicher abschätzbar.

1.2 Ein Versuchstiermodell zur XLRS – die *Rs1h*$^{-/y}$-Maus

Das Mausmodell, welches hier verwendet wird, wurde 2002 von Weber et al. durch Gen-Knockout von *Rs1h* erzeugt und entwickelt deutlich die phänotypisch pathologischen Eigenschaften der XLRS wie Schisisformation und fortschreitende Degeneration der Photorezeptoren. (13) (Abb. 13) An diesen objektiven Parametern wird in diesem Versuch der Effekt des Dorzolamids evaluiert. Da die XLRS sich interindividuell sehr unterschiedlich entwickelt, ist es bei gleichzeitig geringer Prävalenz nahezu unmöglich, eine statistisch relevante Anzahl an Patienten gleichen Krankheitsstatus über Jahrzehnte hinweg in eine Studie einzubetten und zu untersuchen. Dagegen bietet das Mausmodell ideale Voraussetzungen um eine standardisierte Interventionsstudie durchzuführen, denn die Entwicklung einer XLRSh1 ist mit den hier verwendeten Methoden bereits 2 Wochen nach der Geburt nachweisbar – vermutlich in Zusammenhang mit dem relativen Alter (1 Lebensjahr der Maus entspricht ca. 30 Lebensjahren im Menschen) (14). Gleichzeitig kommt es auch zu einem schnelleren Krankheitsprogress. Im Vergleich zu einer klinischen Langzeitstudie am Menschen bedarf es somit an der Maus lediglich einer 6-monatigen Untersuchungsdauer um eine Langzeitwirkung zu evaluieren. Um dem Einfluss der auch bei den Versuchstieren auftretenden Variabilität der interindividuellen Progression der Erkrankung entgegenzuwirken, wurde eine intraindividuelle Analyse gewählt. Dieses Studiendesign baut auf der Erkenntnis auf, dass bei hoher interindividueller Variabilität der Befund im gegebenen Individuum weitestgehend symmetrisch auftritt. Jedes Tier wurde nur am rechten Auge therapiert, welches dann direkt mit dem entsprechenden unbehandelten linken Auge verglichen wurde. Um eine statistische Signifikanz der Ergebnisse zu erreichen, wurde zunächst eine biometrische Analyse durchgeführt und eine ausreichend hohe Anzahl an Versuchstieren ermittelt. Für die Beurteilung der Struktur wurde ein hochauflösendes Spectralis HRA+OCT

(Heidelberg Engineering) Gerät verwendet. Dieses Gerät bietet unter anderem die Option zur konfokalen Scanning Laser Ophthalmoskopie (cSLO). Dies ist eine ophthalmologische Bildgebungstechnologie, welche anstelle einer Ganzfeldausleuchtung mit weißem Blitzlicht, wie es bei der konventionellen Fundusfotografie verwendet wird, einen Laser verwendet um den Augenhintergrund zu beleuchten. Zusätzlich verhindert eine Lochblende den Rückfall von Streulicht auf den Sensor außerhalb der Fokusebene und ermöglicht dadurch eine hohe Bildqualität in einer definierten Ebene.

Außerdem besteht die Option einer zur cSLO simultanen Spektral-Domänen Optischen Kohärenztomographie (SD-OCT). Während der SD-OCT fällt gebündeltes Licht auf die Netzhaut. Dieses wird, analog zum Schall während der Sonographie, an den verschiedenen Schichten der Netzhaut reflektiert. Über die Anzahl nebeneinander durchgeführter axialer Scans (A-Scans) pro mm wird die horizontale Auflösung zweidimensionaler Schnittbilder definiert. Durch die gleichzeitige Verwendung unterschiedlicher Wellenlängen aus dem Lichtspektrum wurde es möglich mittels SD-OCT-Technik bis zu 40.000 A-Scans pro Sekunde zu erfassen. So konnten innerhalb von Sekunden bis zu 121 paralleler Schnittbilder aufgenommen und zu einem dreidimensionalen Netzhautausschnitt zusammengefügt werden.

Das Spectralis HRA+OCT (Heidelberg Engineering) wurde den speziellen Bedürfnissen bei der Untersuchung des Mausauges angepasst (15) (Abb. 3) und lässt eine detaillierte Beurteilung der Netzhautstruktur am lebenden Versuchstier zu.

Die hier beschriebene Methode bietet gerade bei Experimenten zum Krankheitsbild der XLRS einige wesentliche Vorteile gegenüber der herkömmlichen histologischen Untersuchung. Zum einen sinkt die benötigte Anzahl an Versuchstieren beträchtlich, da nicht zu jedem Messzeitpunkt eine ganze Kohorte für die Histologie geopfert werden muss. Zum anderen ist es allein durch die Verwendung der optischen Kohärenztomographie möglich geworden, die Struktur der Netzhaut in ein und demselben Tier im zeitlichen Verlauf mehrmals zu begutachten. Dies ist gerade aufgrund der bei der Retinoschisis auftretenden Variabilität des Krankheitsstadiums von Tier zu Tier und somit der fehlenden interindividuellen Vergleichbarkeit notwendig. Eine Querschnittsstudie hätte hier wesentliche Nachteile und würde aufgrund der höheren Variabilität eine deutlich höhere Tierversuchszahl erfordern, um mit gleicher Sicherheit eine statistische Signifikanz zu erreichen.

Des Weiteren ist die sichere Beurteilung der Schisis im histologischen Schnitt nur unzureichend möglich: Die Hohlräume, welche sich in den einzelnen Netzhautschichten darstellen sind wahrscheinlich angefüllt mit extrazellulärer Flüssigkeit im Nanoliterbereich. Es handelt sich vermutlich um flüssigkeitsgefüllte Pseudozysten, also – im Gegensatz zur Zyste – um Hohlräume ohne anatomische Grenzstruktur. Daher ist zu erwarten, dass die Flüssigkeit im Rahmen der Präparation der Gewebeschnitte zur Histologie, insbesondere während der Behandlung mit z.B. Sucrose oder Ethanol zur Dehydrierung, beeinträchtigt wird. Im SD-OCT-Schnittbild hingegen werden Momentaufnahmen am Lebenden erzeugt, welche auch durch die Wahl vieler paralleler Schnitte in Form eines sogenannten Volumenscans die dreidimensionale Darstellung einer gesamten Netzhautpartie ermöglichen. (16)

Für die Evaluation der Wirkung von Dorzolamid auf die Funktion der Netzhaut wurden elektroretinographische Untersuchungen (ERG) durchgeführt. Da es sich hierbei um eine sehr aufwendige, aber auch gut erprobte und hochsensitive Methode handelt, wurden lediglich 2 Messzeitpunkte mit zuerst 10 und dann 5 Versuchstieren festgesetzt. Das Ziel sollte sein, die Ergebnisse aus der Strukturanalyse zu untermauern. Denn es wird angenommen, dass eine Erhaltung der Struktur und insbesondere der Photorezeptorschicht eine Erhaltung der Funktion bedeutet und umgekehrt. Aufgrund logistischer Probleme bei der Anpassung der ERG-Methode an die speziellen Herausforderungen bei der Maus konnten nicht alle Messungen wie geplant durchgeführt werden. Grund dafür ist die hohe Störungsanfälligkeit des ERG bei nicht optimalen Messbedingungen (s. Methodenteil und Methodenkritik in der Diskussion). Dennoch wurde eine statistische Analyse durchgeführt, deren vorsichtige Interpretation die speziellen Messbedingungen und ERG-spezifischen Störfaktoren berücksichtigt.

1.3 Therapieversuch mit Dorzolamid

Dorzolamid ist ein Medikament aus der Gruppe der Carboanhydrasehemmer (CAI). In Form von Augentropfen stellt es im klinischen Alltag schon lange ein wichtiges und relativ nebenwirkungsarmes Therapeutikum bei der Behandlung von erhöhtem Augeninnendruck dar. Die Verringerung des Augeninnendrucks wird insbesondere durch

Hemmung des membranständigen Isoenzyms Carboanhydrase IV erreicht, welches im Ziliarepithel die Bildung des Kammerwassers katalysiert. Die Wirkung des Dorzolamids beschränkt sich jedoch nicht auf die Funktion des Ziliarepithels, sondern erstreckt sich auch auf den Flüssigkeitshaushalt der Netzhaut. Geht man davon aus, dass die Pathologie der Retinoschisis unter anderem in der Entstehung von flüssigkeitsgefüllten Pseudozysten besteht, so zwingt sich die Überlegung auf, dass eine Behandlung dieser Pseudozysten zu einer Besserung zumindest der Symptomatik führen könnte.

Das Vorhandensein von Pseudozysten bei der Retinoschisis, ähnlich wie beim klinischen Bild des zystoiden Makulaödems (CME) bei beispielsweise Retinitis-Pigmentosa-Patienten, wurde erstmals während histologischer Untersuchungen humaner postmortem enukleierter Augen von Retinoschisis-Patienten vermutet.

Mit Einführung der OCT-Schnittbildtechnologie wurde diese Annahme unterstrichen und die Pseudozysten konnten schließlich am Lebenden in ihrer natürlichen Ausprägung – mit verbesserter Technologie später dann auch sehr detailliert – aufgezeigt werden. (17, 18)

Verschiedene Studien haben beim CME bereits einen therapeutischen Effekt von Dorzolamid Augentropfen zeigen können. (19) Die genaue Pathogenese des CME bei degenerativen Netzhauterkrankungen ist zwar bisher nicht ins Detail ergründet, aber es gibt eine plausible Hypothese: Trotz unterschiedlicher pathophysiologischer Prozesse, die den verschiedenen degenerativen Netzhauterkrankungen zugrunde liegen, wird angenommen, dass es einen gemeinsamen Mechanismus gibt, welcher zur Entstehung der zystoiden Veränderungen führt. (20)

Ein gemeinsamer Pathomechanismus findet sich unter anderem in der gestörten Polarität der Zellen des Retinalen Pigmentepithels (RPE). RPE-Zellen sind ein stark polar ausgerichtetes einreihiges Epithel mit einer apikalen und basalen Seite. Diese Polarität ermöglicht es dem RPE, gezielt die Homöostase von Ionenkonzentrationen und des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens auf der Seite der Netzhaut (apikal) und der Aderhaut (basal) zu steuern. Es wird davon ausgegangen, dass die gestörte Polarität die gerichtete Pumpfunktion der RPE-Zellen (von apikal nach basal) beeinträchtigt und es somit durch verminderten Abtransport von Ionen aus apikal zur Flüssigkeitsretention im Bereich der Neuroretina kommt. Diese verminderte Transportleistung des RPE begünstigt die Ent-

stehung flüssigkeitsgefüllter Räume in der Netzhaut, welche das Bild des CME im Wesentlichen prägen. (21)

Es wird in diesem Zusammenhang angenommen, dass Carboanhydrasehemmer das Ionengleichgewicht wieder herstellen können und demzufolge über die Regeneration der RPE-Zellfunktion zur Wiederherstellung des Gleichgewichts im Flüssigkeitshaushalt der Netzhaut führen. (22)

Unabhängig von ihrem Einfluss auf die Polarität des RPE bewirken Carboanhydrasehemmer vermutlich eine zusätzliche Verstärkung des Flüssigkeitsabtransport aus der Netzhaut in Richtung Aderhaut; die Hemmung der Carboanhydrase führt zu reduzierter intrazellulärer Hydrogencarbonatkonzentration im RPE, was wiederum den Austausch von Hydrogencarbonat mit extrazellulärem Chlorid vermindert. Die durch Anhäufung des Chlorids basal entstehende osmotische Kraft verstärkt den Flüssigkeitsabtransport über die Aderhautgefäße dem Ionengradienten folgend, also von apikal des RPE nach basal. (21)

Wird nun von dem Vorhandensein gleicher durch Dorzolamid beeinflussbarer Pathomechanismen bei der Juvenilen x-chromosomalen Retinoschisis wie auch beim CME im Rahmen der RP ausgegangen, liegt die logische Schlussfolgerung nahe, dass der gleiche pharmakologische Effekt bei beiden Erkrankungen erzielt werden kann.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die positive Wirkung von Dorzolamid auf die Struktur und Funktion der Netzhaut von XLRS-Patienten wird in verschiedenen klinischen Fallbeobachtungen beschrieben. (23-25) Diese basieren allerdings wie bei vielen Studien an seltenen Erkrankungen auf kleine, wenig signifikante Ergebnisse liefernden Fallzahlen. Bei der XLRS kommen außerdem die bereits oben geschilderten Herausforderungen hinzu, welche sich aus einem nur langsam über Jahrzehnte erstreckenden Krankheitsfortschritt und einer hohen Variabilität des Schweregrads von Patient zu Patient ergeben. Deshalb stellt die *Rs1h*$^{-/y}$-Maus ein ideales Versuchsmodell dar, um objektive Ergebnisse in einem standardisierten Versuchsaufbau und mit einer vorab biometrisch ermittelten Fallzahl für hohe statistische Signifikanz zu erzeugen. Mithilfe des SD-OCTs ist es möglich, die Struktur der

murinen Netzhaut nicht-invasiv und somit mehrmals im Verlauf zu untersuchen. Damit ist es primäres Ziel dieser Studie, die kurz-, mittel- und langfristige Wirkung von Dorzolamid bei der Behandlung der Retinoschisis am Mausmodell der XLRS zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Verwendung von Versuchstieren in diesem Experiment erfolgte gemäß der Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, welche sich an der EU-Versuchstierrichtlinie 2010/63/EU vom 22.September 2010 des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere orientiert. Für diesen Versuch wurden *Rs1h*$^{-/y}$-Mäuse als Versuchsmodelle für die Juvenile X-chromosomale Retinoschisis verwendet. Diese wurden 2002 durch knockout von *RS1h*, dem murinen Äquivalent zum humanen RS1, von Weber et al. im Labor generiert. (13) Anhand histologischer Untersuchungen wurden die für die XLRS typische Schisis, die Photorezeptordegeneration und die Desorganisation der ansonsten streng geregelten Anordnung der Netzhautschichten nachgewiesen. Im ERG zeigte sich ergänzend die für die XLRS typische starke Reduktion der b-Wellen-Amplitude. Da Mäuse nicht wie Menschen über eine Makula verfügen, besteht ein wesentlicher Unterschied darin, dass sich die Schisis in der Netzhaut der Mäuse ubiquitär um den zentral gelegenen N. Opticus herum verteilt, während sie bei Menschen überwiegend im Bereich der Makula auftritt (s. Abb. 12). Hemizygote männliche Tiere wurden mit homozygoten weiblichen Tieren gepaart und lediglich die männlichen Nachkommen ab einem Alter von genau 14 Tagen verwendet (n=27). Die Versuchstiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen bei 25°C konstanter Raumtemperatur und 60% Luftfeuchtigkeit im Tierstall der Universitätsklinik Tübingen gehalten. Ein Tag/Nacht-Rhythmus wurde künstlich mit 200lux für 12 Stunden pro Tag erzeugt. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Es wurden alle Regularien

des „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research" eingehalten.

2.2 Versuchsaufbau und Untersuchungsprotokolle

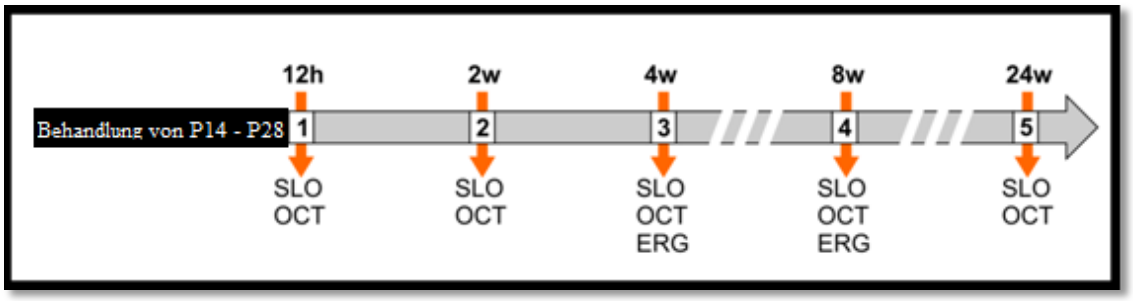


Abbildung 1: Behandlung und Untersuchungen im zeitlichen Verlauf

Die Versuchstiere wurden von P14 bis P28 (d.h. im Alter von 14 bis 28 Tagen) einseitig mit Dorzolamid Augentropfen behandelt. Nach Ende der Therapie wurden sie über 6 Monate 5-mal untersucht. cSLO und SD-OCT Untersuchungen wurden jeweils 12 Stunden sowie 2, 4, 8 und 24 Wochen nach Ende der Behandlung durchgeführt, ERG-Untersuchungen jeweils 4 und 8 Wochen danach. Zu jedem Messzeitpunkt wurden anschließend zwei Versuchstiere für die histologische Untersuchung verwendet.

Die Versuchstiere wurden ab einem Alter von 14 Tagen alle 12h mit Dorzolamid Augentropfen behandelt; jeweils am rechten Auge für die Dauer von 14 aufeinander folgenden Tagen. Direkt am Tag nach Ende der Behandlung, also 12 h nach Erhalt der letzten Dosis, wurde mit den Messungen unter Ketamin/Xylazin-Narkose begonnen. Mittels konfokaler Scanning Laser Ophthalmoskopie (cSLO) wurden Fundusaufnahmen beider Augen in verschiedenen Modi gemacht. Je Untersuchung und je Auge eine Infrarotaufnahme für die Fundusübersicht (Laser 820nm), eine Aufnahme mit rotfreiem Laser (488nm) für eine fokussierte Darstellung der Nervenfaserbündel und eine Autofluoreszenzaufnahme (Exzitationslaser 488nm, Emission ≥ 500nm) zur Detektion und Lokalisation hyperfluoreszenten Gewebes. (Für das genaue Vorgehen bei der Bildakquise und die entsprechenden Geräteeinstellungen s. Kap. 2.4) Mittels Spektral-Domänen Optischer Kohärenztomographie (SD-OCT) wurden in vivo Schnittbildaufnahmen von der Netzhaut erstellt. Beide Untersuchungen (cSLO + SD-OCT) wurden im Abstand von 2 Wochen, 4 Wochen, 8 Wochen und 6 Monaten zur ersten Untersuchung wiederholt, um die Entwicklung der Netzhaut über den gesamten Zeitraum verteilt betrachten

zu können. Im Abstand von 4 und 8 Wochen zum ersten Untersuchungszeitpunkt wurden ERG-Untersuchungen durchgeführt, um Ergebnisse aus der Strukturanalyse zu untermauern oder Hinweise auf unerwartete Unterschiede zwischen Struktur und Funktion zu erhalten, die dann die Notwendigkeit weiterer Experimente bedeutet hätten. Ursprünglich war die ERG-Untersuchung zu allen fünf Zeitpunkten geplant. Aus logistischen Gründen musste jedoch im Studienverlauf darauf verzichtet werden. Eine Wiederholung des Versuchs war aus ethischen Gründen und gemäß dem entsprechenden Tierversuchsantrag nicht möglich.

2.3 Applikation und Pharmakodynamik des Dorzolamids

Für die Applikation der Dorzolamid Augentropfen wurde die Maus am Nackenfell gehalten, um den Kopf zu stabilisieren und die Pfoten außer Reichweite der Augen zu fixieren. Ein kleiner Tropfen wurde direkt auf die Kornea gegeben und die Maus für exakt 60 Sekunden im beschriebenen Zustand gehalten um zu vermeiden, dass der Tropfen direkt aus den Augen gewischt oder eventuell sogar oral aufgenommen wird. Bevor die Maus wieder zu ihren Artgenossen in den Käfig zurückgelassen wurde, wurden die Augenränder zusätzlich mit einem Wattestäbchen gereinigt um noch einmal sicher zu gehen, dass sich kein Dorzolamid mehr außerhalb des Auges befindet und durch die Maus selber verteilt werden kann. Dieses Vorgehen wurde durch einen Vorversuch abgesichert. Nach der oben beschriebenen Methode wurden zwei Versuchstiere mit Fluoreszein-Natrium-Lösung (0,8mg/ml) behandelt. Nach ca. 30 Minuten völliger Bewegungsfreiheit im Käfig wurden beide Augen des gleichen Versuchstiers mit dem konfokalen Scanning Laser Ophthalmoskopen (cSLO) untersucht, um die Verteilung des Fluoreszeins zu ermitteln. Während das behandelte Auge deutliche Fluoreszenz als Zeichen vorhandener Restkonzentration des Fluoreszeins in der Tränenflüssigkeit zeigte, wurde keinerlei Fluoreszenz am entsprechend anderen Auge, am Fell oder den Barthaaren gemessen (Abb. 2).

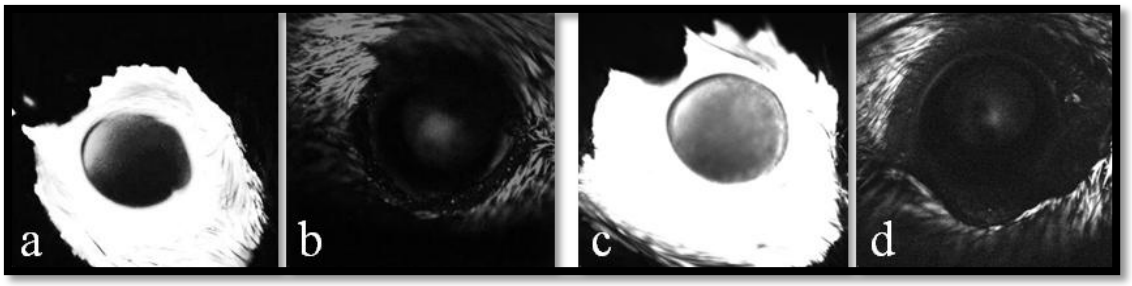


Abbildung 2: Praktikabilität der einseitigen Applikation von Augentropfen am Tiermodell

Die Augen zweier unabhängiger Versuchstiere 30 min nach der Behandlung mit Fluoreszein (a+c). Es zeigte sich ein deutliches Fluoreszenzsignal. Die jeweils kontralateralen Augen ohne Behandlung mit Fluoreszein zeigten auch nach 30 min kein erkennbares Fluoreszenzsignal neben der geringen Autofluoreszenz des Fells (b+d).

Damit wäre eine Kontamination und unbeabsichtigte Mitbehandlung des linken Auges so weit wie möglich ausgeschlossen. Pharmakologische Studien an Ratten und Kaninchen haben gezeigt, dass nach der Applikation von Dorzolamid Hydrochlorid Augentropfen (1%) die Hemmung des relevanten Enzyms Carboanhydrase II für mindestens zehn Stunden anhält, ohne dabei zu einem Enzymüberschuss zu führen. (26) Außerdem wurde bei der vorhergegangenen Phänotypisierung der RS1h$^{-/y}$-Maus festgestellt, dass sich die pathologische Aufsplittung der Netzhaut bereits 14 Tage nach der Geburt der Tiere manifestiert. (27) Auf diesen Daten basierend wurde entschieden, die Versuchstiere von Tag P14 an 14 Tage lang im 12-Stunden-Takt mit Dorzolamid Hydrochlorid Lösung (Trusopt® 20mg/ml) zu therapieren, um die Aktivität der Carboanhydrase im Retinalen Pigmentepithel durchgehend zu blockieren. Eine Prävention der Schisis sollte sich dann direkt im Anschluss an diese Therapie zeigen. Um auch eine ggf. vorhandene langanhaltende Wirkung zu messen, wurden weitere Messzeitpunkte in definierten Abständen über die Dauer von insgesamt 6 Monaten gewählt. Es wurde eine einseitige lokale Therapie durchgeführt, um eine intraindividuelle Evaluation des Therapieeffekts zu ermöglichen. Denn auch bei den Mäusen ist der für die XLRS charakteristische interindividuelle Unterschied beim Krankheitsverlauf nachgewiesen worden, wohingegen an beiden Augen eines Versuchstiers der Krankheitsverlauf in der Regel weitestgehend ähnlich ist. (13, 28) Konkret heißt das, dass der Effekt des Dorzolamids an jedem einzelnen Versuchstier durch den Vergleich von unbehandeltem zu behandeltem Auge (intraindividueller Vergleich) evaluiert werden kann.

2.4 *In vivo* Strukturanalyse der Retina

Für die Strukturanalyse der Netzhaut wurden die konfokale Scanning Laser Ophtalmoskopie (cSLO) und die Spektral-Domänen Optische Kohärenztomographie (SD-OCT) gewählt und an die speziellen Bedingungen zur Anwendung am Mausauge angepasst (Abb. 3). (15) Die Untersuchungsmethoden cSLO und SD-OCT, ursprünglich für den diagnostischen Einsatz am Menschen entwickelt, sind während der letzten Jahre zu einer qualitativ sehr hochwertigen, nicht-invasiven Methode für die in vivo Strukturanalyse der Netzhaut von verschiedensten Versuchstieren geworden. Mithilfe der cSLO können Fundusübersichtsaufnahmen erstellt und durch die Wahl verschiedener Laser zum einen autofluoreszentes Gewebe detektiert werden, zum anderen können Angiographien durchgeführt und die Nervenfaserschicht genauer betrachtet werden. Die SD-OCT ermöglicht die Aufnahme virtueller Schnittbilder der Netzhaut an einer beliebig auswählbaren Stelle auf der Fundusübersichtsaufnahme. Diese hochauflösenden Querschnittsaufnahmen korrelieren gut mit histologischen Schnitten und da sie in vivo erstellt werden, besteht die Möglichkeit zur mehrmaligen Untersuchung ein und desselben Versuchstieres über einen längeren Zeitraum. Außerdem können bestimmte Veränderungen, wie beispielsweise das Netzhautödem, ohne den unkalkulierbaren Einfluss durch die Manipulation bei der Anwendung von Gewebefixationsprotokollen, ermittelt und beurteilt werden. Das hier verwendete Gerät verfügt gleichzeitig sowohl über die Funktion zur cSLO als auch über die Funktion zur SD-OCT. So konnte die gesamte Strukturuntersuchung jeweils in ein und derselben Sitzung durchgeführt werden. Das genaue methodische Vorgehen bei der Anwendung der cSLO und SD-OCT am Mausauge wird im Folgenden detailliert beschrieben.

2.4.1 Benötigtes Material

Optische Kohärenztomographie

Für diesen Versuch wurde das Spectralis® HRA+OCT Gerät (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) verwendet. Es erlaubt den spontanen Wechsel zwischen den

cSLO und SD-OCT Funktionen sowie die simultane Verwendung derselbigen, was die Durchführung der Messungen vereinfacht.

Material zur Anpassung des Geräts an die speziellen Herausforderungen bei der Messung am Mausauge

- Für das verwendete Spectralis® HRA+OCT Modell wurde beim Hersteller eine spezielle Ersatzleiste für die übliche Kinnstütze bestellt. Es ist speziell für die Verwendung des Spectralis® HRA+OCT in der Wissenschaft konzipiert, ist flach und durchgehend waagerecht und bietet ausreichend Angriffsfläche für eine Schraubzwinge oder das Anbringen von Schrauben.
- Ein in alle drei Dimensionen verstellbarer und kippbarer Tisch mit einer rechteckigen Auflagefläche von etwa 5x10 cm, welcher an die Kinnstützenersatzleiste angebracht werden kann
- Eine Kleintierwärmematte, nicht größer als die Auflagefläche des Tisches, damit die Körpertemperatur der Versuchsmäuse während der Untersuchung in Anästhesie aufrechterhalten werden kann
- Eine 78D-Ophthalmoskopierlupe von Volk (Volk Optical Inc., Ohio, USA)
- Eine CAX100 asphärische Sammellinse von Phillips® (IMM Photonics AG, Unterschleissheim, Deutschland) mit einem Brechwert von 100 Dioptrien, einem Durchmesser von 6,28 mm und einem parallel zur Linsenachse abstehenden Rand als Kontaktlinse

Pharmaka

- Für die Anästhesie: Ketamin von Bayer® (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und Xylazin von Bela-Pharm® (Bela-Pharm, Vechta, Deutschland) für die subkutane Injektion
- Für die Weitstellung der Pupillen: Tropicamid 5mg/ml Augentropfen (Mydriaticum Stulln® von Pharma Stulln, Stulln, Deutschland)
- Zum Schutz vor Austrocknung der Hornhaut und um die Brechung des Lasers an den Grenzflächen zwischen Kontaktlinse und Auge zu verhindern: 2-prozentige Hydroxypropylmethyzellulose Lösung (Methocel, OmniVision®, Puchheim, Deutschland)

2.4.2 Anpassung des Spectralis® HRA+OCT

Für die Messung am Mausauge sind einige Veränderungen am Spectralis®-Gerät vorzunehmen (s. Abb. 3):

- Es empfiehlt sich, das Gerät in Richtung des Untersuchers zu drehen, da sich die Versuchsmaus so während der Messung auf der gleichen Seite mit dem Untersucher befindet und dieser gleichzeitig die Software bedienen und den Untersuchungstisch/Kamerakopf justieren kann.
- Die Stirn- und Kinnstütze müssen abmontiert und durch die Spezialleiste für Messungen an Kleintieren ersetzt werden.
- Der in alle Richtungen verstellbare und kippbare Tisch wird nun so an der Ersatzleiste fixiert, dass er sich ungefähr auf Höhe des Objektivs befindet.
- Die 78D-Ophthalmoskopierlinse wird mit einem Klebestreifen direkt zentral vor dem Objektiv befestigt. So kann sie flexibel verwendet oder für die Reinigung jederzeit entfernt werden. Perfekt gereinigte Linsen und eine zentrale Position der Ophthalmoskopierlinse sind essentiell für die Akquise von hochwertigen Bildern der Netzhaut.
- Das Kabel für die automatische Erkennung von rechtem oder linkem Auge während der Messung muss vom Gerät getrennt werden und die Auswahl des untersuchten Auges muss vor jeder Untersuchung manuell in der Software vorgenommen werden.

Abbildung 3: Geräte-Setup für die Untersuchung des Tiermodells

Anpassung des Untersuchungsgerätes an die speziellen Herausforderungen bei der Messung des Mausauges: Die Kinnstütze wird durch eine Spezialleiste ersetzt. Daran wird ein in alle drei Dimensionen verstellbarer und kippbarer Tisch befestigt, auf dem die Versuchsmaus direkt vor das Objektiv des Spectralis® positioniert werden kann. Das Objektiv wird um eine 78D-Ophthalmoskopierlinse ergänzt und das gesamte Gerät auf die Seite des Untersuchers gedreht.

2.4.3 Vorbereitung des Tiermodells

Die Versuchstiere wurden vorab mittels subkutaner Injektion von Ketamin (66,7 mg/kg) und Xylazin (11,7 mg/kg) narkotisiert und die Pupillen mittels Tropicamid Augentrop-

fen (Mydriaticum Stulln, Pharma Stulln, Germany) geweitet. Das Mydriatikum entfaltet die volle Wirkung nach ungefähr 10 Minuten, dann erst wird eine gute Funduseinsicht möglich. Auf die Hornhaut beider Augen wurde nach vorsichtigem zur Seite Streichen der Haare an den Augenlidern zunächst Hydroxypropyl-methylzellulose Lösung (Methocel 2%, OmniVision, Puchheim, Germany) aufgetragen, um sie zum einen vor dem Austrocknen zu schützen und zum anderen das Auflegen einer 100dpt-Sammellinse für die richtige Fokussierung des Untersuchungsstrahls zu ermöglichen. Die gleichzeitige Vorbereitung beider Augen schützt effektiv das zweite Auge, während das erste untersucht wird, und ermöglicht einen schnellen Wechsel zwischen den Augen ohne die Untersuchung lange zu unterbrechen. Der optimale Schutz der Hornhaut der Mäuse ist essentiell um die Untersuchungen im Verlauf der Studie mehrmals wiederholen zu können. Für die Untersuchung wurde die Maus auf den Untersuchungstisch positioniert und weich gelagert, damit ihre Atembewegungen nicht zu stark auf den Kopf übertragen wurden. Um den Untersuchungslaser zentral auf die Netzhaut richten zu können, wurde die Maus durch Verstellen des Untersuchungstisches so ausgerichtet, dass der Laser in etwa parallel zur Längsachse des zu untersuchenden Auges stand. Die Feinjustierung wurde dann während der Untersuchung direkt mithilfe des Echtzeit-Infrarotbildes auf dem Monitor kontrolliert.

2.4.4 Software- und Geräteeinstellung

Die Laserquelle sollte 15 Minuten vor Beginn der Untersuchung eingeschaltet werden, um die optimale Betriebstemperatur und somit eine konstante Laserqualität zu erreichen. Am Computer wurde die vom Hersteller mitgelieferte Software (Heidelberg Eye Explorer Software, HEYEX^{TM}) gestartet und ein neuer „Patient“ angelegt, d.h. entsprechende Daten für die Identifizierung des jeweiligen Versuchstieres eingegeben. Die „c-curve“, also der Wert für den Hornhautradius, wurde für die verwendete Kontaktlinse berechnet und mit 5,8 mm angegeben. Die Untersuchung startet mit der Betätigung der Laser An/Aus-Taste auf dem Bedienpanel und der Wahl des Infrarotlaser-cSLO-Modus. Dadurch wird ein Livebild auf dem Monitor erzeugt, das bei vorsichtigem zentralem Annähern des Kamerakopfes an das Mausauge auf ca. 5 mm Abstand eine Fundusübersicht zeigt, die durch Bewegen des Kamerakopfes in verschiedene Richtungen optimal zentriert werden muss. Die optimale Bildschärfe lässt sich durch einen speziellen Fein-

triebknopf für den Fokus auf der Rückseite der Kamera einstellen. Seitlich am Kamerakopf befindet sich ein Hebel, welcher den Wechsel vom Reflexions- („R“) in den Autofluoreszenzmodus („A“) erlaubt. Während der Infrarot- und rotfreien Aufnahmen bleibt dieser auf R eingestellt.

2.4.5 Bildaufnahme-Einstellungen und Protokoll

Die cSLO-Untersuchung wurde im Infrarot-Modus (IR-Modus) und einem Scanwinkel von 30° gestartet. Die Bildhelligkeit wurde manuell durch Drehen am Automatic-Real-Time-Knopf (ART-Knopf) eingestellt. Nach möglichst perfekter Zentrierung des Sehnervenkopfes im Bild wurde durch Drücken des ART-Knopfes eine Mittelung von 16 Bildern veranlasst und durch Drücken der Aufnahme-Taste eine Aufnahme des gemittelten Bildes ausgelöst. Anschließend wurde das Echtzeitbild durch nochmaliges Drücken des ART-Knopfes wieder aktiviert und in den rotfreien Modus gewechselt. Hier wurde der Fokus manuell angepasst und auf die Nervenfaserschicht gerichtet. Für eine kontrastreiche Aufnahme musste regelmäßig die Bildhelligkeit angepasst werden.
Auch hier wurde eine gemittelte Aufnahme gemacht. Anschließend wurde in den Autofluoreszenz-Modus gewechselt und dafür der Hebel am Kamerakopf auf A bewegt. Nach der Durchführung einer gemittelten Aufnahme wurde der Hebel auf R zurückbewegt und in den IR+OCT-Modus gewechselt. Im optimalen Fall befindet sich das SD-OCT-Echtzeitbild von der Netzhaut auf dem Bildschirm horizontal ausgerichtet und der Sehnervenkopf ist zentriert. Falls nicht, muss dies durch manuelles Bewegen des Kamerakopfes vor der Aufnahme von OCT-Bildern erreicht werden. Im High-Speed-Modus (HS) wurde ein horizontaler Volumenscan mit 121 einzelnen B-Scans veranlasst, wobei jeder Scan ebenfalls 16 mal gemittelt wurde. Zum Ende der Untersuchung wurden die Aufnahmen gespeichert und am Ende eines Untersuchungstages zur Sicherheit auf einer externen Festplatte archiviert.

2.4.6 Bild- und Datenanalyse

Für die Evaluation des Effektes von Dorzolamid wurde die Dicke der Netzhaut ermittelt. Da die innere Netzhaut (hier definiert als Bereich von der Membrana limitans interna bis einschließlich der äußeren plexiformen Schicht) durch die Schisis an Dicke zunimmt und die äußere Netzhaut (hier definiert als Bereich von der äußeren Körner-

schicht bis einschließlich der Bruch'schen Membran) in Folge der Photorezeptordegeneration an Dicke abnimmt, wurden zwei verschiedene Werte – jeweils für die Dicke der Inneren Netzhaut (IRT) und für die Dicke der äußeren Netzhaut (ORT) – ermittelt und unabhängig voneinander verglichen. Für diese Analyse wurden die Rohdaten der SD-OCT B-Scans exportiert und in den MultiModalMapper importiert. (29) Nach softwareassistierter manueller Segmentierung der Netzhautgrenzen berechnet das Programm die vertikalen Abstände zwischen den eingezeichneten Linien an 120 A-Scans gleichen Abstands und gibt diese in Form einer Excel-Tabelle zur weiteren statistischen Auswertung wieder. Diese Werte wurden auf zweierlei Weise analysiert:

1.) Direkter Vergleich zwischen behandeltem und unbehandeltem Auge:
Für die Analyse der Dicke der äußeren Netzhaut wurden jeweils 10 von 60 Werten temporal und jeweils 10 von 60 Werten nasal des Sehnervenkopfes gemittelt, sodass sich für temporal und nasal jeweils 6 Werte im gleichen Abstand ergaben. Diese Werte wurden dann mit den entsprechenden Werten des gleichen Auges aller zu einem Zeitpunkt gemessenen Versuchstieren gemittelt und in einem Liniendiagramm gegen die entsprechenden Werte des anderen Auges aufgetragen. So ergab sich für jeden der fünf Untersuchungszeitpunkte jeweils ein Liniendiagramm, welches die durchschnittliche Dicke der äußeren Netzhaut des behandelten Auges im direkten Vergleich mit der des unbehandelten Auges zeigt. Gleiches wurde für die Analyse der Dicke der inneren Netzhaut durchgeführt.

2.) Vergleich der Differenzen aus den Werten für behandeltes und unbehandeltes Auge:
Um das Ergebnis weitestgehend unabhängig von der interindividuellen Varianz des Krankheitsverlaufs zu machen, wurden die für jede äußere Netzhaut des behandelten rechten Auges ermittelten 12 Werte temporal und nasal des Sehnervenkopfes von den jeweils entsprechenden Werten des unbehandelten Auges des gleichen Versuchstieres subtrahiert. Die entstandenen Differenzen je Messzeitpunkt aller Versuchstiere wurden anschließend gemittelt und der Mittelwert bezüglich Signifikanz analysiert. Gleiches wurde für die Analyse der Dicke der inneren Netzhaut durchgeführt.
Für die quantitative Bestimmung der Schisisverteilung auf vier gleich große Quadranten des aufgenommenen Bereichs wurden die erstellten B-Scans aller Versuchstiere und

Messzeitpunkte durchgeschaut und der Schweregrad der Schisis von zwei unabhängigen Untersuchern mit Werten von 0 (keine Schisis) bis 4 (stark ausgeprägte Schisis) eingeschätzt. Mit dem gleichen Bewertungssystem wurde das Vorkommen autofluoreszenter Bereiche in der Netzhaut anhand der Autofluoreszenzaufnahmen aller Tiere erhoben und verglichen.

2.5 In vivo Funktionsanalyse der Retina

2.5.1 Elektroretinographische Untersuchung

Die Sensitivität der dunkeladaptierten Netzhaut wird in der sogenannten V-log I-Funktion deutlich, welche aus den Messwerten einer Serie von unterschiedlich starken Lichtblitzen erzeugt wird. Dementsprechend liefert sie Informationen über die Funktion der Stäbchen und deren Phototransduktionsprozess. Die Amplituden und Latenzzeiten (Zeit vom Stimulus bis zum Erreichen des ersten Minimums (a-Welle) oder ersten Maximums (b-Welle)) wurden für die Analyse der Stäbchenantwort bei einer Blitz-Intensität von 3cds/m² und für die Analyse der Zapfenantwort bei einer Blitz-Intensität von 20cds/m² bestimmt. Zusätzlich wurden aus den Messergebnissen bei 3cds/m² die Oszillatorischen Potentiale extrahiert. Durch Berechnung der AUC (area under the curve) dieser oszillatorischen Potentiale konnte die Qualität der Signalübertragung auf Höhe der Synapsen zu den Ganglienzellen ausgewertet werden.
Die Elektroretinographie wurde mit einem Espion®-Gerät (Diagnosys LLC, Littleton, MA) an 10 Mäusen 4 Wochen und an 5 Mäusen 12 Wochen nach Ende der Therapie durchgeführt. Ein Bandbreitenfilter für Signale zwischen 0,625 Hz und 500 Hz schützte die Aufnahme vor nichtretinalen Artefakten. Die Impedanz der Elektroden wurde vor und nach jeder Untersuchung geprüft und lag bei 25 Hz bei 10 kΩ entsprechend der Herstellerempfehlung. Für die Stimulation wurde ein Ganzfeld-Simulator (ColorDome; Diagnosys LLC, Littleton, MA) verwendet.

2.5.2 Analyse und Interpretation der ERG-Daten

Die Durchführung der Elektroretinographie geht mit speziellen technischen und logistischen Herausforderungen einher: der Abschirmung vor elektromagnetischen Störfeldern, einer vollständigen Verdunkelung des Arbeitsplatzes, der Auswahl passender Elektroden, der genauen Planung und Einhaltung der Untersuchungsdauer und der gleichmäßigen Anästhesie der Versuchstiere. Diese Herausforderungen konnten nicht immer zu 100 Prozent bewältigt werden. Beispielsweise sind elektromagnetische Störfelder nur bedingt abschirmbar und die Wirkung der Anästhesie von der Pharmakokinetik im individuellen Versuchstier abhängig. Dabei und bei der Entstehung einer Reizantwort in der Retina spielen außerdem natürliche Einflussfaktoren eine nicht unwesentliche Rolle: Ernährung, Schlaf, Uhrzeit der Messung, Tag-Nacht-Rhythmus, Krankheiten, Zuverlässigkeit der Tierpfleger, Stress, Angst etc. (30, 31)
Bei der Auswertung müssen Messwerte aus Signalen der Retina von Artefakten abgegrenzt werden, insbesondere solchen, die durch Bewegung (unterschiedliche Wirkung der Anästhesie) oder Injektion, Lidschluss oder Spasmus, die Lage der Elektroden, die Lage oder Menge des Kontaktgels oder die Atmung verursacht werden. Die modernen Geräte und deren Software verfügen zwar über entsprechende Filtersysteme, jedoch kann nie eine gleichmäßige 100-prozentige Rauschunterdrückung erreicht werden. Vor diesem Hintergrund kommt es zu unterschiedlichen Varianzen bei den Messungen, welche bei der Interpretation berücksichtigt werden müssen.

2.6 Histologische Aufarbeitung

2.6.1 Histologie

Zu jedem der fünf Messzeitpunkte wurden jeweils zwei Versuchstiere für die histologische Untersuchung der Netzhaut verwendet, um die Ergebnisse der in vivo Analysen der Netzhautstruktur zu untermauern. Zur späteren Orientierungsmöglichkeit wurden die Augen an der Hornhaut bei 12 Uhr brandmarkiert. Die Fixation erfolgte über Nacht in 2,5-prozentiger Glutaraldehydlösung, pH 7,3 und 0,1 molarer Natriumkakodylat-Pufferlösung bei 4°C.(32) Nach dem Präparieren der Netzhäute wurden sie mit

Natriumkakodylat-Pufferlösung gewaschen und in Osmiumtetroxid über eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden sie dehydriert und in Epoxidharz eingebettet.
Aus dem Gewebe der zentralen Retina wurden 0,5 mm dicke Schnitte hergestellt, mit Methylethylenblau gefärbt und lichtmikroskopisch (Axiovision, Zeiss, Jena, Germany) untersucht.

2.6.2 Immunohistochemie

Nach der letzen Messung (6 Monate nach Beendigung der Therapie) wurden vier Versuchstiere für die Durchführung immunohistochemischer Untersuchungen von Cryoschnitten oder whole mount Präparationen verwendet.

Vorbereitung

Nach Entfernung von Hornhaut und Linse wurden die Augen in 4% Paraformaldehyd enthaltender 0,1 molarer phosphatgepufferter Salzlösung (PBS); pH 7,4; für die Dauer von 30 Minuten eingelegt. Anschließend wurden die Netzhäute im Ganzen (whole mounts) aus den Augäpfeln gelöst. Whole mounts wurden, um die flache Positionierung auf dem Objektträger zu ermöglichen, jeweils viermal im gleichen Winkel eingeschnitten und für die Weiterbehandlung mit Immunfärbungen in PBS gelagert.
Weitere vier Netzhäute wurden stufenweise in saccharosehaltige PBS-Lösung (1h in 10-prozentiger, 1h in 20-prozentiger und über Nacht in 30-prozentiger Lösung) zum Schutz vor Frostschäden gelegt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in 12 µm dünne Schnitte zerlegt und bei 37°C luftgetrocknet.

Immunfärbung

Für die Immunfärbung wurden die Netzhautschnitte mit PBS gespült und dann eine Stunde lang in einer Lösung aus PBS, 10% Eselserum, 1% Rinderalbumin, 0,3% Triton X-100 bei Zimmertemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Für die gleichzeitige Markierung der Proben mit zwei unterschiedlichen primären Antikörpern wurden diese über Nacht bei 4°C in Speziallösung mit Rot/Grün-Opsin-Antikörper aus Hasenserum (rabbit-anti-Opsin, red/green, 1:200, Millipore), und Blauopsin-Antikörper aus Ziegenserum (goat-anti-blue-Opsin1:400, Santa Cruz) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit PBS gespült und mit sekundären fluo-

reszierenden Antikörpern aus Eselsserum (donkey-anti-rabbit IgG Alexa 568 und donkey-anti-goat IgG Alexa 488) 500-fach verdünnt in PBS bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert. Nach abschließender Spülung mit PBS wurden die Schnitte in Vectashield Mounting Medium gelegt und mit DAPI (4′,6-Diamidin-2-phenylindol, Vector Laboratories) gekoppelt. Die whole mounts wurden zum Schutz vor unspezifischer Antikörperbindung in der gleichen Lösung wie auch die Schnitte inkubiert und anschließend mit den gleichen primären Antikörpern behandelt. Hier betrug die Inkubationszeit bei 4°C unter gleichmäßigem Verrühren 5 Tage. Als nächstes folgte die Inkubation in einer Lösung mit den sekundären Antikörpern über Nacht, ebenfalls bei 4°C Umgebungstemperatur. Abschließend wurden die whole mounts mit PBS gespült, auf Glasobjektträger aufgelegt und mit Vectashield Mounting Medium ohne DAPI bedeckt. Kontrollen wurden durch das Weglassen von einem oder beiden primären Antikörpern durchgeführt. Zum Mikroskopieren wurde ein spezielles Fluoreszenz-Mikroskop (Axio Imager Z1 ApoTome mit AxioCam camera, Zeiss, Jena, Germany) verwendet. Für die Bildverarbeitung und Speicherung stand die Zeiss Software Axiovision 4.7 zur Verfügung und zur späteren Kontrastverbesserung für die Darstellung wurde ein Bildbearbeitungsprogramm (Photoshop CS3, Adobe Systems, San Jose, CA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Scanning-Laser-Ophthalmoskopie – qualitative Analyse

Mit der konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie konnten detaillierte Fundusaufnahmen zu allen Messzeitpunkten (12h, 14d, 4w, 2m, 6m nach der Behandlung) gemacht werden. Die Verwendung der verschiedenen Modi (IR, RF, AF, FA) ermöglichte eine umfassende Beurteilung des Fundus. Es wurde jedoch kein Unterschied zwischen unbehandeltem und behandeltem Auge festgestellt (Abb. 4).

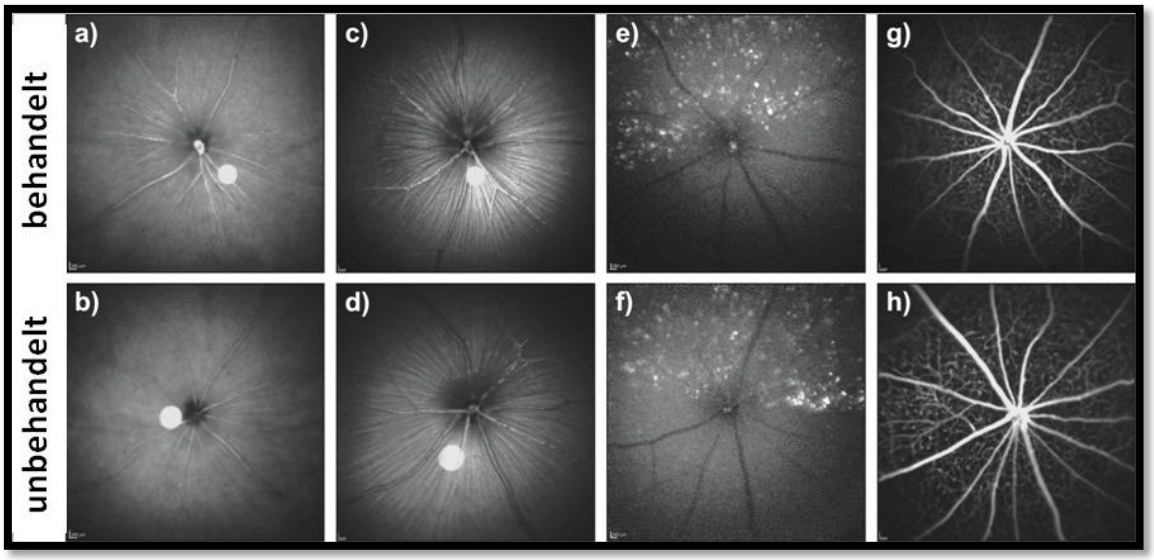


Abbildung 4: Vergleich der cSLO-Fundusaufnahmen behandelter versus unbehandelter Augen

Die Abbildung zeigt die Fundusaufnahmen vier verschiedener Versuchstiere, jeweils eine vom behandelten rechten Auge (obere Reihe) und eine vom unbehandelten linken Auge in verschiedenen Aufnahmemodi: Infrarotlaser (a+b), rotfreier Laser (c+d), Autofluoreszenz (e+f), Fluoreszenz-Angiographie(g+h). Die Aufnahmen zeigen in keinem der verwendeten Modi messbare Unterschiede zwischen behandeltem und unbehandeltem Auge.

3.1.1 Fundusveränderungen bei Aufnahmen mit Infrarotlaser und rotfreiem Laser

Im Infrarotmodus (IR) wurden die für die XLRSh1 typischen zystoiden Veränderungen in Form von gleichmäßig um den Sehnervenkopf herum verteilten Flecken deutlich.

Diese heben sich durch einen dunkleren Grauton hervor und lassen den gesamten Fundus inhomogen wirken (Abb. 5).

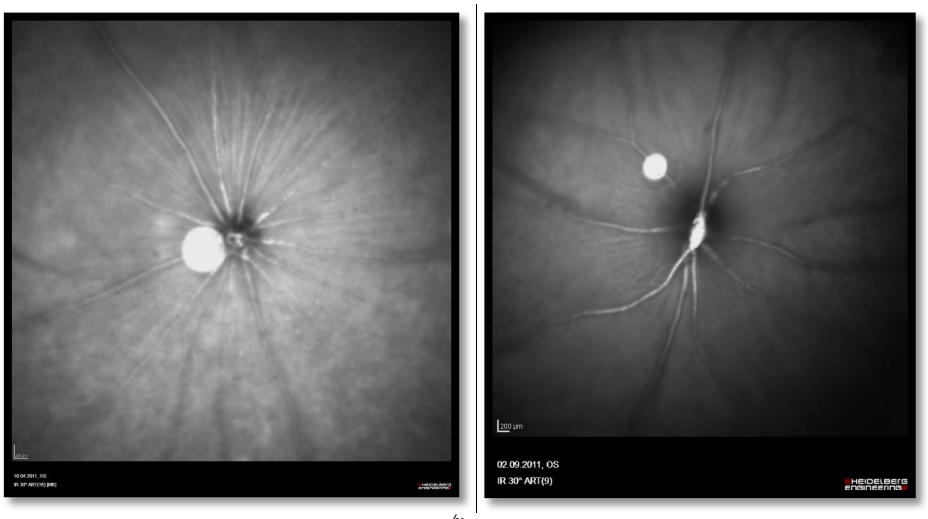


Abbildung 5: Infrarotlaser cSLO; *Rsh1*$^{-/y}$ vs. Wildtyp

Links: IR Fundusaufnahme bei der Rs1h$^{-/y}$-Maus (OS, unbehandelt). Gleichmäßig um den Sehnervenkopf herum kontrastverstärkte Areale lassen zystoide Veränderungen in der Netzhaut vermuten. Rechts: IR Fundusaufnahme bei einer Wildtyp-Maus (OS). Die Oberfläche ist weitestgehend homogen.

Im RF-Modus wird bei entsprechender Einstellung des Fokus auf Höhe der Nervenfaserschicht die Anordnung und Stärke der Nervenfaserbündel sehr gut beurteilbar. Hier zeigt die Rs1h$^{-/y}$-Maus keinen Unterschied zum Wildtyp (Abb. 6).

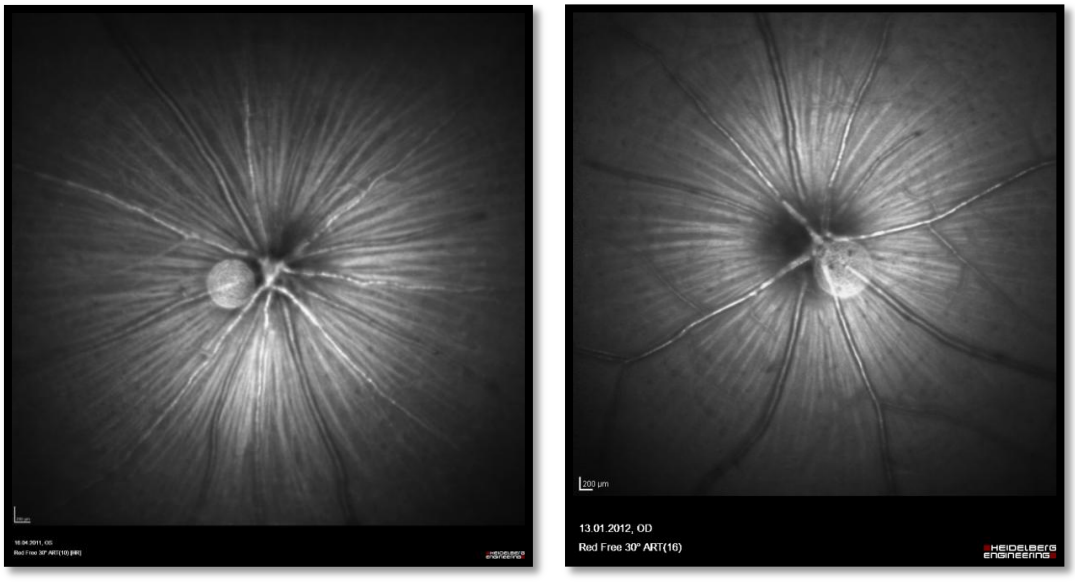


Abbildung 6: cSLO mit rotfreiem Laser; *Rsh1*$^{-/y}$ vs. Wildtyp

Die cSLO mit rotfreiem Laser ermöglicht einen detaillierten Blick auf die Nervenfaserschicht. Es lässt sich kein Unterschied zwischen dem Befund bei der XLRS Maus (links im Bild) und der Wildtyp-Maus (rechts im Bild) beobachten.

3.1.2 Fundusveränderungen in der Autofluoreszenz Aufnahme

Im Autofluoreszenz-Modus zeigten die Rs1h$^{-/y}$-Mäuse schon bei der ersten Messung unter dem entsprechenden Laser hyperfluoreszente Punkte und Flecken, welche sich beim überwiegenden Teil der Versuchstiere vorwiegend in der superioren Netzhauthälfte manifestierten (Abb. 7).

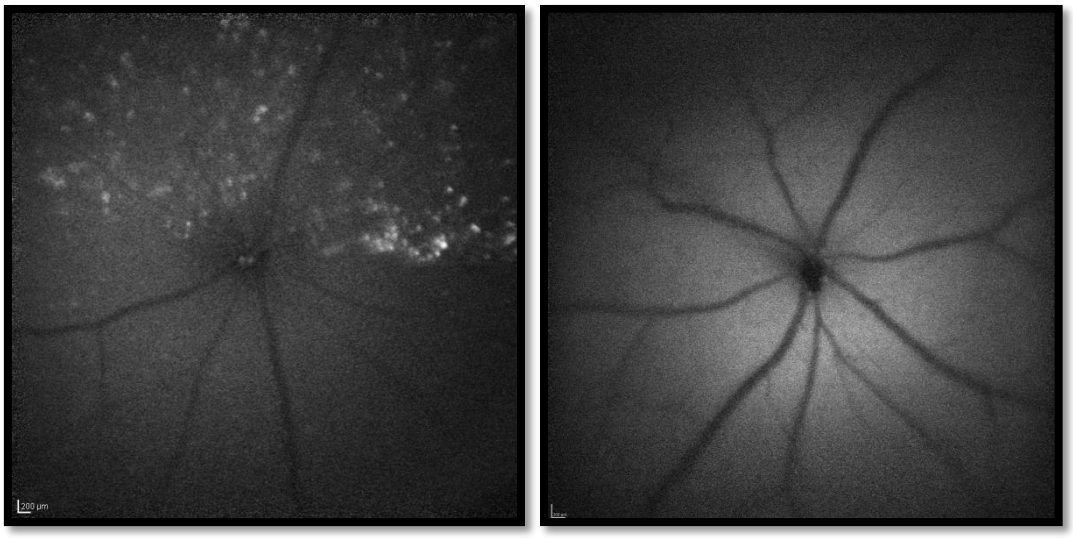


Abbildung 7: Fundusaufnahmen im Autofluoreszenzmodus; *Rsh1*$^{-/y}$ vs. Wildtyp

Links: Autofluoreszenzaufnahme des Fundus bei der XLRS-Maus (OS, unbehandelt). Es zeigen sich hperfluoreszente Punkte und Flecken, welche verstärkt in der superioren netzhauthälfte auftreten. Rechts (b): Autofluoreszenzaufnahme des Fundus bei einer Wildtyp-Maus (OD). Die Autofluoreszenz der Netzhaut ist schwach und homogen.

3.1.3 Entwicklung der Hyperfluoreszenz über die Zeit

Eine genaue Erklärung für die Pathogenese der Hyperfluoreszenz gibt es bisher noch nicht und könnte Bestandteil weiterer Versuche sein. Während einer semiquantitativen Analyse wurde neben dem Verteilungsmuster auf der Netzhaut auch die Entwicklung der Flecken über den gesamten Versuchszeitraum hinweg evaluiert. Es zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Hyperfluoreszenz bis zum letzten Messzeitpunkt im Alter der Mäuse von 7 Monaten (Abb. 8).

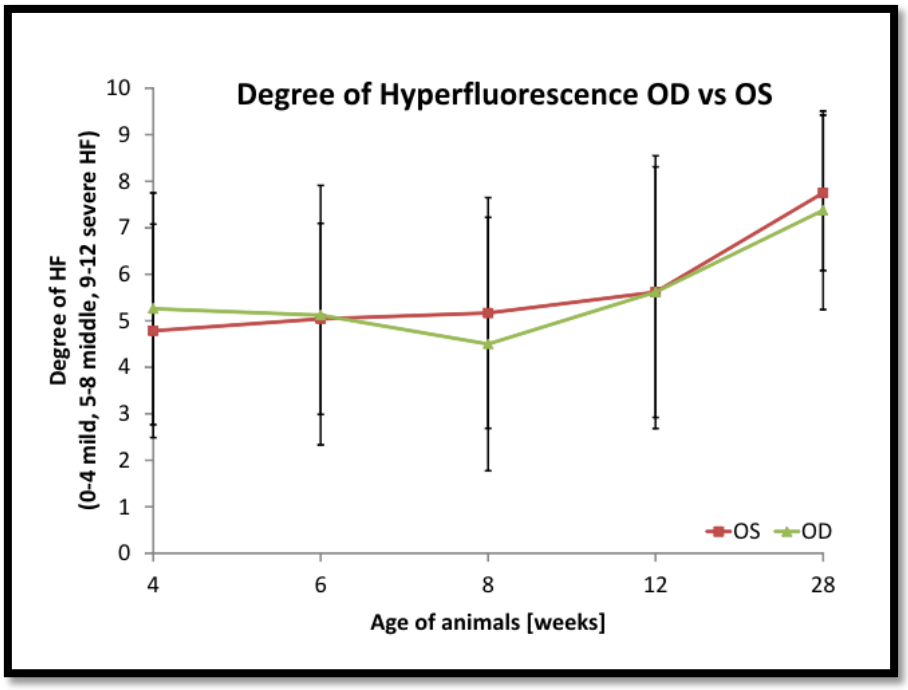


Abbildung 8: Hyperfluoreszenz in Abhängigkeit vom Krankheitsfortschritt

Die semiquantitative Evaluation der Hyperfluoreszenz zeigt eine stetige Zunahme mit einem Maximum im Alter von 7 Monaten (n = 27 im Alter von 4 Wochen, n = 8 im Alter von 24 Wochen).

3.1.4 Verteilung der Hyperfluoreszenz in der Retina

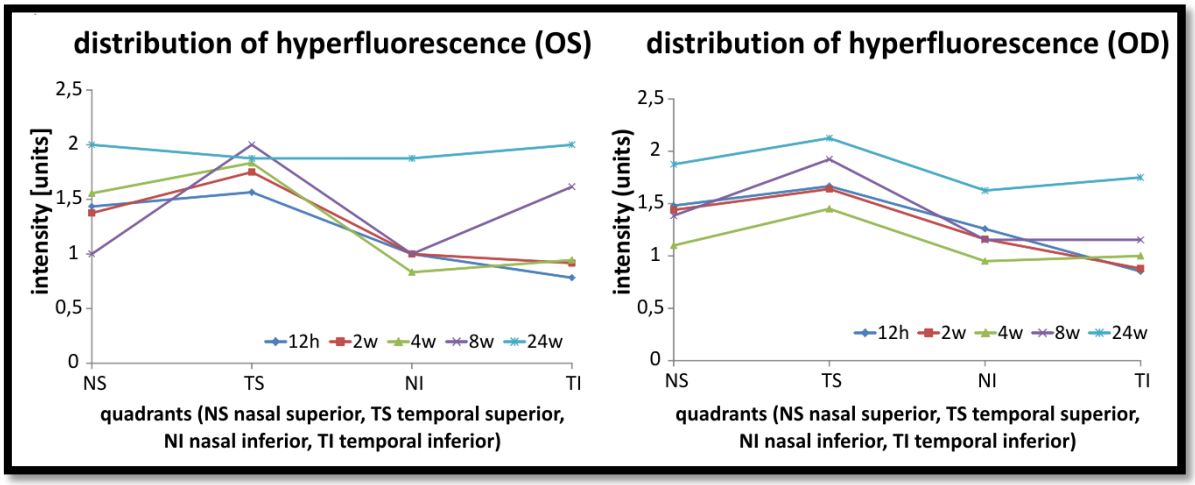


Abbildung 9: Verteilung der Hyperfluoreszent

Es fällt auf, dass die Hyperfluoreszenz im Durchschnitt häufiger in der superioren Hemiretina (NS und TS) auftritt als im restlichen Teil der Netzhaut und im rechten Auge (OD) etwas deutlicher als im linken Auge (OS) (n = 27 im Alter von 4 Wochen, n = 8 im Alter von 24 Wochen).

3.1.5 Fluoreszenzangiographie

In der Fluoreszenzangiographie (FLA) sind zu keinem Zeitpunkt deutliche Unterschiede zum Wildtyp zu erkennen. Gefäßstruktur, -verlauf und Gefäßwandpermeabilität bleiben vom Krankheitsgeschehen unbeeinträchtigt (Abb. 10).

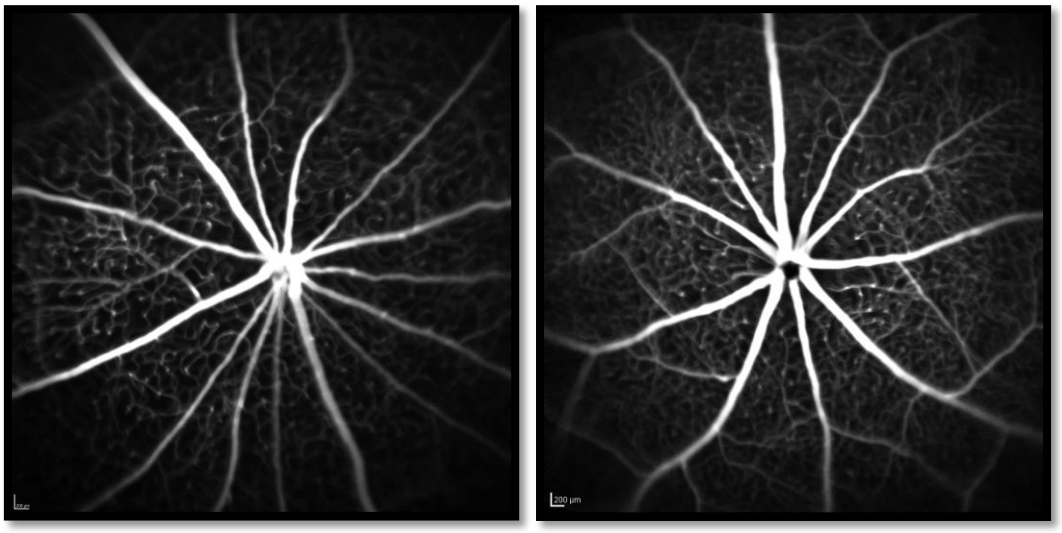


Abbildung 10: Fluoreszenzangiographie in *Rs1h*$^{-/y}$-Maus und Wildtyp

Im FLA-Modus zeigen sich makroskopisch keine deutlichen Gefäßpathologien im Vergleich zum Wildtyp. Es lässt sich lediglich eine Rarefizierung vermuten. Links: FLA bei der *Rs1h*$^{-/y}$-Maus (OS, unbehandelt), rechts: FLA bei einer Wildtyp-Maus (OD)

3.2 Optische Kohärenztomographie

3.2.1 Optische Kohärenztomographie an der gesunden Netzhaut von Mensch und Maus

Die OCT-Aufnahme liefert detaillierte Informationen über die Netzhautstruktur am Lebenden. Die ultrahochauflösende Technik ermöglicht die Untersuchung von Anordnung, Kontinuität und Dicke der einzelnen Schichten der Netzhaut. Die Anpassung des Messgerätes an die speziellen Voraussetzungen bei der Maus (15) ermöglicht in diesem Versuch das Ausmaß von Schisisformation und Photorezeptorschichtdegeneration zu beurteilen, ohne die Versuchstiere vorher der für die histologische Untersuchung erforderlichen Manipulation zu unterziehen. Somit wird auch eine wiederholte Beurteilung

möglich. Trotz der fehlenden Makula bei den Mäusen ist die Ähnlichkeit zur menschlichen Netzhaut sehr groß. So finden sich bei der Maus im OCT-Schnittbild ebenfalls alle beim Menschen identifizierbaren Netzhautschichten vom retinalen Pigmentepithel bis hin zur Ganglienzellschicht wieder und sind somit auf gleiche Weise evaluierbar (Abb. 11).

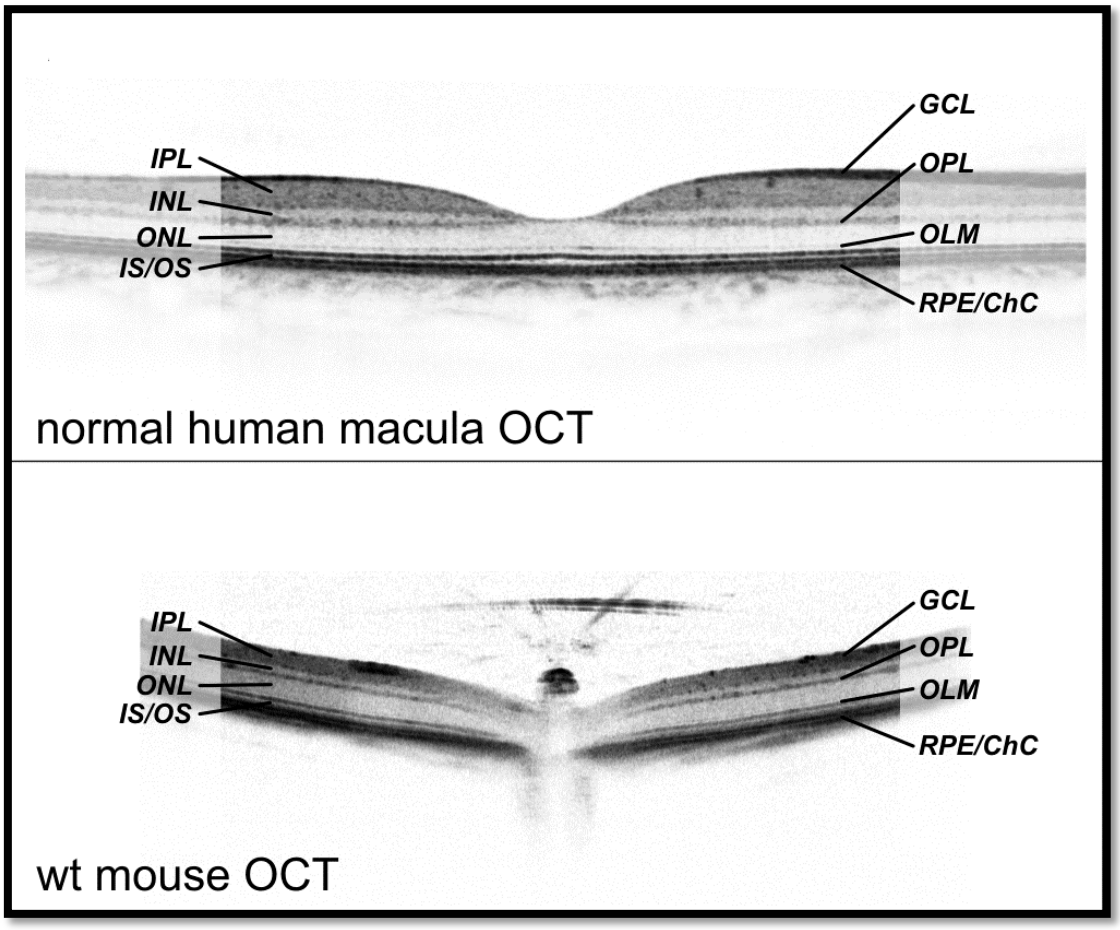


Abbildung 11: OCT-Schnittbilder von Maus und Mensch

Hochauflösende OCT-Schnittbilder gesunder Netzhäute von Maus und Mensch im Vergleich. Oben: Gesunde Netzhaut des Menschen, Schnittbild durch die Makula und Fovea. Unten: Gesunde Netzhaut einer Maus (wt mouse), Schnittbild zentral durch den Sehnervenkopf. (RPE: Retinal Pigment Epithelium, IS: Inner Segment, OS: Outer Segment, OLM: Outer Limiting Membrane, ONL: Outer Nuclear Layer, OPL: Outer Plexiform Layer, INL: Inner Nuclear Layer, IPL: Inner Plexiform Layer, GCL: Ganglion Cell Layer)

3.2.2 Strukturelle Veränderungen der Netzhaut bei der *Rs1h*$^{-/y}$-Maus und beim Menschen mit XLRS

Das OCT-Schnittbild zeigt eine deutliche Schisis mit Pseudozysten, welche eine Degeneration der Photorezeptorschicht nach sich zieht und letztendlich zu einer Umorganisation der Netzhautschichten führt. Genauso wie auch beim Menschen spaltet sich die Netzhaut insbesondere im Bereich der inneren Körnerschicht auf, jedoch nicht in der Makula, da diese in Mäusen in dieser Form nicht existiert, sondern um den Sehnervenkopf herum ubiquitär bis in die Peripherie (Abb. 12).

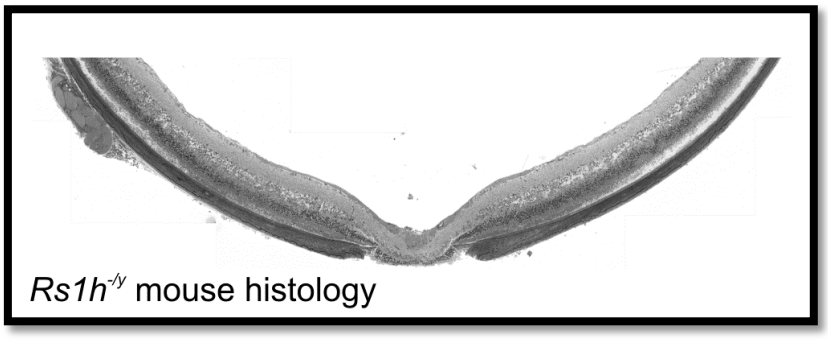


Abbildung 12: OCT-Schnittbilder im Vergleich - XLRS bei Mensch und Maus

Hochauflösende OCT-Schnittbilder bei ausgeprägter Retinoschisis. Oben: Mensch; Scan durch die Makula und Fovea. Mitte: Maus, Scan zentral durch den Sehnervenkopf. Unten: Maus, histologischer Schnitt zentral durch den Sehnervenkopf. Das OCT-Schnittbild der Maus (Mitte) bestätigt den Befund von Pseudozysten in der Histologie (unten) und zeigt Ähnlichkeiten in der Pathologie zwischen Maus und Mensch (oben).

Der starke interindividuelle Unterschied in Progress und Ausprägung der Krankheit hat sich bei den zahlreichen Untersuchungen auch für das Mausmodell klar bestätigt. Dies unterstreicht die Notwendigkeit des intraindividuellen Links-Rechts-Vergleichs bei der Evaluation der therapeutischen Wirksamkeit jeglicher Medikamente.

3.2.3 Direkter Vergleich der OCT-Bilder von behandelter und unbehandelter Netzhaut

Die statistische Analyse der OCT-Daten hat keinerlei Unterschiede zwischen behandeltem (rechts) und unbehandeltem (links) Auge aufgezeigt. Dies lässt sich bereits aus dem direkten Vergleich vermuten.

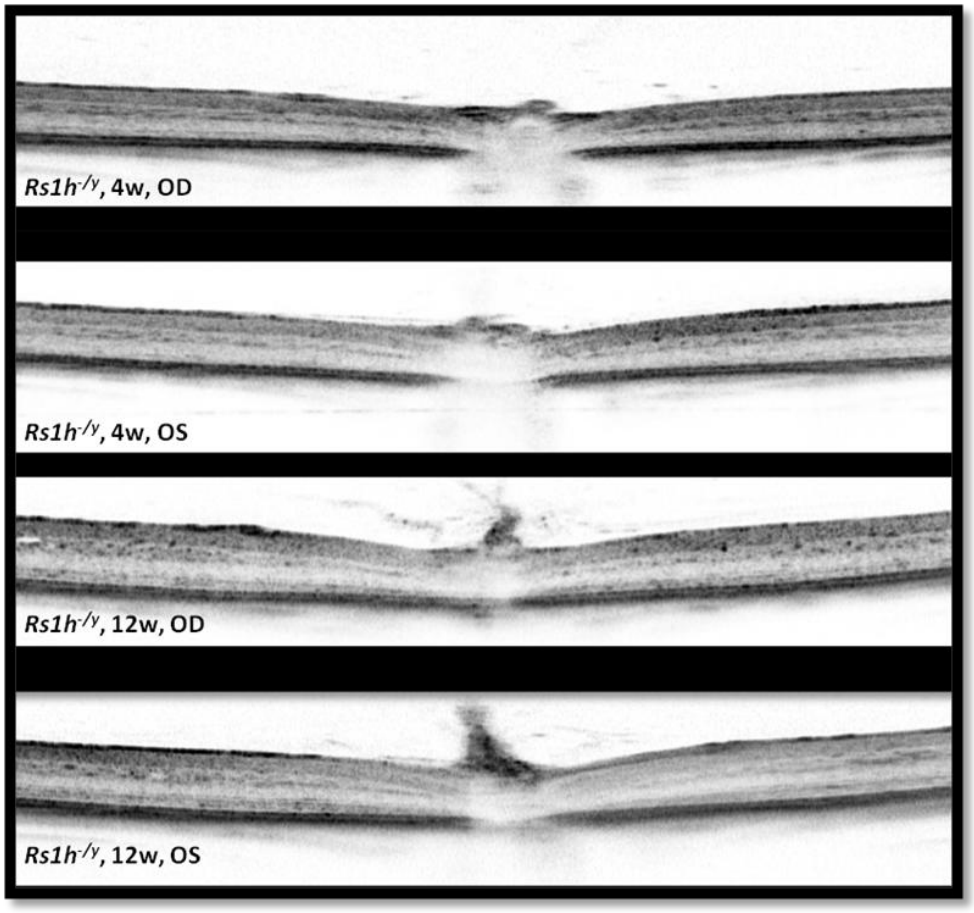


Abbildung 13: OCT-Schnittbilder von der *Rs1h*$^{-/y}$-Maus – Linkes Auge versus rechtes Auge

Der direkte Vergleich der Schnittbilder von behandeltem (OD) und unbehandeltem (OS) Auge zeigt weder zum ersten (4w) noch zum dritten (12w) Messzeitpunkt einen deutlichen Unterschied. Mithilfe der OCT-Methode wird die Degeneration der Netzhautschichten schon früh deutlich und eine Verlaufsanalyse über mehrere Messzeitpunkte möglich.

3.2.4 Quantitative OCT-Analyse – Betrachtung der Schisis

Durch die Etablierung der *in vivo* Strukturanalyse ist dieser Versuch in dieser Form erst möglich geworden, denn ein interindividueller Vergleich würde möglicherweise nur bei sehr hohen Versuchszahlen repräsentative Ergebnisse liefern. So lieferte eine Querschnittsanalyse der Aufnahmen aller Versuchstiere über alle Messzeitpunkte hinweg Hinweise auf die zeitliche Entwicklung der Schisis mit einem durchschnittlichen Maximum 8 Wochen nach Ende der Therapie (Abb. 14). Außerdem lässt sich eine annähernde Aussage zu der Verteilung der Schisis machen. Sie tritt vornehmlich in der superioren Hemiretina auf, ähnlich dem Auftreten der Hyperfluoreszenz (Abb. 15). Vergleicht man einen OCT-Scan mit einem histologischen Schnitt, so wird der Nutzen der in vivo Analyse noch einmal deutlicher. In der Histologie schrumpfen die Pseudo-

zysten in Folge des Fixationprozesses und die Schisis könnte je nach Schweregrad auch mit einem Artefakt verwechselt werden (Abb. 12).

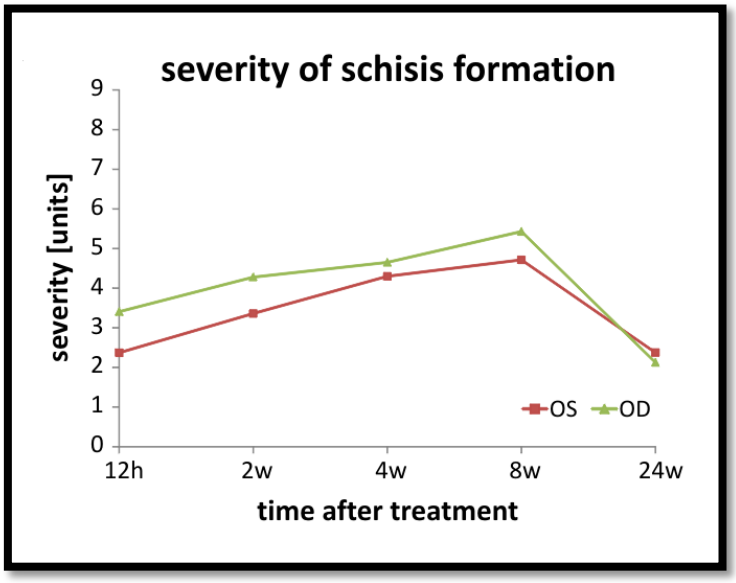


Abbildung 14: Schweregrad der Schisis in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer

Die semiquantitative Analyse der Volumenscans aller Untersuchungen zeigt die kontinuierliche Zunahme der Schisis nach Ende der Behandlung bis zum Abstand von 8 Wochen. Zum letzten Messzeitpunkt nimmt sie wieder stark ab. Somit liegt das Maximum der Schisisausprägung im Versuchstieralter von 12 Wochen.

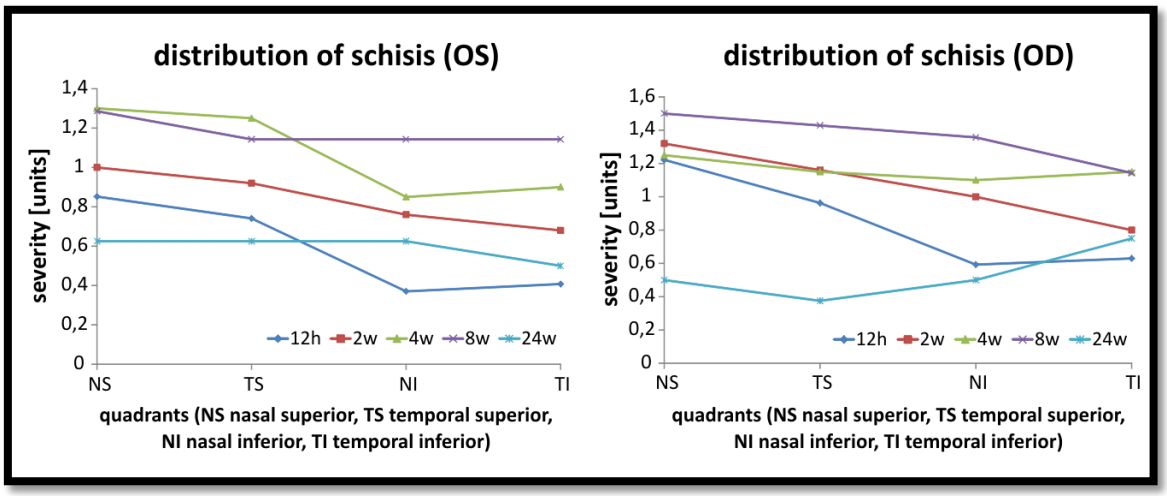


Abbildung 15: Verteilung der Schisis auf die vier Netzhautquadranten

Die Schisis tritt ubiquitär über die gesamte Netzhaut der Maus auf. Es ist eine Tendenz nach superior, ähnlich der Hyperfluoreszenzverteilung zu erkennen (NS: Nasal superior, TS: Temporal superior, NI: Nasal inferior, TI: Temporal inferor).

3.2.5 Quantitative OCT-Analyse – Dicke der Netzhaut

Um den therapeutischen Effekt des Carboanhydrasehemmers Dorzolamid auf die Netzhautstruktur bei der XLRSh1 zu evaluieren, wurde die Netzhautdicke ermittelt und Werte des unbehandelten linken Auges gegen Werte des behandelten rechten Auges aufgetragen. Dabei boten sich verschiedene Möglichkeiten der Betrachtungsweise an, wie im Folgenden nacheinander aufgezeigt wird.

3.2.6 Gesamtdicke der Netzhaut

Im ersten Schritt wurde die Gesamtdicke der Netzhaut von der inneren Grenzmembran (ILM) bis einschließlich der Photorezeptorschicht an mehreren fest definierten Abständen zum Sehnervenkopf entlang der horizontalen Achse ausgemessen. Je Messzeitpunkt und Dickenwert im gleichen Abstand wurden die Durchschnittswerte aller linken Augen (OS) gegen die entsprechenden Durchschnittswerte aller rechten Augen (OD) von insgesamt 14 Versuchstieren aufgetragen und in einem Graphen visualisiert. Dabei zeigt sich bei geringer Varianz kein signifikanter Unterschied zwischen OS und OD (Abb. 16).

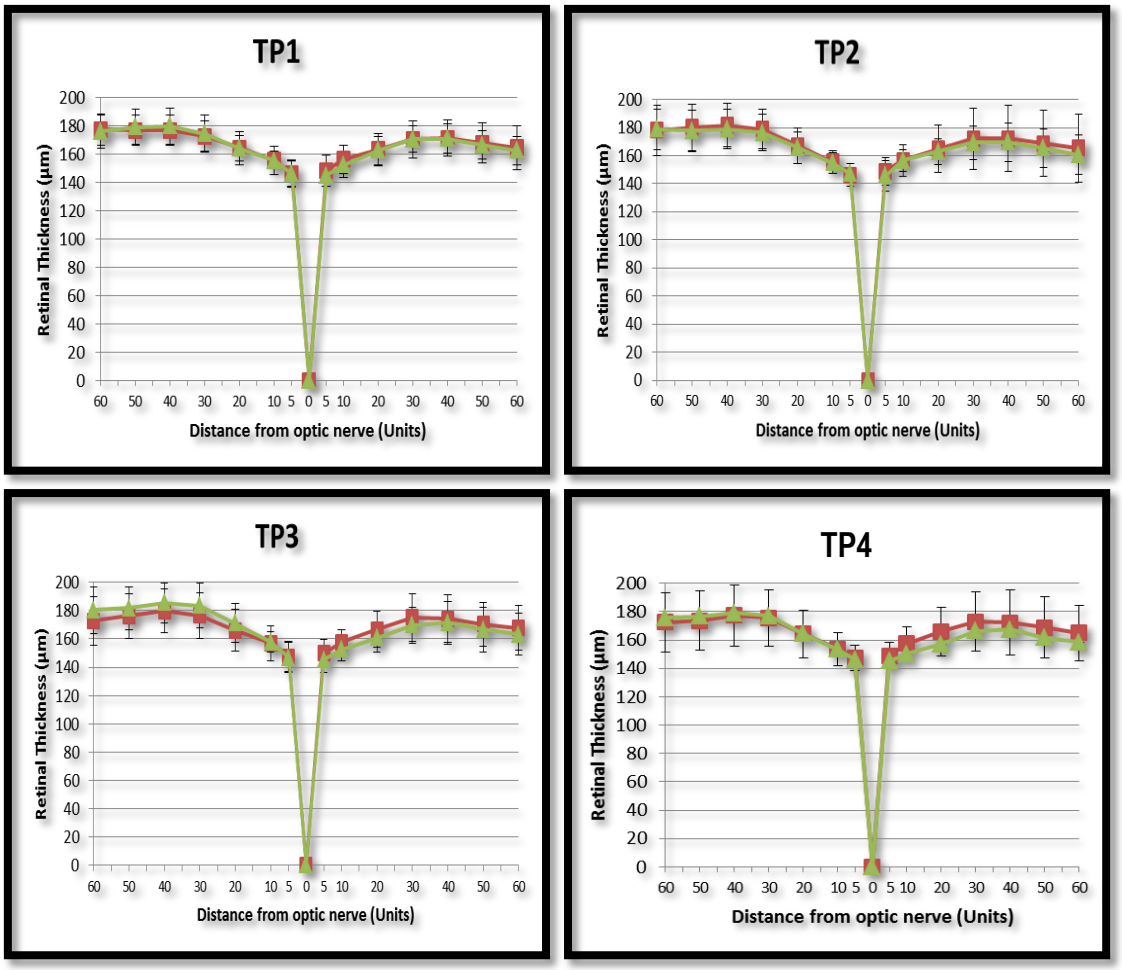


Abbildung 16: Dicke der Netzhaut – behandelte und unbehandelte Augen im Vergleich

Gesamtdicke der Netzhaut der unbehandelten Augen (rot) gegen die Gesamtdicke der Netzhaut der behandelten Augen (grün) von insgesamt 14 Versuchstieren je Messzeitpunkt (TP1:12h, TP2:2w, TP3:4w, TP4:8w nach Behandlungsende). Es wurde jeweils die Netzhautdicke an einheitlich definierten Abständen zum Sehnervenkopf entlang der horizontalen Achse gemessen und entsprechende Werte gemittelt.

3.2.7 Dicke der äußeren Netzhaut

Da die Netzhaut bei der XLRSh1 jedoch am ehesten in zweierlei Weise strukturelle Veränderungen erfährt, nämlich eine Zunahme der Dicke der inneren Netzhaut bedingt durch die Pseudozysten und gleichzeitig eine Abnahme der Dicke der äußeren Netzhaut bedingt durch die Degeneration der Photorezeptorschicht, lag die Überlegung nahe, die Entwicklung dieser Schichten unabhängig voneinander zu untersuchen. So wurde eine Analyse jeweils für die äußere und die innere Netzhaut durchgeführt. Die Messung der äußeren Netzhaut sollte Hinweise auf das Ausmaß der Photorezeptordegeneration ge-

ben. Dafür wurden die Daten vom unbehandelten (OS) und vom behandelten Auge (OD) gegeneinander und gegen entsprechende Daten einer Wildtypmaus aufgetragen. Zum einen um Hinweise auf einen eventuellen Effekt der Dorzolamidtherapie zu erhalten, zum anderen um das Ausmaß der Photorezeptordegeneration in der XLRSh1 im Vergleich zum Gesunden aufzuzeigen. Zum ersten Messzeitpunkt 12 Stunden nach Ende der Therapie lagen Daten von insgesamt 27 Versuchstieren vor. Ein Unterschied zwischen OS und OD ist hier jedoch nicht festzustellen. Da dies für alle Messzeitpunkte gleichermaßen gilt, werden repräsentativ Ergebnisse der ersten Messung gezeigt. Im Vergleich zum Wildtyp ist eine massive Abnahme der Dicke der äußeren Netzhaut um nahezu der Hälfte zu erkennen (Abb. 17).

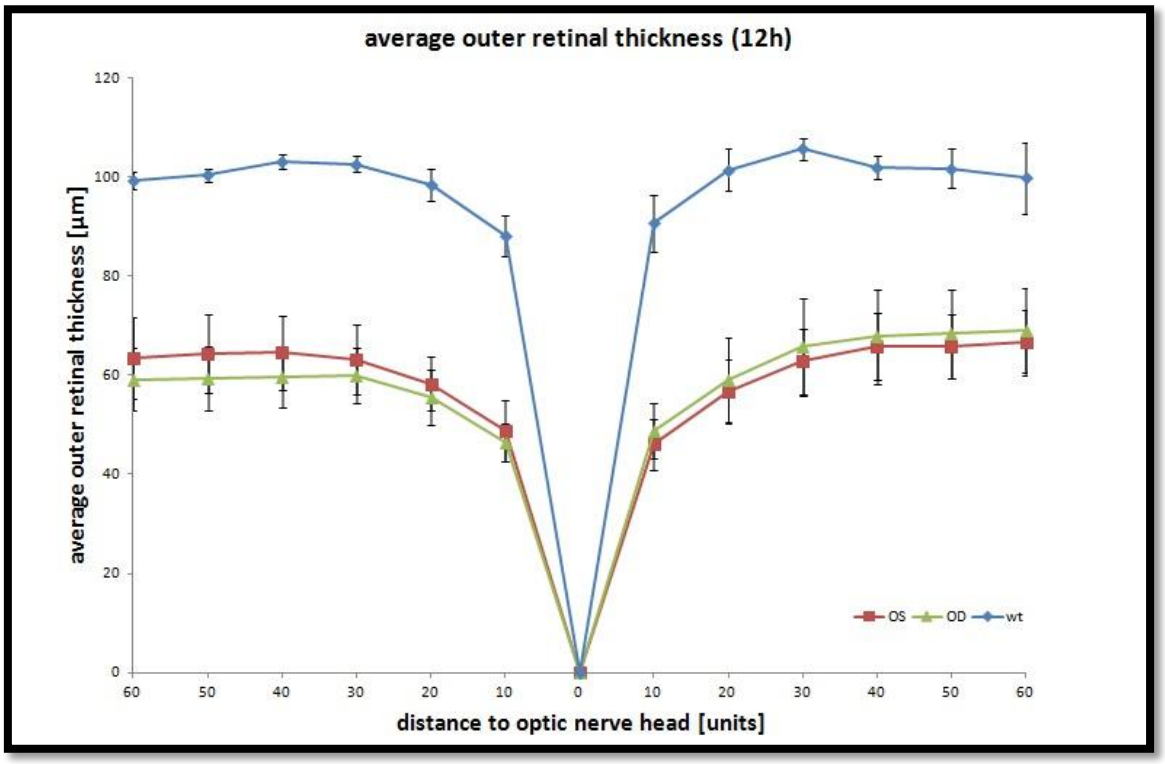


Abbildung 17: Dicke der äußeren Netzhaut

Der Vergleich der gemittelten Dicken der äußeren Netzhaut liefert keine Unterschiede zwischen OS (rot) und OD (grün), zeigt jedoch eine massive Reduktion im Vergleich zum Wildtyp (blau) auf (n=27).

3.2.8 Dicke der inneren Netzhaut

Bei der Messung der inneren Netzhaut wurde aufgrund der zystischen Veränderung eine Zunahme der Dicke gegenüber dem Wildtyp und für den Erfolg des Behandlungsversu-

ches eine Abnahme der Netzhautdicke des behandelten Auges gegenüber dem unbehandelten erwartet. Weder ersteres noch letzteres ist eingetreten. Abb. 18 zeigt, dass es keinen Dickenunterschied zum Wildtyp gibt und bei gleicher Dicke in OS wie in OD keinn Hinweis auf einen Effekt von Dorzolamid auf die Schisisentstehung.

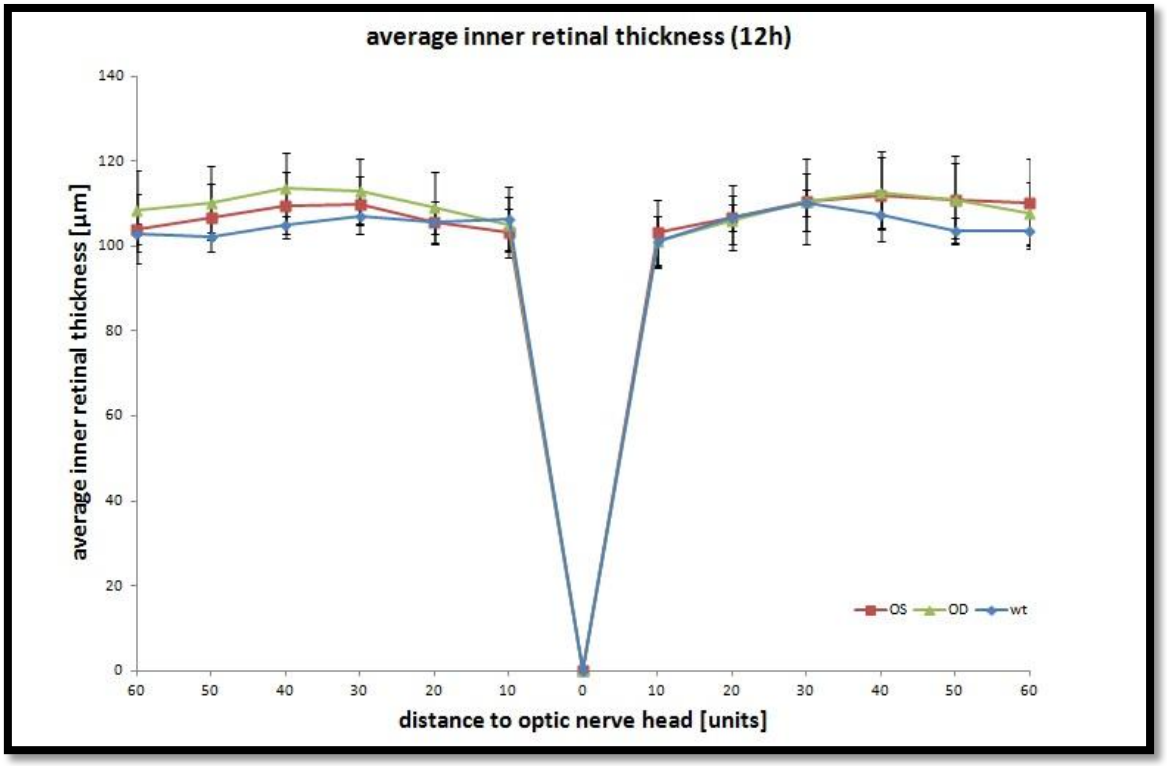


Abbildung 18: Dicke der inneren Netzhaut

Der Vergleich der Dicken der inneren Netzhaut zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen behandeltem (grün) und unbehandeltem Auge (rot), auch ist kein Unterschied zum Wildtyp (blau) messbar (n=27).

3.2.9 Differenz aus Dicke der Netzhaut von rechtem und linkem Auge

Um gezielt den Fokus auf die Unterschiede zwischen den Netzhautdicken zu richten, wurden Differenzen aus den jeweiligen Dickenwerten von behandeltem und unbehandeltem Auge gebildet. Dickenwerte lagen vor für jeweils 12 Stellen an definierten Abständen zum Sehnervenkopf. Auch hier wurden die innere und die äußere Netzhaut separat betrachtet. Werte des unbehandelten linken Auges (OS) wurden jeweils direkt mit den entsprechenden Werten des behandelten rechten Auges (OD) verglichen. Die Differenzen aller Versuchstiere wurden dann für jeden Messzeitpunkt gemittelt und

ergaben bei einem Konfidenzintervall von 95% nach Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Ergebnisse (s. Tabelle 1). Für den ersten Messzeitpunkt (24h nach Beendigung der Therapie) wurden die Ergebnisse exemplarisch jeweils für die innere (Abb. 19) und für die äußere Netzhaut (Abb. 20) graphisch visualisiert. Dabei wurden, wie oben beschrieben, je 6 Werte temporal und 6 Werte nasal des Sehnervenkopfes gemittelt und deren Differenzen gebildet. Es liegt nun nachgewiesener Maßen kein signifikanter Unterschied zwischen den Dicken der inneren oder äußeren Netzhaut vor, was wiederum bedeutet, dass Dorzolamid in diesem Versuchs-Setup keinerlei Effekt auf die Netzhautdicke bei der XLRSh1 gezeigt hat.

3.2.10 Dicke der inneren Netzhaut

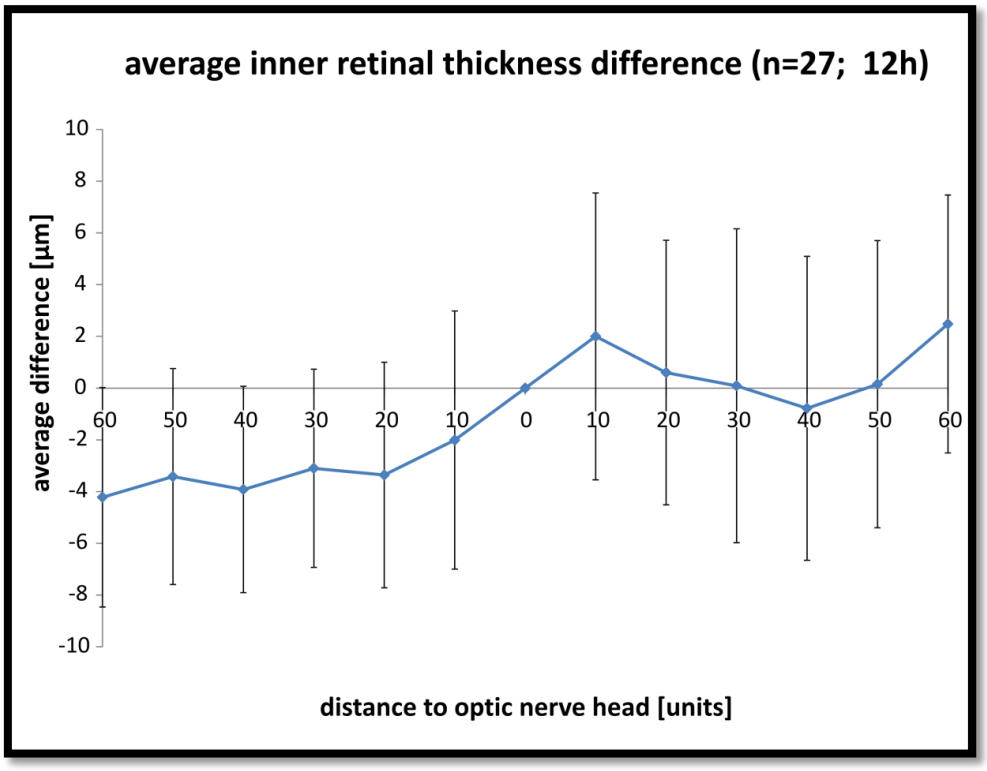


Abbildung 19: Durchschnittliche Differenz aus Dicke der inneren Netzhaut von rechtem und linkem Auge

An keiner Stelle temporal oder nasal des Sehnervenkopfes liegt ein Unterschied zwischen den Dicken der inneren Netzhaut des linken und rechten Auges vor (KI 95%, unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur). Die Dicke der inneren Netzhaut wurde für jedes Auge an 12 definierten Stellen entlang einer horizontalen Achse durch den Sehnervenkopf (entspricht Stelle 0) gemessen. Die Dicken an den entsprechenden Stellen aus jeweils linkem und rechtem Auge wurden voneinander subtrahiert und aus allen Differenzen der 27 Versuchstiere je Stelle ein Mittelwert gebildet.

3.2.11 Dicke der äußeren Netzhaut

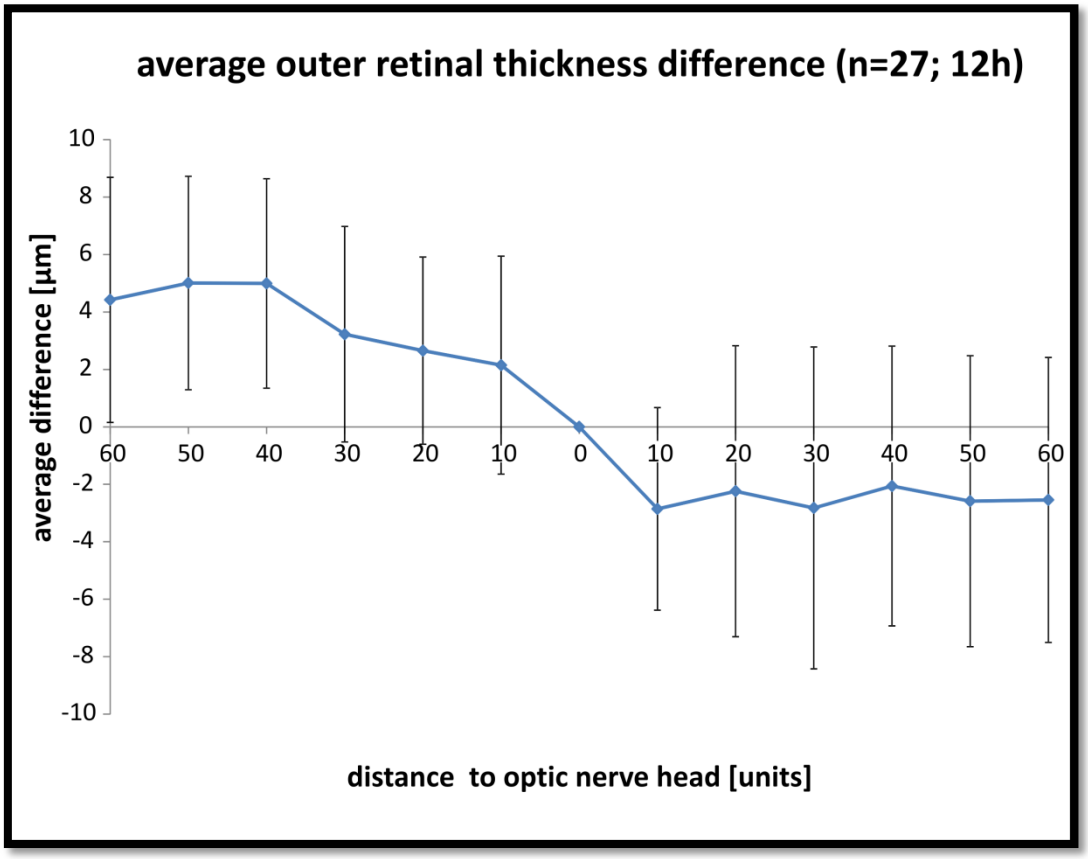


Abbildung 20: Durchschnittliche Differenz aus Dicke der äußeren Netzhaut von rechtem und linkem Auge

An nahezu keiner Stelle temporal oder nasal des Sehnervenkopfes liegt ein Unterschied zwischen den Dicken der äußeren Netzhaut des linken und rechten Auges vor (KI 95%, unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur). Die Dicke der äußeren Netzhaut wurde für jedes Auge an 12 definierten Stellen entlang einer horizontalen Achse durch den Sehnervenkopf (entspricht Stelle 0) gemessen. Die Dicken an den entsprechenden Stellen aus jeweils linkem und rechtem Auge wurden voneinander subtrahiert und aus allen Differenzen der 27 Versuchstiere je Stelle ein Mittelwert gebildet.

time after treatment	n	Δ IRT (mean ± 95% CI)	Δ ORT (mean ± 95% CI)
12h	27	1.29 ± 1.89 µm	0.61 ± 2.08 µm
2w	25	1.69 ± 2.38 µm	0.61 ± 1.91 µm
4w	20	3.51 ± 4.21 µm	1.58 ± 1.98 µm
8w	14	5.78 ± 7.29 µm	0.06 ± 2.89 µm
24w	8	0.27 ± 4.39 µm	1.24 ± 1.34 µm

Tabelle 1: Durchschnittliche Differenz aus rechtem und linkem Auge von zum einen Dicke der inneren Netzhaut (IRT) und zum anderen Dicke der äußeren Netzhaut (ORT)

Wird ein einziger Mittelwert aus den Differenzen für die gesamte innere (IRT) oder äußere Netzhaut (ORT) gebildet, lässt sich in einer einfachen Übersichtstabelle repräsentativ zeigen, dass zu keinem der Messzeitpunkte (12h, 2w, 4w, 8w, 24w nach Beendigung der Therapie) ein signifikanter Unterschied zwischen OS und OD vorliegt (KI 95%, Anwendung der Bonferroni-Korrektur).

3.2.12 Krankheitsverlauf: Dicke der äußeren Netzhaut im Verlauf

Die Messung der äußeren Netzhaut zeigt eine massive Abnahme um ca. 40% schon zum ersten Messzeitpunkt 12 Stunden nach Therapieende, an beiden Augen in ähnlichem Ausmaß. Die Dicke bleibt über den gesamten Versuchszeitraum relativ stabil, zeigt also keine signifikanten Veränderungen, lediglich zum fünften Messzeitpunkt ist eine leicht abnehmende Tendenzfeststellbar, welche sich jedoch innerhalb der Standardabweichung befindet (s. Tabelle 2, Abb. 17).

	MZ1	MZ2	MZ3	MZ4	MZ5
OS	60,5622188	64,2580591	64,2351057	63,5337122	55,92
SD	9,72443929	11,6561483	14,1762423	18,0043573	12,41
OD	59,9498199	63,6512311	62,6511555	63,4717154	57,158314
SD	10,3581268	11,8945402	14,577476	16,5227536	12,6115112

Tabelle 2: Dicke der äußeren Netzhaut im Verlauf

Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Dicke der äußeren Netzhaut im Verlauf auf, jeweils für das unbehandelte Auge (OS) und das behandelte Auge (OD). Die Werte sind gegenüber dem Wildtyp von Beginn an deutlich reduziert und bleiben während des gesamten Versuchs weitestgehend stabil (MZ1:12h, MZ2:2w, MZ3:4w, MZ4:8w, MZ5:12w nach Beendigung der Therapie, n= 27-8).

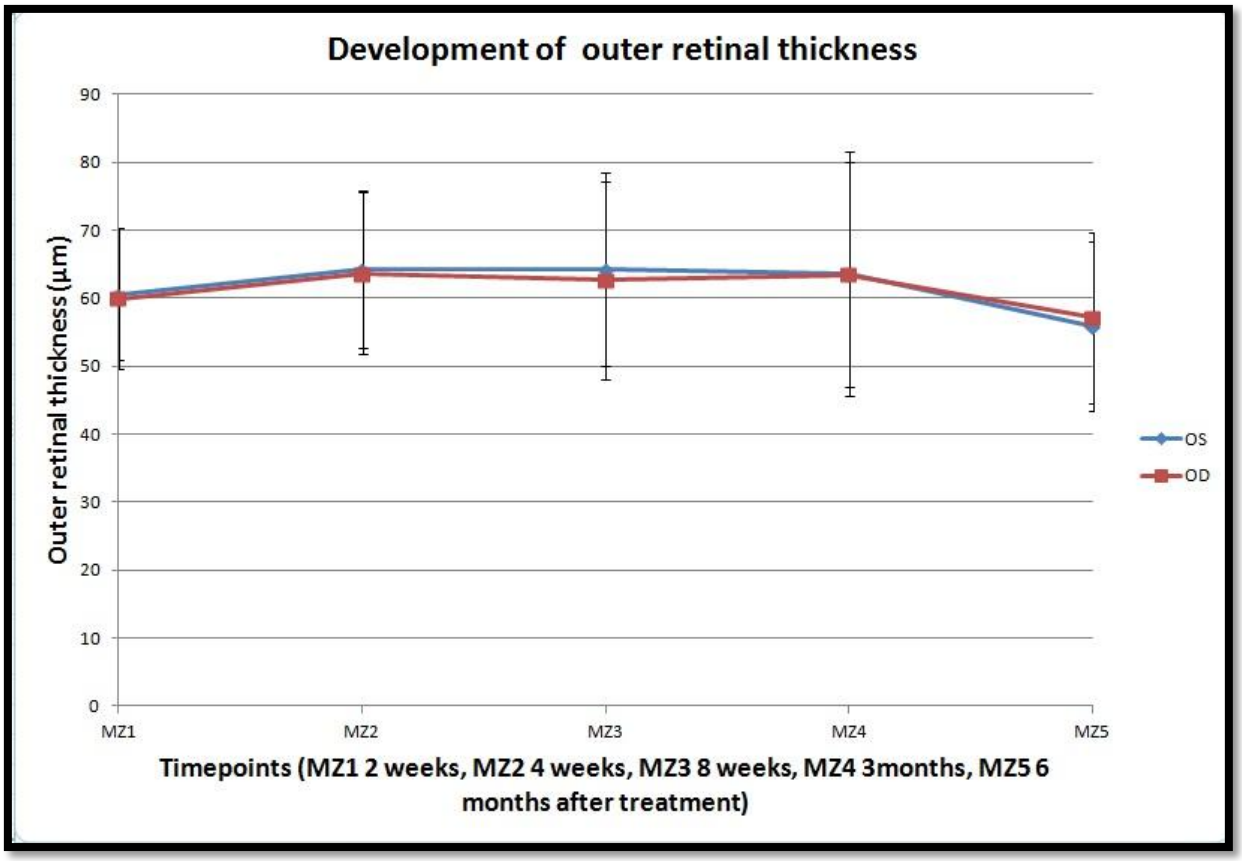


Abbildung 21: Dicke der äußeren Netzhaut im Verlauf

Die Grafik zeigt die Durchschnittswerte für die Dicke der äußeren Netzhaut im Verlauf auf, jeweils für das unbehandelte Auge (blau) und das behandelte Auge (rot). Die Werte bleiben während des gesamten Versuchs weitestgehend stabil (n= 27-8).

3.2.13 Korrelation von hyperfluoreszenten Bereichen der Netzhaut mit Veränderungen in den OCT-Schnittbildern

Die Lage des OCT-Schnittbildes auf der Netzhaut ist auf einer parallel angezeigten Echtzeit SLO-Übersicht manuell bestimmbar. Um einen Hinweis auf den Ursprung der Hyperfluoreszenz zu erhalten, wurden im Autofluoreszenz/OCT-Modus Scans genau über den hyperfluoreszenten Bereichen erstellt. Kleinere Flecken fanden sich in punktförmigen Verdichtungen in der inneren nukleären Schicht der Netzhaut wieder, also dort, wo auch die Schisis vorwiegend auftritt. Hier wurde das Ausmaß des interindividuellen Unterschieds beim Verlauf der XLRSh1 deutlich, denn die Ausprägung der Hyperfluoreszenz unterschied sich merklich von Versuchstier zu Versuchstier, kaum je-

doch innerhalb ein und desselben Versuchstiers. Bei manchen Versuchstieren zeigten sich die Hyperfluoreszenzen in größeren Flecken akkumuliert. Dort imponierten die Verdichtungen in den OCT-Scans mit rosettenähnlicher Anordnung, die alle Schichten der äußeren Retina involvierten, wie kürzlich auch in einem anderen Mausmodell mit degenerativer Netzhauterkrankung beschrieben. (33) In zwei Fällen konnten außerdem regelrechte Verklumpungen von Gewebe beobachtet werden, die sich durch starke, großfleckig hyperfluoreszente Bereiche im SLO-Bild und Signalen starker Gewebsverdichtung im entsprechenden OCT-Bild auszeichneten. Sie entspringen scheinbar der äußeren plexiformen Schicht und dehnen sich über mehrere Schichten aus (Abb. 22).

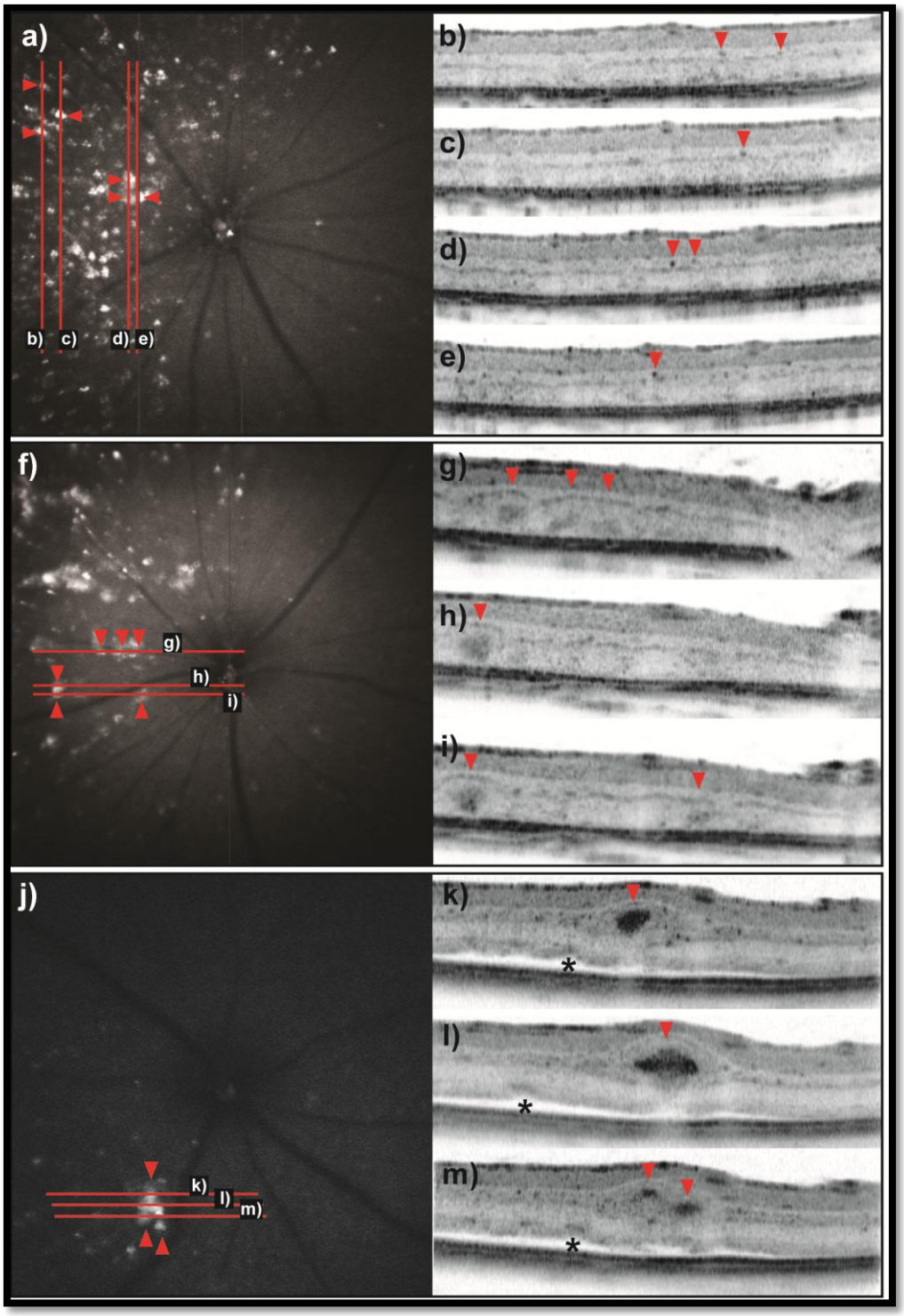


Abbildung 22: Korrelation von hyperfluoreszenten Bereichen der Netzhaut mit Veränderungen in den OCT-Schnittbildern

Bereiche erhöhter Autofluoreszenz (links im Bild) zeigen in den OCT-Schnittbildern (rechts im Bild) korrelierende Veränderungen von punktweise erhöhter Gewebsdichte in der inneren Körnerschicht (a-e) über rosettenförmige Verdichtungen, die sich über alle Schichten der äußeren Netzhaut erstrecken können (f-i), bis hin zu massiven Gewebsverklumpungen begleitet von lokaler Ablösung der Netzhaut (j-m,*).

3.3 Histologische Untersuchungen

3.3.1 Histochemische Untersuchung

Zu jedem Messzeitpunkt wurden jeweils zwei Versuchstiere für die histologische Aufarbeitung und standardmäßige lichtmikroskopische Untersuchung geopfert. Die Netzhautschnitte wurden in temporal-nasaler Richtung auf Höhe des Sehnervenkopfes angefertigt und sind somit direkt mit den OCT-Aufnahmen vergleichbar. Die histologische Untersuchung wurde stichprobenweise und an einer statistisch nicht relevanten Anzahl durchgeführt. Sie diente lediglich dem Zwecke der Orientierung und der bedarfsabhängigen Betrachtung spezieller Befunde. Auch ist eine Beurteilung der Veränderung der Struktur im Verlauf der Zeit aufgrund der hohen interindividuellen Varianz im Krankheitsprogress der XLRSh1 hier nicht möglich, da zu jedem Untersuchungszeitpunkt andere Versuchstiere geopfert werden mussten, was in der Natur der Sache liegt. Umgekehrt haben die histologischen Untersuchungen wiederum auch im vorliegenden Versuch diese Charakteristik der XLRSh1 bestätigt. Zu späteren Messzeitpunkten fanden sich teilweise Befunde besserer retinaler Struktur als zum ersten. Die Befunde in OD und OS waren jedoch durchgängig von annähernd gleichem Schweregrad, sodass sich auch an dieser Stelle keinen Hinweis auf einen therapeutischen Effekt des Dorzolamids ergibt. In den histologischen Schnitten wurde die Desorganisation vor allem der Netzhautschichten der äußeren Netzhaut und die Migration von Zellen des ONL über die OLM in den Bereich der Photorezeptorschicht als Folge der Photorezeptordegeneration, wie für die XLRSh1 charakteristisch, deutlich (Abb. 24). Ansatzweise sind Pseudozysten als Zeichen der Schisis zu erkennen. Für den direkten Vergleich ist im Folgenden der histologische Schnitt der Netzhaut einer gesunden Maus abgebildet (Abb. 23).

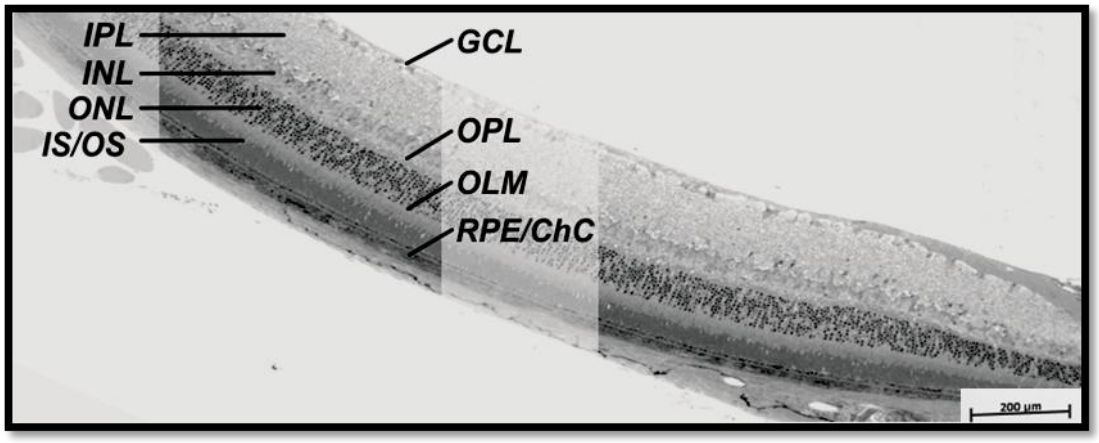


Abbildung 23: Histologischer Schnitt durch die Netzhaut einer Wildtyp-Maus

Der Schnitt ist auf Höhe des Sehnervenkopfes und in seiner direkten Nähe angefertigt. Die verschiedenen Schichten der Netzhaut lassen sich klar voneinander abgrenzen (RPE: Retinal Pigment Epithelium, IS: Inner Segment, OS: Outer Segment, OLM: Outer Limiting Membrane, ONL: Outer Nuclear Layer, OPL: Outer Plexiform Layer, INL: Inner Nuclear Layer, IPL: Inner Plexiform Layer, GCL: Ganglion Cell Layer).

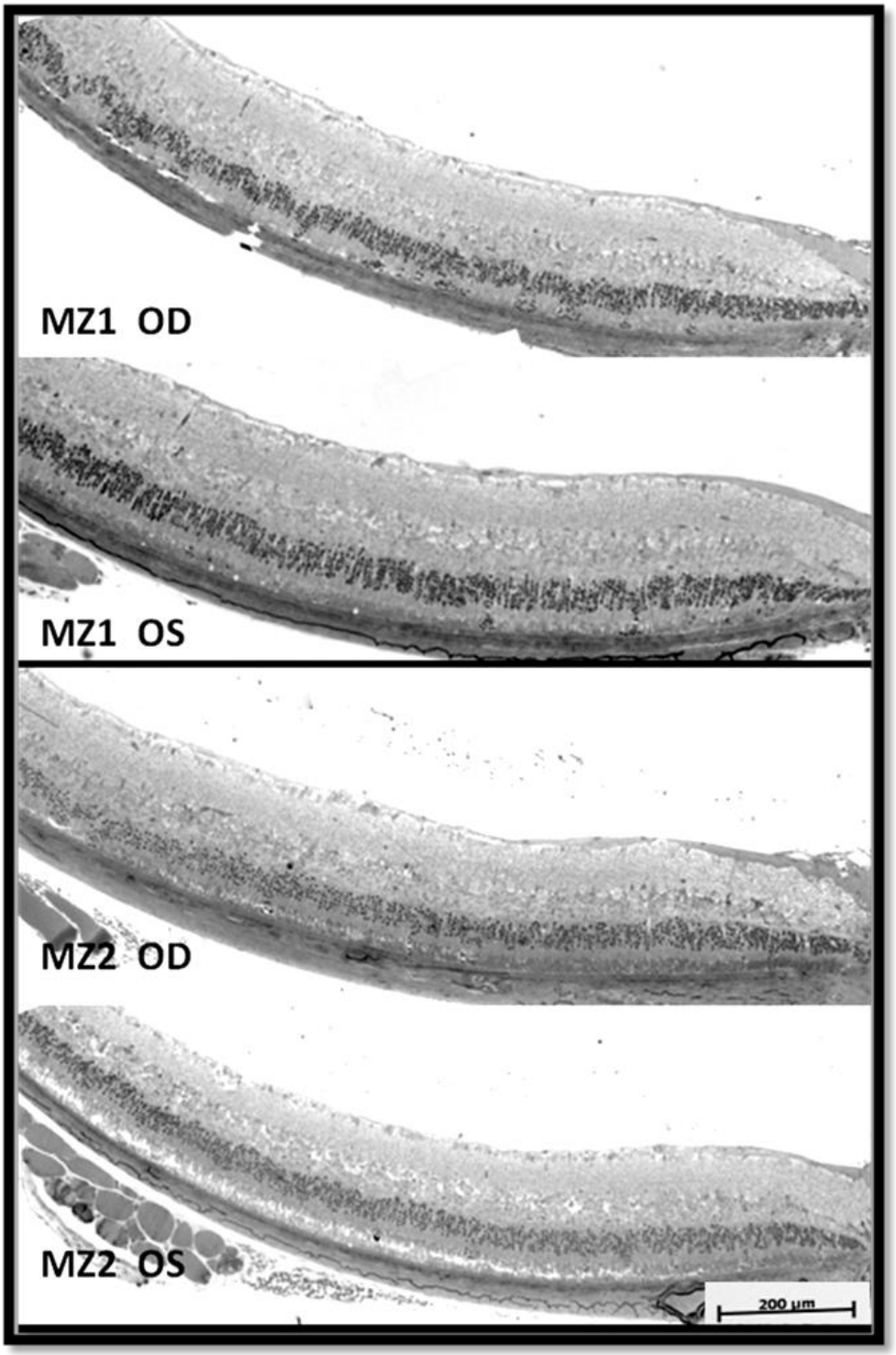


Abbildung 24: Histologische Schnittbilder durch die Netzhäute von *Rs1h*$^{-/y}$-Mäusen

Zu sehen sind histologische Schnittbilder durch die Netzhäute von *Rs1h*$^{-/y}$-Mäusen 12h nach Therapie (MZ1) und zwei Wochen später (MZ2) in direkter Nähe zum Sehnervenkopf (im Bild nicht zu sehen), jeweils Netzhäute von behandeltem (OD) und unbehandeltem Auge (OS) im Vergleich. Es lässt sich eine Schisis in der inneren Körnerschicht vermuten (nicht eindeutig vom Artefakt abzugrenzen). Als deutliches Zeichen der Desorganisation der Netzhautschichten treten die Zellen der äußeren Körnerschicht über die äußere Grenzmembran und in die Photorezeptorschicht über.

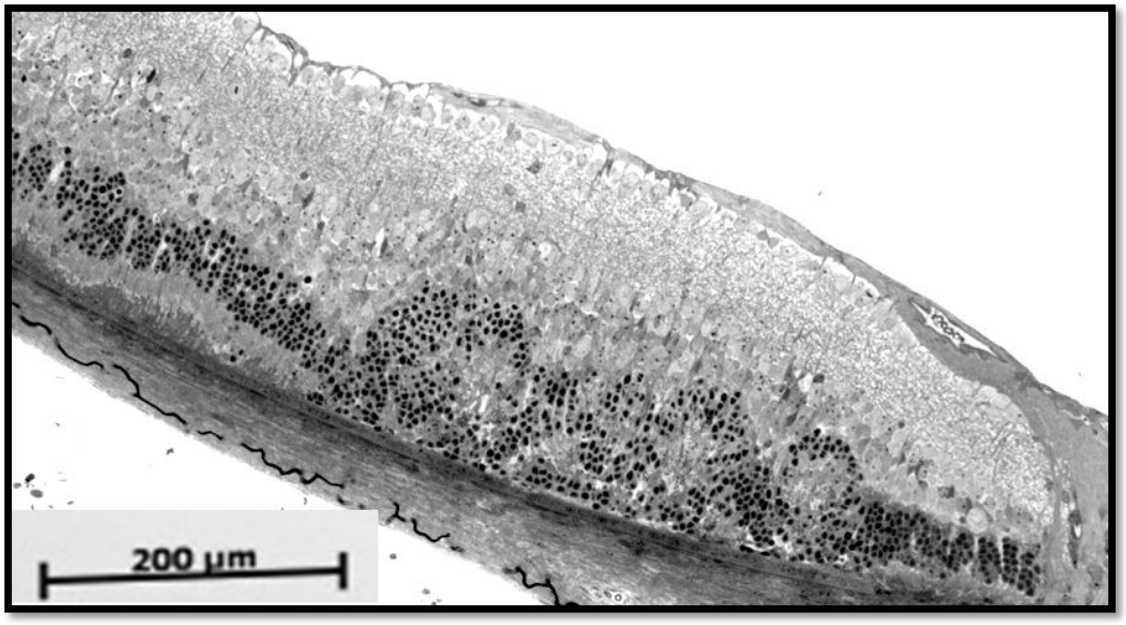


Abbildung 25: Histologischer Schnitt durch die Netzhaut einer *Rs1h*$^{-/y}$-Maus

Höhere Vergrößerung: Als deutliches Zeichen der Desorganisation der Netzhautschichten treten die Zellen der äußeren Körnerschicht über die äußere Grenzmembran und in die Photorezeptorschicht über. Die Photorezeptorschicht scheint in diesem Bereich bereits stark degeneriert (Alter des Versuchstieres: 4 Wochen).

3.3.2 Immunohistochemiche Untersuchung

Nachdem die Auswertung der OCT- und SLO-Befunde eine auffällige Verteilung der Schisis und der hyperfluoreszenten Veränderungen in der Netzhaut gezeigt hat, wurde eine immunohistochemische Untersuchung durchgeführt, um Hinweise auf mögliche Ursachen für diese Verteilung zu erhalten. Am ehesten wurde dabei ein Zusammenhang zu der in der murinen Netzhaut charakteristischen Verteilung der Zapfenphotorezeptoren vermutet. Die murine Netzhaut verfügt nicht über einen besonderen Bereich hoher Zapfenkonzentration wie in der Makula des Menschen, jedoch über eine spezielle Verteilung der verschiedenen Zapfentypen. Während die Blau-Zapfen stärker in der inferioren Hälfte der Netzhaut vertreten sind, sind die Rot-Grün-Zapfen stärker in der superioren Hälfte der Netzhaut lokalisiert. (34) Demzufolge wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Rot-Grün-Zapfen von der *XLRSh1* stärker betroffen sein könnten. Die histologische Untersuchung zum letzten Messzeitpunkte, also im Versuchstieralter von 7 Mo-

naten, bestätigte die natürliche Verteilung der verschiedenen Zapfen in der murinen Netzhaut (Abb. 26 g-l) und ebenfalls den Untergang von Photorezeptorzellen, lieferte dabei jedoch keine Hinweise auf eine erhöhte Anfälligkeit von Rot-Grün-Zapfen im Vergleich zu Blau-Zapfen (Abb. 26 a-f).

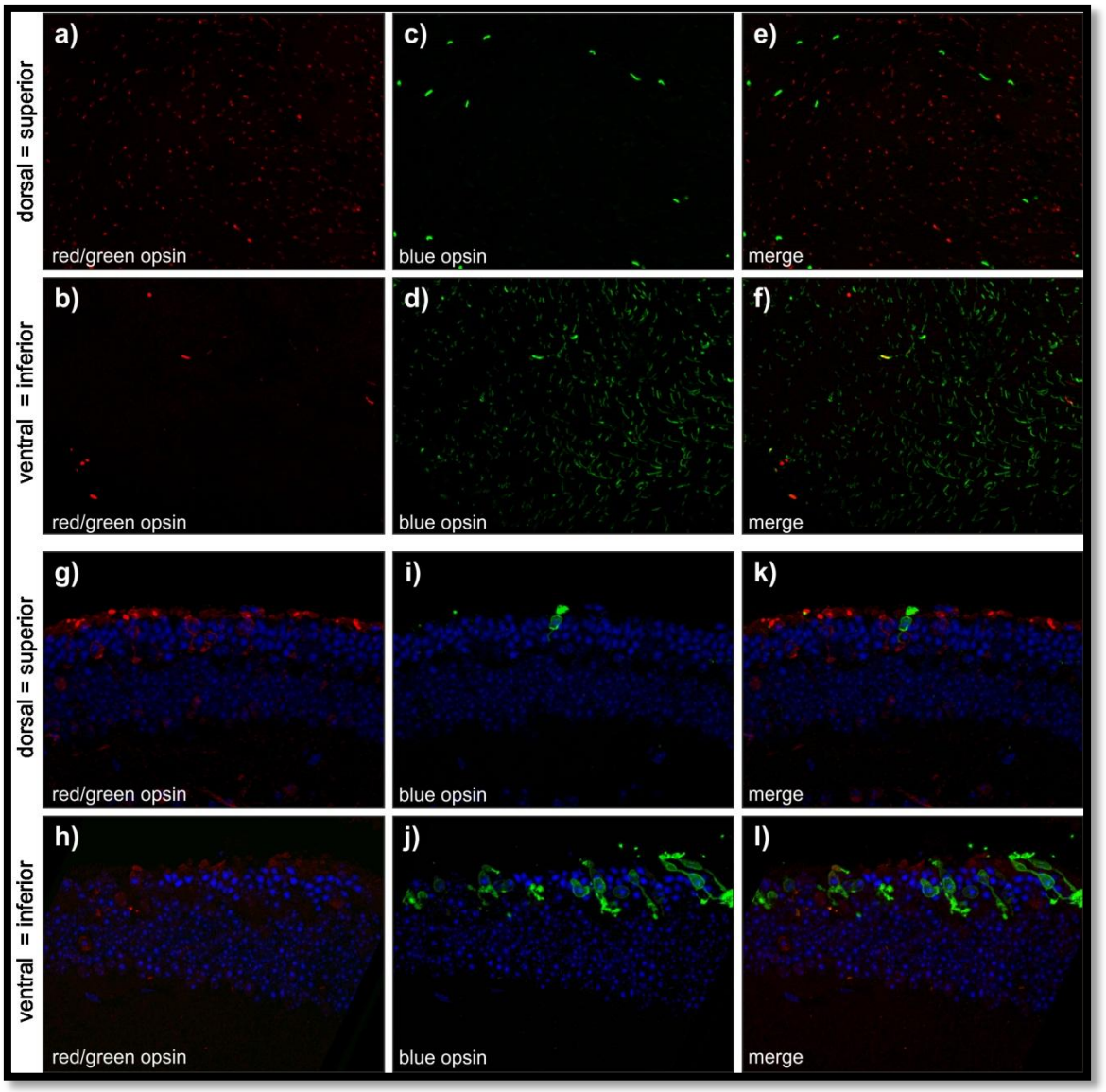


Abbildung 26: Immunohistologisches Labeling von Wholemounts und Kryoschnitten

Immunohistologisches Labeling von Wholemounts (a-f) und Kryoschnitten (g-l): In der ersten Spalte (a, b, g, h) sind jeweils nur die Rot-Grün-Zapfen angefärbt (rot), in der zweiten Spalte (c, d, i, j) nur die Blauzapfen (grün). Die dritte Spalte (e, f, k, l) zeigt eine Überlagerung der entsprechenden Bilder aus der ersten und zweiten Spalte. Rot-Grün-Zapfen treten in der murinen Retina natürlicherweise verstärkt superior (a) und Blau-Zapfen verstärkt inferior auf (d). Es gibt keinen Hinweis auf einen verstärkten Untergang von Rot-Grün-Zapfen in der superioren Hemiretina (e, k) im Vergleich zum Untergang von Blauzapfen in der inferioren Hemiretina (f, l).

3.4 ERG-Analyse – Funktionelle Veränderungen der Netzhaut bei der *Rs1h*$^{-/y}$-Maus

Die Elektroretinographie (ERG) wurde zum ersten Messzeitpunkt (4 Wochen nach Therapieende) an 10 Versuchstieren und zum zweiten Messzeitpunkt (8 Wochen nach Therapieende) an 5 verbleibenden dieser Versuchstiere durchgeführt. Die Methode ist zwar sehr sensitiv und daher aussagekräftig, gleichzeitig aber auch hochgradig störungsanfällig. Deshalb sind nicht immer alle 10 oder für die spätere Untersuchung 5 Messungen für eine Mittelung und statistische Auswertung geeignet. Dieser Sachverhalt ist jedoch in diesem Versuchssetting nicht von entscheidender Relevanz, da das Ziel nicht die Charakterisierung der Rs1h$^{-/y}$-Maus ist, wie bereits veröffentlicht (11, 13), sondern die Evaluation des Effekts von Dorzolamid auf das behandelte rechte Auge im Vergleich zum unbehandelten linken. Es wird nicht von einer Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Strukturanalyse und den Ergebnissen der Funktionsanalyse ausgegangen, da der Funktionsverlust in der Netzhaut der Rs1h$^{-/y}$-Mäuse am ehesten als eine Folge der Strukturveränderung betrachtet werden muss. Die ERG-Untersuchung liefert Informationen über den Zustand der Stäbchenfunktion (dunkeladaptiert/skotopisch), der Zapfenfunktion (hell-adaptiert/photopisch) und der Signalvermittlung innerhalb der Netzhaut. Eine erste Betrachtung (Abb. 27) skotopischer Messungen an einem Versuchstier 4 Wochen nach Therapieende zeigt die für die XLRS typische Abnahme der b-Wellenamplituden im Vergleich zum Wildtyp (a-Wellenamplitude > b-Wellenamplitude; „negatives ERG“).

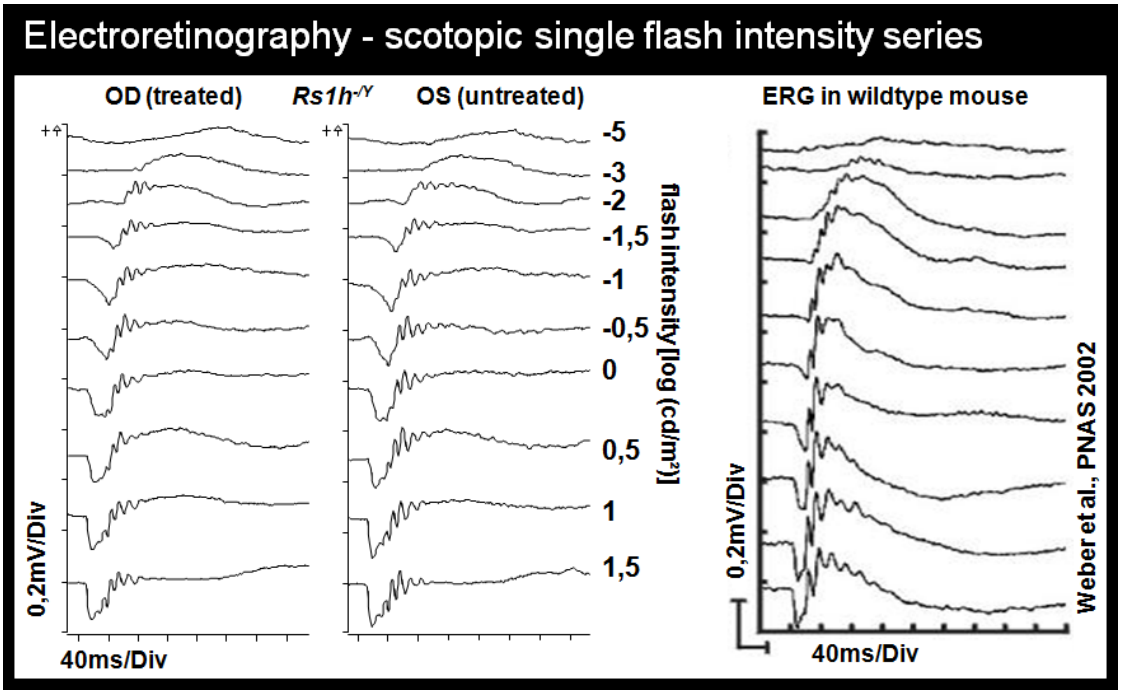


Abbildung 27: Elektroretinographie von *Rs1h*$^{-/y}$- vs. Wildtypmaus

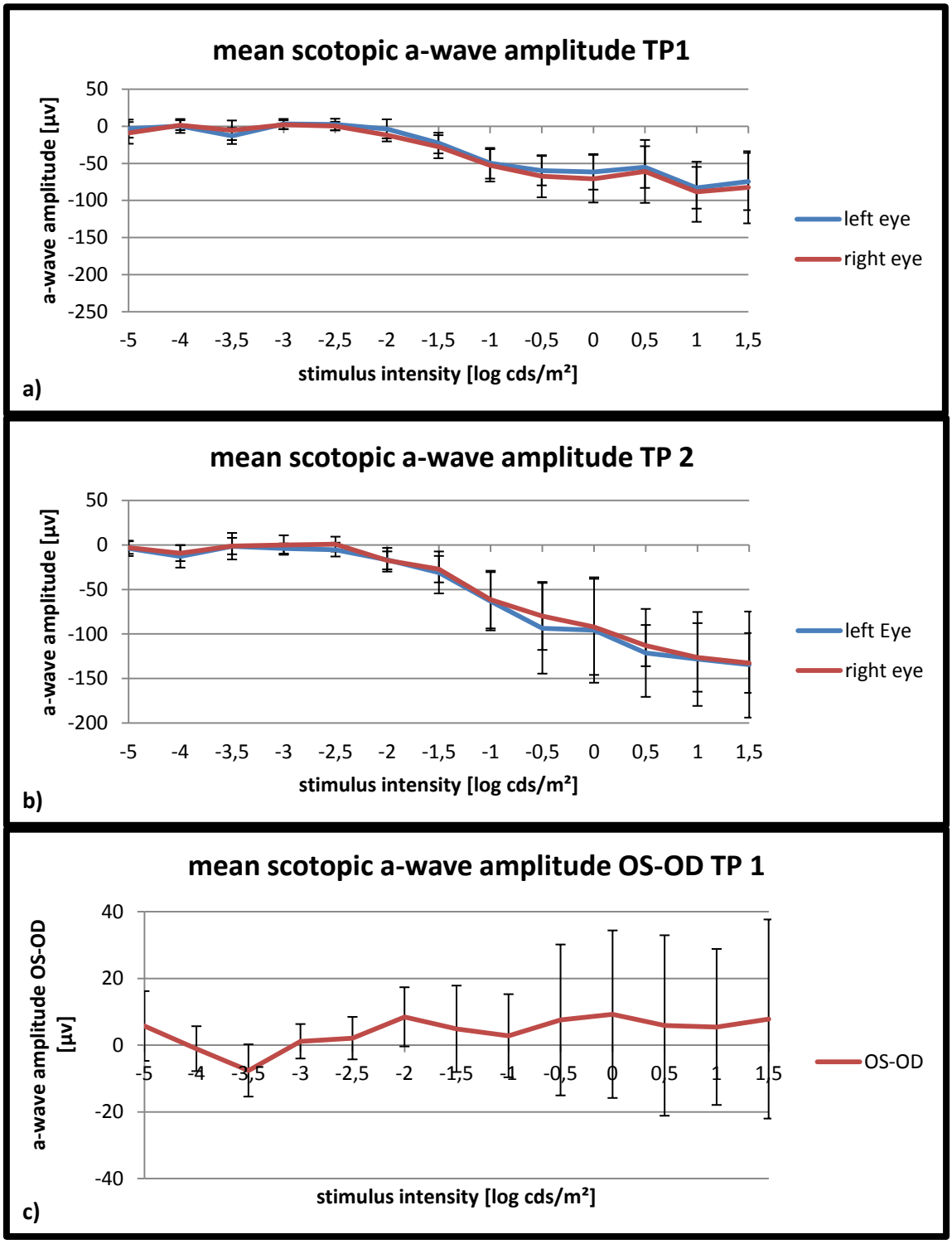
Elektroretinographie einer Rs1h-/y-Maus 4 Wochen nach Ende der Therapie und im Vergleich dazu eine Wildtyp-Messung rechts im Bild: Aufgetragen sind Messungen im dunkeladaptierten Zustand bei Lichtintensitäten von -5 bis 1,5 log(cd/m2). Es zeigen sich im Vergleich zum Wildtyp deutlich verkleinerte Amplituden („negatives ERG"), jedoch kein Hinweis auf einen Unterschied zwischen behandeltem (OD) und unbehandeltem (OS) Auge.

3.5 Skotopische Untersuchung

Das Elektroretinogramm besteht im Wesentlichen aus einer negativen a-Welle, welche die Funktion der Photorezeptoren wiederspiegelt, und aus einer positiven b-Welle, welche insbesondere die Transmission der Photorezeptorsignale aus der äußeren Netzhaut über On-Bipolar- und Müller-Zellen in die innere Netzhaut auf die Ganglienzellen aufzeigt. Zwei Hauptgrößen geben objektive Auskunft über die Restfunktion der Photorezeptoren. Zum einen die jeweilige Amplitude der a- oder b-Welle, welche vor allem durch die Anzahl reaktiver Zellen bestimmt wird, zum anderen die Latenzzeit vom Auslösen des Lichtblitzes bis zum Erreichen der jeweiligen Amplitude, die sogenannte „implicite time". Sie kann als Indikator für die Funktionalität der verbleibenden Zellen betrachtet werden. Die skotopische Messung wird nach 12-stündiger Dunkeladaptation und bei Lichtintensitäten von unter 3cds/m² durchgeführt. Somit wird eine isolierte

Stäbchenantwort generiert. Die Ergebnisse liefern keinen signifikanten Unterschied zwischen behandeltem (OD) und unbehandeltem Auge (OS). Es gibt keinen Hinweis auf einen die Funktion der Stäbchen verbessernden Effekt des Dorzolamids (Abb. 28, 29).

3.5.1 a- und b-Wellen-Amplituden



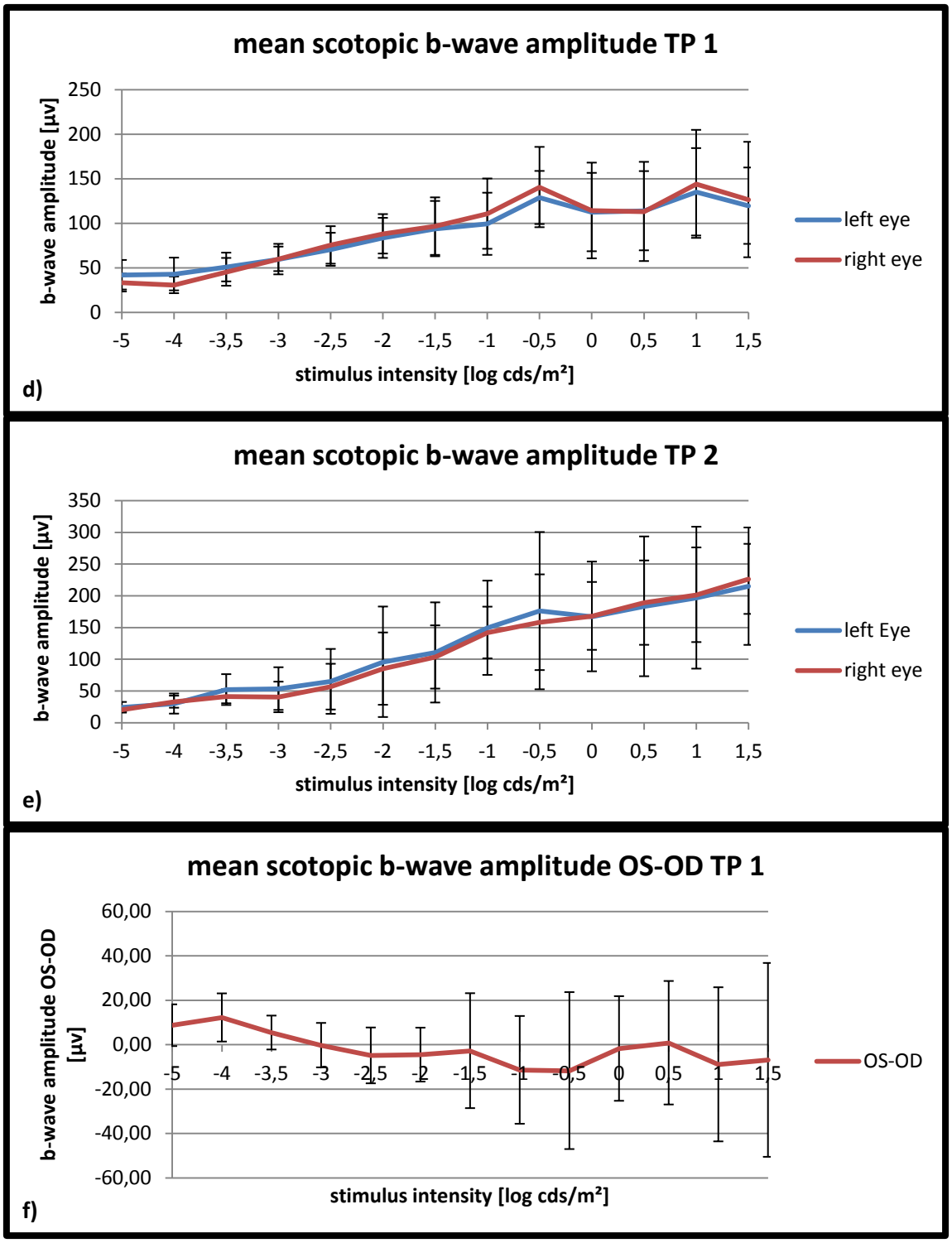
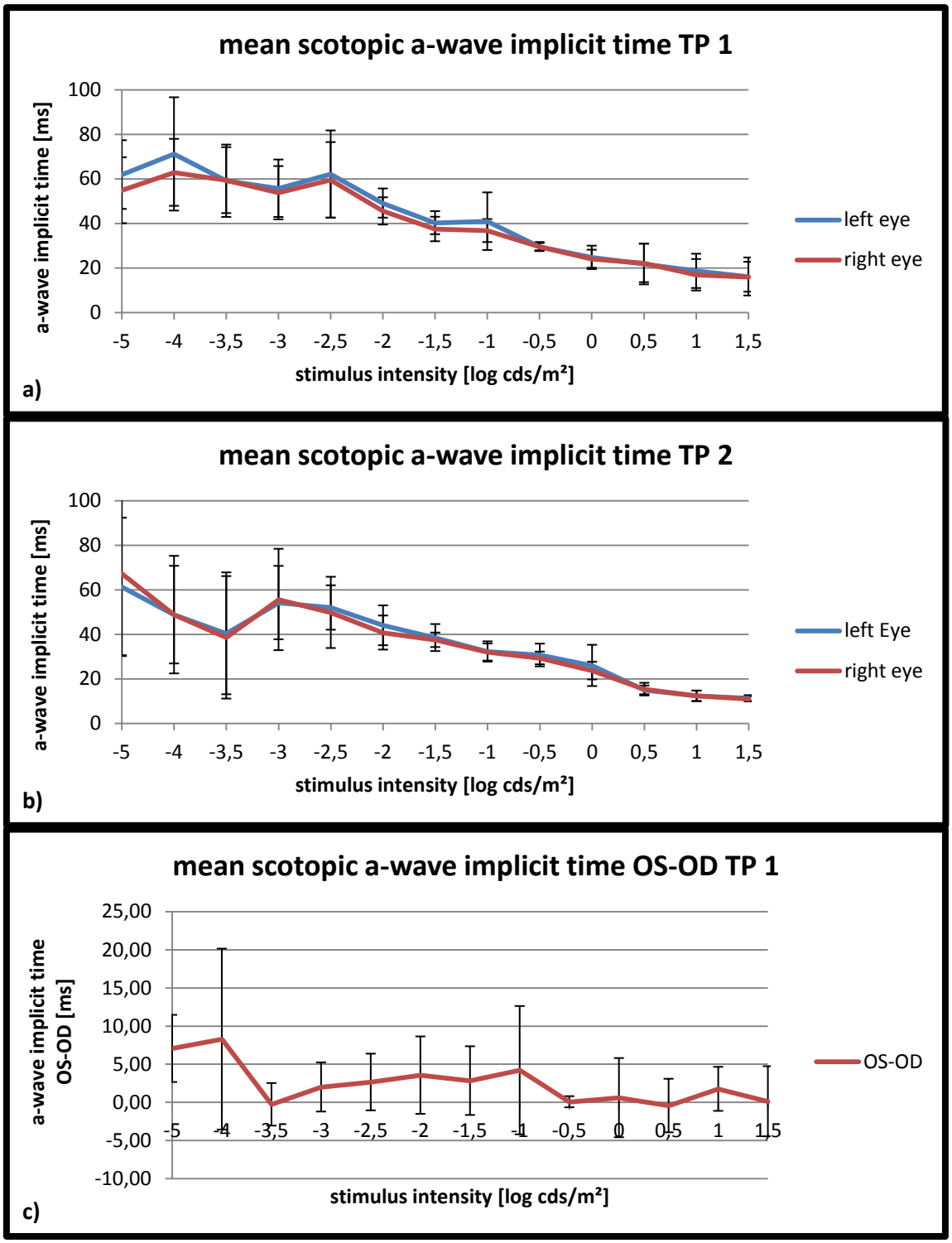


Abbildung 28: a- und b-Wellen-Amplituden skotopischer Untersuchungen

Die Auswertung der skotopischen a-Wellen-Amplituden (a,b) und b-Wellen-Amplituden (d,e) zeigt weder 4 Wochen (TP1: n=2-10) noch 8 Wochen (TP2: n=1-5) nach Therapieende signifikante Unterschiede zwischen behandeltem (OD, rot) und unbehandeltem Auge (OS, blau). Die Berechnung der jeweiligen Differenzen aus Werten für linkes und rechtes Auge bestätigt dies noch einmal, hier jeweils exemplarisch für den ersten Messzeitpunt (c, f).

3.5.2 a- und b-Wellen-Latenzzeit



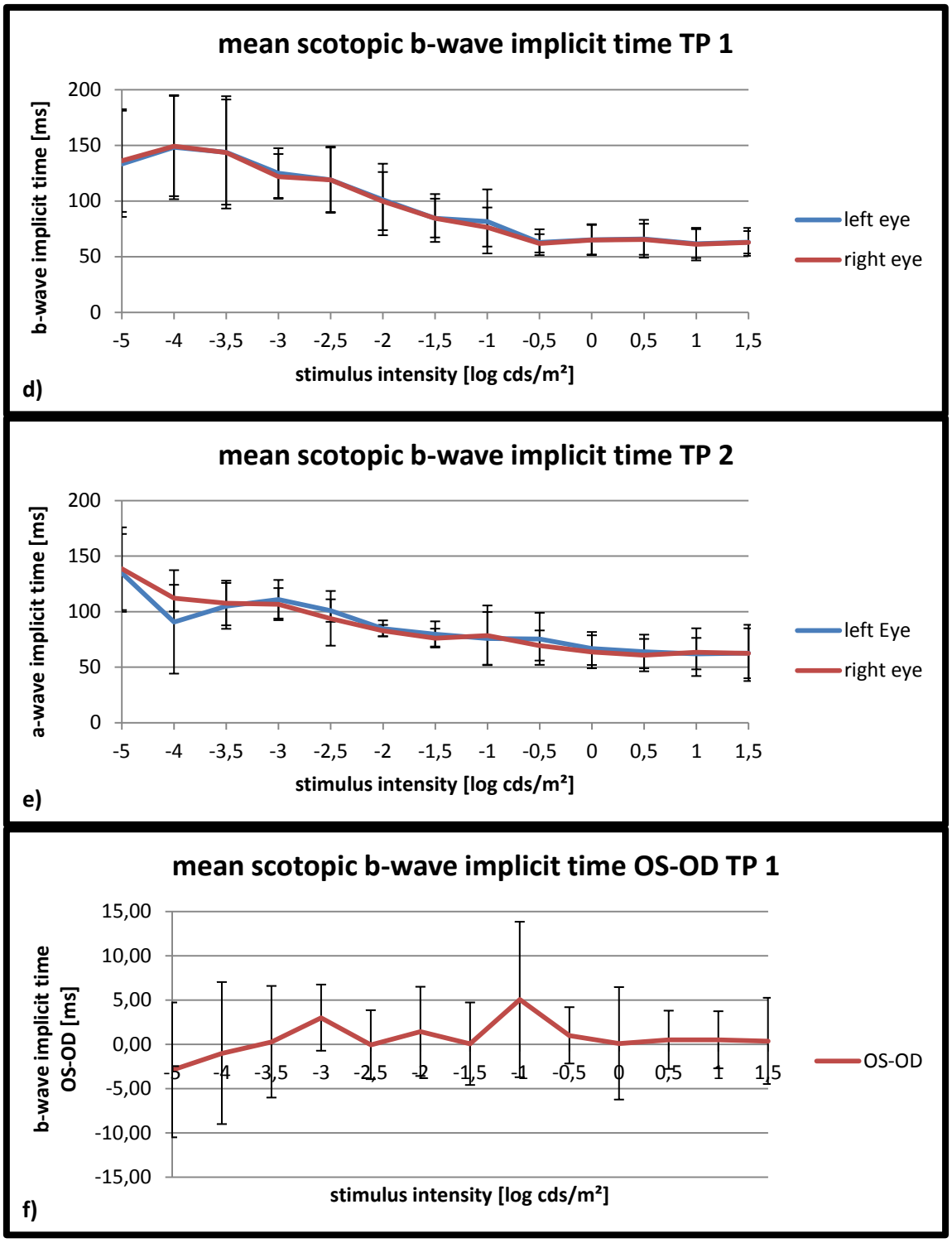


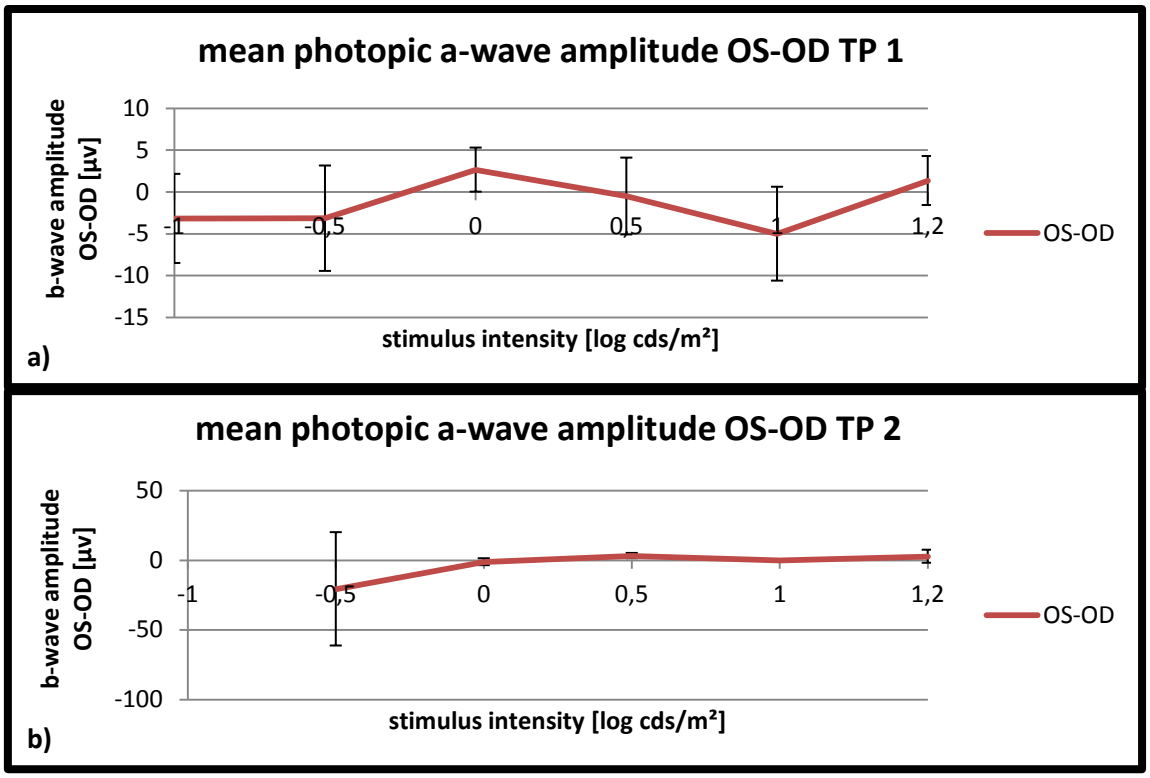
Abbildung 29: A- und b-Wellen-Latenzzeit skotopischer Untersuchungen

Die Auswertung der skotopischen a-Wellen-Latenzzeit (a,b) und b-Wellen-Latenzzeit (d,e) zeigt weder 4 Wochen (TP1, Mittelung aus 2-10 Versuchstieren) noch 8 Wochen nach Therapieende (TP2, Mittelung aus 1-5 Versuchstieren) signifikante Unterschiede zwischen behandeltem (OD, rot) und unbehandeltem Auge (OS, blau). Die Berechnung der jeweiligen Differenzen aus Werten für linkes und rechtes Auge bestätigt dies noch einmal, hier jeweils exemplarisch für den ersten Messzeitpunkt (c, f).

3.6 Photopische Untersuchung

Die photopische Messung wurde bei Lichtintensitäten von 0,1 cds/m² bis 15 cds/m² und bei durchgehender Hintergrundbeleuchtung durchgeführt. Somit konnte eine signifikant isolierte Zapfenantwort generiert werden. Auch hier stellen sich die Amplituden XLRSh-spezifisch verkleinert und die Latenzzeiten verkürzt dar. (11) Unterschiede sind bei den reduzierten Messwerten noch schwieriger von der Standardabweichung abzugrenzen. Die natürliche Varianz fällt hier zudem noch stärker ins Gewicht. (30, 31) Dabei wird die Detektion der Signale störanfälliger und die Anzahl verwertbarer Messungen sinkt. Bei kleinem n kommt es zusätzlich zu verhältnismäßig hohen Standardabweichungen. Die Ergebnisse erlauben dennoch die Schlussfolgerung zu fehlendem Unterschied zwischen behandeltem (OD) und unbehandeltem (OS) Auge. Es gibt keinen Hinweis auf einen die Funktion der Zapfen verbessernden Effekt des Dorzolamids. (Abb. 30, 31)

3.6.1 a- und b-Wellen-Amplituden



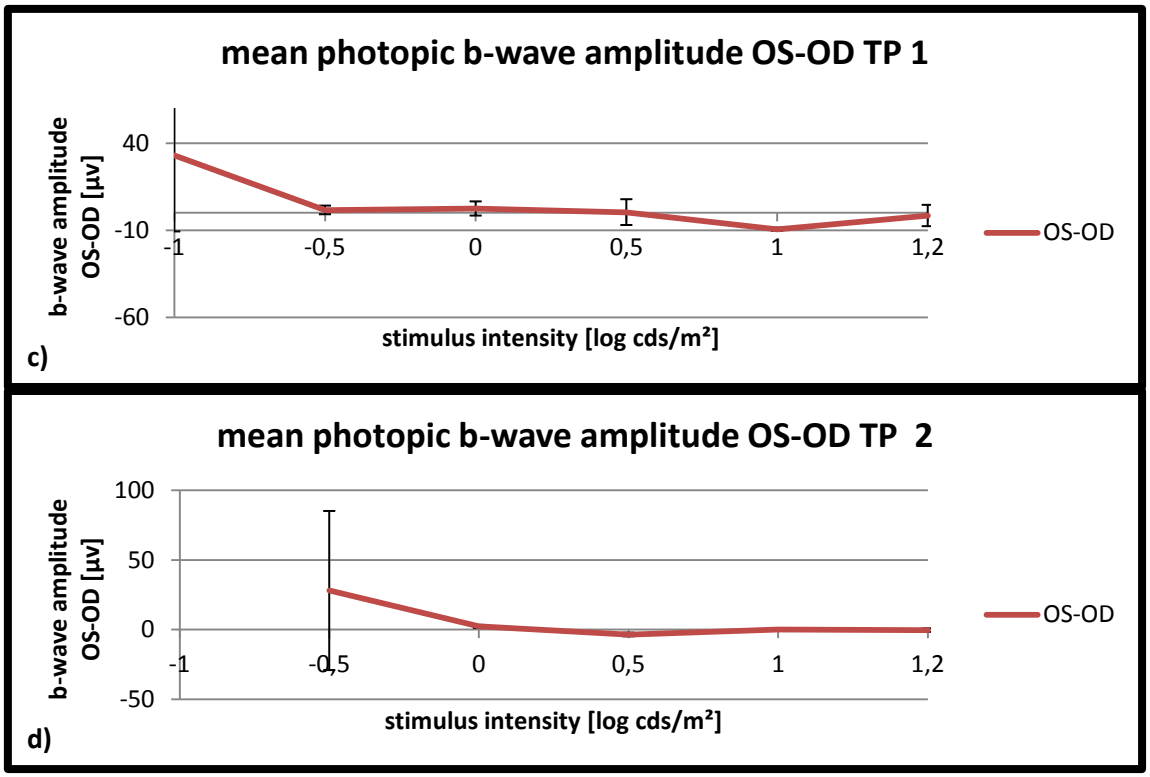
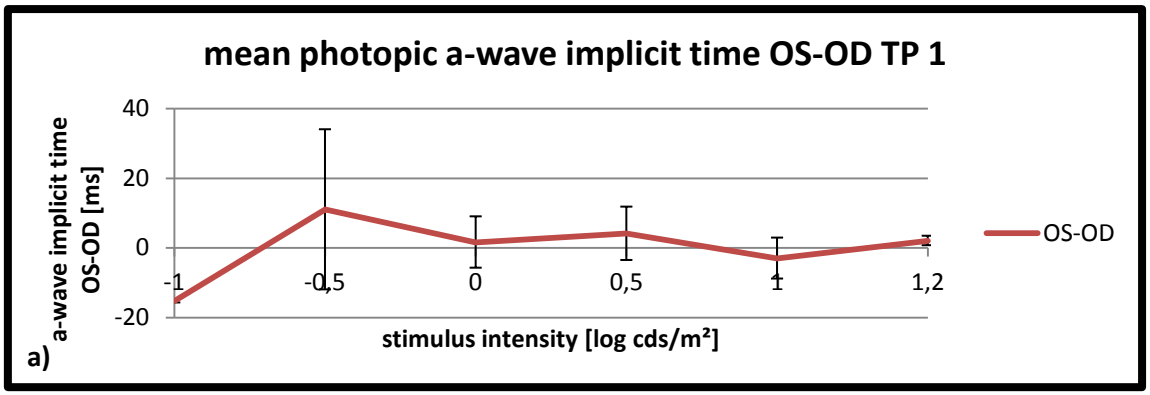


Abbildung 30: a- und b-Wellen-Amplituden photopischer Untersuchungen

Die Auswertung der photopischen a-Wellen Amplituden (a,b) und b-Wellen-Amplituden (d,e) zeigt weder 4 Wochen (TP1: n=2-10) noch 8 Wochen nach Therapieende (TP2: n=0-5) signifikante Unterschiede zwischen behandeltem (OD) und unbehandeltem Auge (OS). Dargestellt sind jeweils die Differenzen aus den entsprechenden Werten für linkes und rechtes Auge. Vereinzelt treten wegen reduziert verwertbarem n starke Standardabweichungen auf.

3.6.2 a- und b-Wellen-Latenzzeit



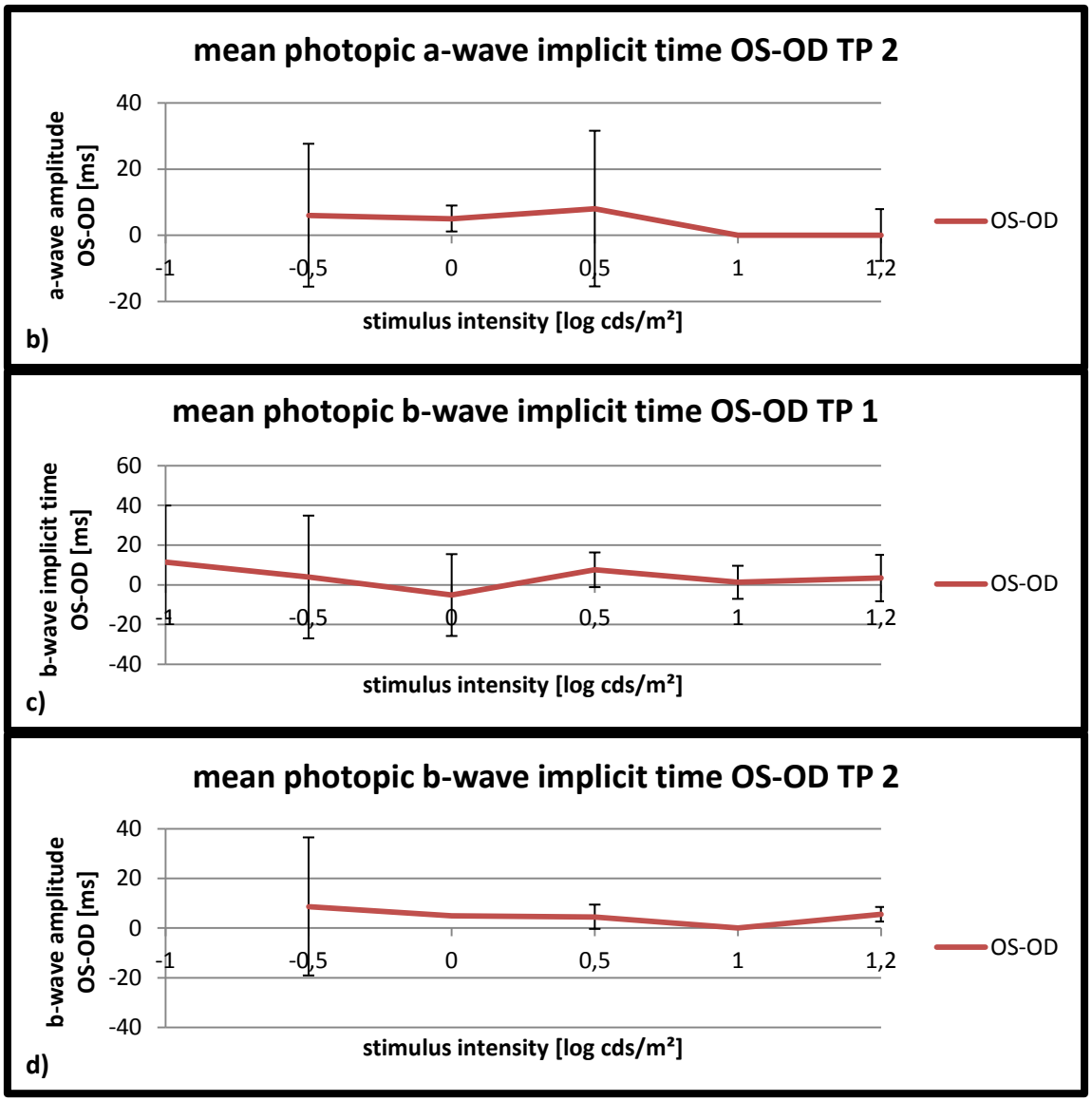


Abbildung 31: a- und b-Wellen-Amplituden photopischer Untersuchungen

Die Auswertung der photopischen a-Wellen-Latenzzeiten (a,b) und b-Wellen-Latenzzeiten (d,e) zeigt weder 4 Wochen (TP1: n=2-10) noch 8 Wochen nach Therapieende (TP2: n=0-5) signifikante Unterschiede zwischen behandeltem (OD) und unbehandeltem Auge (OS). Dargestellt sind jeweils die Differenzen aus den entsprechenden Werten für linkes und rechtes Auge. Vereinzelt treten wegen reduziert verwertbarem n starke Standardabweichungen auf.

4. Diskussion

4.1 Synopsis und klinische Relevanz

Degenerative Netzhauterkrankungen beeinträchtigen die betroffenen Patienten in hohem Maße. Der schleichende Verlust des Sehvermögens führt häufig auch zum Verlust, ein unabhängiges Leben führen zu können, was gerade von Jugendlichen nur sehr schwer akzeptiert wird. Es gibt bereits einige Therapieansätze in der Forschung, welche die Patienten hoffen lassen, aktuell gibt es jedoch noch keine Therapie für die klinische Anwendung. Die Idee für den vorliegenden Versuch ist auf der Grundlage vorheriger Veröffentlichungen zu meist retrospektiven Studien entstanden. Die Literatur lieferte plausible Erklärungen für die mögliche Wirksamkeit von Carboanhydrasehemmern bei der XLRS und positive Ergebnisse von vereinzelten Fallstudien. Die Evidenzklasse dieser Studien reicht allerdings nicht aus, um den Patienten diese Therapie nachdrücklich zu empfehlen. Grund dafür sind Herausforderungen, welche charakteristisch für die Juvenile X-chromosomale Retinoschisis sind und im Folgenden näher erläutert werden. Die XLRS stellt zwar die häufigste Ursache für eine Makuladegeneration bei Jungen und jungen Männern dar, mit einer Prävalenz von ca. 1:15000 bis etwa 1:25000 handelt es sich jedoch um eine seltene Erkrankung, was die Einbindung mehrerer Personen in eine Studie erschwert, wenn die Patienten vergleichbar bezüglich Alter, Bestehensdauer und Fortschritt der Erkrankung sein sollen.. Hinzu kommt, dass die XLRS als wesentliches Charakteristikum von Patient zu Patient starke Unterschiede im Krankheitsverlauf aufweist. Das macht eine prospektive Studie mit menschlichen Probanden, soll sie dasPotential ausreichend statistischer Signifikanz bergen, nahezu unmöglich und die Aussagekraft bestehender Fallstudien bleibt eher schwach. Aber auch bei der Untersuchung des Mausmodells für die XLRS stellt sich die Herausforderung durch interindividuelle Varianz im Krankheitsverlauf, trotz der nunmehr unkomplizierten Verfügbarkeit einer vergleichbaren Kohorte. Allein durch die Verwendung modernster Technik zur in vivo Strukturanalyse, der speziell an die besonderen Größeneigenschaften des Mausauges angepassten optischen Kohärenztomographie, ist eine sinnvolle Begutachtungsmöglichkeit des kurz-, mittel und langfristigen Effektes von Dorzolamid auf die Struktur der Netzhaut bei XLRSh1 möglich geworden. Zusätzlich ist die benötigte, biometrisch er-

mittelte Anzahl an Versuchstieren für signifikante Ergebnisse gegenüber dem Bedarf für die histologische Strukturanalyse massiv reduziert worden. Da sich die interindividuelle Varianz im Krankheitsverlauf nicht auf den Zustand von linkem im Vergleich zu rechtem Auge innerhalb eines Versuchstieres erstreckt, schien es naheliegend, eine einseitige Applikation der Augentropfen je Maus zu wählen, um so die Entwicklung eines behandelten Organs im Verhältnis zur Entwicklung des optimal vergleichbaren, unbehandelten Organs betrachten zu können. Im Rahmen eines Pretests wurde die Verteilung eines Tropfens Fluoreszenzlösung über das Fell oder Barthaare von einem zum anderen Auge und eine systemische Verteilung unter Anwendung der geplanten Applikationsmethode ausgeschlossen (Abb. 2). Histologische Untersuchungen wurden lediglich in einer Subpopulation zur Bestätigung der SD-OCT Ergebnisse durchgeführt. Für die Bewertung der Wirkung von Dorzolamid auf die Funktion der Netzhaut wurde das ERG gewählt. Aufgrund der für die Versuchstiere physisch stark belastenden Messungen wurden diese nur für zwei der fünf Messzeitpunkte festgelegt. Da das ERG als hochsensitive Methode gilt, sollte eine Auswahl an 10 Mäusen für die erste und 5 Mäusen für die zweite Messung ausreichen. Bei der Auswertung der Messergebnisse wurden keinerlei Hinweise auf einen potentiellen Effekt des Dorzolamids gefunden. Vereinzelt vom Durchschnitt stark abweichende Messergebnisse beziehungsweise vereinzelt gänzlich fehlende Messergebnisse führten zu einem nicht immer einheitlichen „n“ bei der statistischen Analyse. Die Gründe dafür wurden sowohl im Methodenteil als auch in der Methodenkritik (s. Kap. 4.3) erläutert.

4.2 Abwägung mit aktueller Literatur

Dorzolamid wurde ursprünglich entwickelt, um durch seine Wirkung am Ziliarepithel bei Glaukompatienten den Augeninnendruck zu senken. (35) Die zusätzliche, hemmende Wirkung auf die zellmembranständige Carboanhydrase vom Typ IV in den RPE-Zellen führt außerdem zu erhöhtem Abtransport von Füssigkeit über die Choroidea. (26, 36) Zahlreiche Studien belegen die Wirksamkeit von Carboanhydrasehemmern und speziell Dorzolamid beim zystoiden Makulaödem verschiedener Ursachen bei Tier und Mensch. (19, 22, 37-41) Der genaue Wirkungsmechanismus ist nicht sicher geklärt; es

wird davon ausgegangen, dass erhöhter aktiver Ionentransport einen osmotisch angetriebenen Wasserabtransport aus der Netzhaut in die choroidalen Gefäße nach sich zieht. Der Effekt dieses Mechanismus ist lediglich bei nichtvaskulären Ursachen für das Makulaödem messbar. (42) Diese Voraussetzung liegt auch bei der XLRS vor, denn die Ursache für die Flüssigkeitsansammlung in den inneren Netzhautschichten ist nicht auf Gefäßpathologien, sondern vermutlich auf Zellfunktionsstörungen, Zelluntergang und Ansammlung von amorphem Material zurückzuführen. (43, 44) Eine häufige Komplikation bei der XLRS stellt die Netzhautablösung dar. (45) Die nebenwirkungsarme Therapie mit Dorzolamid hätte hier gegebenenfalls zusätzlich eine präventive Wirkung. (46) Auf der Basis der Erkenntnis dieser Zusammenhänge sind verschiedene Therapieversuche mit CAI bei XLRS-Patienten durchgeführt worden. Es werden nachfolgend einige davon genauer betrachtet und deren Versuchsaufbau sowie Durchführung mit dem hier vorgestellten Studiendesign verglichen. Es ist zu beachten, dass ein direkter Vergleich nicht vorgenommen werden kann, da die hier vorgestellte Studie die erste und einzige dieser Art am Mausmodell ist.

Apushkin et al. veröffentlichten eine Studie mit eindrucksvollen Ergebnissen. (23) Von acht Patienten, welche über einen Monat dreimal täglich mit Dorzolamid-Augentropfen behandelt wurden, zeigten sieben an mindestens einem Auge eine signifikante Abnahme der Netzhautdicke im Bereich der Fovea. Dieses Ergebnis lieferte die Auswertung von OCT-Aufnahmen. Eine qualitative Beurteilung entsprechender Schnittbilder zeigte ein deutliches Zurückgehen des zystoiden Ödems. Die Zurückführbarkeit der Ergebnisse auf die natürliche Variabilität im Krankheitsverlauf wurde durch vorherige Ermittlung der Test-Retest-Variabilität ausgeschlossen. Bei der OCT-Analyse wurde lediglich die Gesamtdicke gemessen und die Netzhaut nicht in einen inneren und einen äußeren Anteil aufgeteilt. Die Annahme, dass die Reduktion der Netzhautdicke durch Photorezeptordegeneration verursacht sein könnte, ist hier jedoch sehr unwahrscheinlich, da das Sehvermögen, anhand ETDRS-Tafeln gemessen, sich nicht verschlechtert, sondern in vielen Fällen sich gleichzeitig verbessert hat. (ETDRS = Early Treatment Diabetic Retinopathy Study; Methode zur Einschätzung der Sehkraft) Eine andere retrospektive Studie aus dem Jahre 2011 von Khandhadia et al. untersuchten eine Gruppe von vier Patienten (Durchschnittsalter: 14,7 Jahre ± 11,1), bei denen nach mehr als 20-monatiger Dorzolamid-Therapie die Dicke der Makula im OCT-Scan zwar abnimmt (Voruntersu-

chung: 291µm ± 123µm versus Schlussuntersuchung: 352 µm ± 119 µm), das Sehvermögen sich jedoch im Durchschnitt signifikant verschlechtert (0,38 ± 0,25 vs 0,31 ± 0,24 logMAR score, P = 0,041).(47) (logMAR = Logarithm of the minimum angle of resolution; Methode zur Einschätzung der Sehkraft) Diese Studie untersuchte gleichzeitig, ob die Wirkung von Dorzolamid von der Art der Mutation des RS1-Gens abhängig ist. Dabei wurde kein Zusammenhang festgestellt. Vier Probanden decken die Fülle an verschiedenen Mutationen jedoch bei Weitem nicht ab (im Jahre 1998 waren 82; s.(48), im Jahre 2012 sind bereits 191 verschiedene Mutationen registriert; s.(1)). Somit bleibt diese Frage ungeklärt. Auch ob die Probanden bei Apushkin et al. eventuell ganz andere Mutationen aufwiesen und sich deshalb besser für die Therapie eigneten, bleibt ungeklärt, da keine entsprechende Genanalyse zur genauen Bestimmung der Mutationsform durchgeführt wurde. Einen interessanten Ansatz wählten Walia et al., indem sie insgesamt sieben Patienten mit verschiedenen Mutationen in Gruppen unterschiedlicher Pathophysiologien einteilten, um eine eventuell vorhandene Abhängigkeit des Effekts von Dorzolamid zu bestimmen. (25) Eine Gruppe mit vermutlich fehlender Sekretion von Retinoschisin, eine Gruppe mit vermutlich verminderter Sekretion und eine mit Sekretion von vermutlich fehlerhaftem Retinoschisin in der Netzhaut wurden gebildet; bei allen drei Gruppen konnte anhand von OCT-Scans ein positiver Effekt auf die Netzhautdicke im Bereich der Fovea nachgewiesen werden. Leider wurden hier jedoch keine Ergebnisse zu Funktions-/Sehschärfetests veröffentlicht.

4.3 Methodenkritik

In allen drei in 4.2 genannten Studien wurde eine dreimalige Applikation des Dorzolamids pro Tag gewählt. Nach Inoue et al. hält die Wirkung einer einmaligen Applikation einprozentiger Dorzolamid-Lösung bei Ratten 10h lang an: „*Carbonic anhydrase activity staining was detected mainly in the cells of the external granular layer and the inner layers of the retina in the physiological saline administered group. Carbonic anhydrase was also active in the pigmented epithelial cell layer. In the dorzolamide administered group, cobalt deposition was not observed 30 minutes to 10 hours after drug instillation*." (26) Deshalb wurde im hier vorgestellten Fall eine zweimalige Applikation 2-

prozentiger Dorzolamid-Lösung pro Tag, also alle 12 Stunden, für ausreichend erachtet. Dennoch hätte die Messung der Enzymaktivität bei den verwendeten Versuchstieren im Rahmen einer Vorstudie höhere Sicherheit geben können. Auch was die systemische Verteilung und Wirkung am eigentlich unbehandelten Auge betrifft, wäre hier eine höhere Sicherheit als mit der Untersuchung eines Fluoreszein-Tropfens erzielt worden. Der Alterungsprozess in Nagetieren verläuft um ein vielfaches schneller als beim Menschen. So sollte eine Therapiedauer von nur 2 Wochen vergleichbar sein mit einer weit längeren Therapiedauer beim Menschen. In der genannten Studie von Apushkin et al. wird für die in vivo Strukturanalyse ebenfalls das OCT gewählt. Um die hohe natürliche Variabilität des Krankheitsbefundes bei der XLRS aus der Messung heraus zu rechnen und eine ausreichende Reliabilität der Ergebnisse zu erreichen, wurde die Test-Retest-Variabilität für die Netzhautdicke vor der Behandlung bestimmt und daran orientierend der Grenzwert für die Standardabweichung festgesetzt. Für ein entsprechendes Vorgehen hätten eine gesonderte, ausreichend große Gruppe an $Rs1h^{-/y}$-Mäusen ausgewählt und ein aufwändiger Vorversuch durchgeführt werden müssen. Es gibt bereits eine Studie zu OCT-Messungen beim Mausmodell der XLRS von Xu et al. aus dem Jahre 2009 (49), hier wird jedoch lediglich die Praktikabilität der OCT-Methode und die Vergleichbarkeit mit histologischen Untersuchungen gezeigt. Diese Studie zeigt allerdings, dass die Abnahme speziell der ONL-Dicke weniger variabel ist, sondern kontinuierlich fortschreitet. Diese Erkenntnis macht die Messung der ONL-Dicke zu einem sinnvollen Indikator bei der Evaluation des therapeutischen Effekts von Dorzolamid. Eine einmalige Messung vor der Anwendung des Dorzolamids wäre demzufolge sicherlich sinnvoll gewesen, denn dann hätte beispielsweise verglichen werden können, inwieweit sich der Grad der Abnahme der Photorezeptorschichtdicke behandelter Tiere von der unbehandelter Tiere jeweils vor und nach der Therapie unterscheidet. Bei Xu et al. hat die ONL-Dicke bei der XLRS-Maus im Alter von 2 Monaten im Vergleich zum Wildtyp schon um 30%, im Alter von 10 Monaten um ca. 40% und im Alter von 15 Monaten um über 60% abgenommen. Der Zeitraum zwischen dem Alter von 10 Monaten und dem Alter von 15 Monaten wäre also noch einmal interessant gewesen und beispielsweise ein Therapieversuch über den gesamten Zeitraum würde vielleicht neue Ergebnisse liefern. Zum Beispiel darüber, in welcher Phase der Erkrankung die Anwendung von Dorzolamid eventuell wirkungsvoll ist. In der vorgestellten Studie wurde der Therapiever-

such auf Basis von Erkenntnissen aus vorherigen Studien zur XLRS-Maus auf den Zeitraum p14 bis p28 festgelegt, da diese Studien bei Mäusen im Alter von 4 Wochen den größten Schweregrad struktureller und funktioneller Veränderungen feststellten (27, 50) und somit ein vermeintlicher Effekt am ehesten nachweisbar gewesen wäre. Für die Messung der Funktion bedienten wurde die hochsensitive Methode der Elektroretinographie gewählt. Diese wurde an der XLRS-Maus bereits mehrfach erprobt (11, 13) und zeigt auch den Messungen der Studie zufolge die für die XLRS typische, deutliche Abflachung der b-Welle (negatives ERG) sowie eine Verlängerung der Latenzzeit gegenüber dem Wildtyp. Jedoch hat sich auch hier kein Hinweis auf einen Unterschied zwischen behandeltem und unbehandeltem Auge ergeben. Auch Seok H. Min et al. verwendeten die Methode der ERG für die Evaluation ihres Therapieversuchs an $Rs1h^{-/y}$-Mäusen. Sie zeigten die erfolgreiche Anwendung von Gentherapie an $Rs1h^{-/y}$-Mäusen im Alter von 15 Tagen und eine nahezu vollständige Regeneration der Netzhautfunktion im Alter von ungefähr 3 Monaten. Für die Auswertung wurden hier die Mittelwerte von je 15 Augen von gentherapierten $Rs1h^{-/y}$-Mäusen, nicht therapierten $Rs1h^{-/y}$-Mäusen und Wildtyp-Mäusen verglichen. Da die Unterschiede der b-Wellen-Amplituden zwischen dem Wildtyp und der $Rs1h^{-/y}$-Maus ausreichend groß waren und die Wirkung durch Gentherapie sich ebenfalls hinreichend unterschied, konnten trotz interindividueller Variabilität des Phänotyps auch so deutlich signifikante Ergebnisse erzielt werden. (11)

Bei den aktuellen Messungen sind vereinzelt vom Durchschnitt stark abweichende Messergebnisse entstanden beziehungsweise haben vereinzelt fehlende Werte zu wechselndem n bei der statistischen Auswertung geführt (s. Ergebnisteil). Die technischen Herausforderungen wurden bereits im Methodenteil erläutert. Jedoch spielen physiologische Einflussfaktoren gerade bei der sensitiven Elektroretinographie eine wichtige Rolle und sollen deshalb in diesem Zusammenhang Erwähnung finden (30, 31). Zu den Faktoren, welche nie sicher einheitlich überwacht werden können, gehören das individuelle Verhalten bei der Ernährung, der gesunde Schlaf, die Einhaltung eines regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus und der Einfluss von Krankheiten beispielsweise durch Viren. Der Stress, den die Versuchstiere empfinden, kann individuell sehr unterschiedlich sein. So kam es auch zu individuell unterschiedlicher Wirkung der Anästhesie. Ein zu frühes Nachlassen der Wirkung konnte zu Artefakten führen und teilweise den Abbruch der

Untersuchung vor Beendigung des Protokolls erzwingen. Die Möglichkeit zur intraindividuellen Analyse wurde dadurch zu einer wichtigen Option um dennoch eine ausreichend hohe statistische Aussagekraft zu erreichen.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

Obwohl in der vorgestellten Studie keinerlei Wirkung von Dorzolamid auf die Struktur und Funktion der Netzhaut bei der XLRS-Maus nachgewiesen werden konnte (51), wurde erst kürzlich eine weitere Fallstudie von Collison et al. veröffentlicht, welche die Wirksamkeit von Dorzolamid sogar bei extrafovealer, peripherer Schisis eines XLRS-Patienten zeigt.(52) Dieser Diskrepanz der Ergebnisse zwischen unserer Studie am Mausmodell und den Studien am Menschen können verschiedene Unterschiede bei der Wahl der Probanden, Therapieschemata und Anwendung der Methoden zu Grunde liegen. Auch wenn die Mausretina eine ähnliche anatomische und molekulare Struktur aufweist wie die humane Netzhaut, so birgt sie einen wesentlichen Unterschied. Es gibt kein Pendant zur humanen Makula, keine zentrale Stelle erhöhter Konzentration an Photorezeptoren. Gerade bei einer Krankheit wie die XLRS, welche vorwiegend von makulärer Strukturveränderung ausgeht, könnte diese Tatsache sich im Ergebnis entsprechend niederschlagen. Vorher wären allerdings methodische und studiendesignabhängige Faktoren zu prüfen. Gerade die Wahl des Therapieschemas lässt viele Möglichkeiten offen. In der vorgestellten Studie wurde die einseitige Applikation von 2% Dorzolamid zweimal täglich über 2 Wochen gewählt. Beispielsweise eine beidseitige Applikation dreimal täglich. über einen längeren Zeitraum würde schon die Vergleichbarkeit mit den Studien am Menschen erhöhen. Dabei würde eine große Kontrollgruppe notwendig werden. Eine OCT-Befund abhängige Anwendung der Therapie über den gesamten Versuchszeitraum würde im Falle einer Wirksamkeit sogar den direkten Zusammenhang zwischen Anwendung und Wirkung im Verlauf abbilden lassen.
Die Art der Applikation wurde in einem Vorversuch genau geprüft, sodass nicht davon ausgegangen wird, dass das Dorzolamid nach der Applikation am rechten Auge das zweite Auge über das Fell oder einen systemischen Weg erreicht haben könnte. Eine

laborchemische Untersuchung hätte größere Sicherheit geboten, aber gleichzeitig auch die Verwendung eines zusätzlichen Versuchstieres bedeutet.

Durch die Bildung von Differenzen der Werte von OD und OS an vergleichbaren Netzhautpositionen je Versuchstier und die Mittelung all dieser Differenzen je Messzeitpunkt und Netzhautposition konnte eine zuverlässige Aussage über den durchschnittlichen Unterschied von behandeltem zu unbehandeltem Auge gemacht werden und gleichzeitig die Abweichung von der Differenz 0 in Relation zur rechnerisch ermittelten Standardabweichung betrachtet werden. So wurde der Unterschied an jeweils definierten Positionen auf der Netzhaut zwischen den Netzhautdicken von behandeltem und unbehandeltem Auge in jedem einzelnen Versuchstier mit dem Unterschied an vergleichbaren Positionen in den Netzhäuten anderer Versuchstiere verglichen, und nicht der Mittelwert aller behandelter mit dem Mittelwert aller unbehandelter Augen.

Die Untersuchung der Netzhaut der Maus mittels SLO und OCT ist gut erprobt und lässt sehr zuverlässige und objektive Aussagen über den Zustand der Struktur zu, gerade auch bei Modellen mit Netzhautdegeneration. (16, 49, 53-56) Ähnliches gilt auch für die Methode der Elektroretinographie bei der Beurteilung der Funktion der Netzhaut, speziell bei der XLRS-Maus. (11, 13) Diese in vivo Messmethoden sind gerade bei der Evaluation eines Therapieeffektes bei der XLRSh1 von großem Nutzen, da zum einen der Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von der Therapie bei jedem Versuchstier individuell über einen längeren Zeitraum betrachtet werden kann und zum anderen die spezifischen pathologischen Strukturveränderungen nach einer histologischen Aufarbeitung nicht eins zu eins erhalten bleiben. Hinzu kommt, dass diese präzisen in vivo Messmethoden große Zahlen von Versuchstieren und zusätzlich enorme Kosten für die Forschung ersparen. Auch in der Klinik dienen diese Methoden zur Diagnostik und Evaluation von Therapieerfolgen der XLRS.

Dennoch ist die klinische Relevanz der hier gezeigten Studie in Abhängigkeit zu dem spezifischen Versuchsaufbau zu bewerten und die Ergebnisse sind nicht ohne Weiteres auf den klinischen Alltag übertragbar. Die Denn Ergebnisse der Studie gelten zunächst für die Anwendung an Versuchstieren und nicht für menschliche Probanden . Die Chancen lagen in den sicher planbaren und standardisiert durchführbaren Untersuchungen einer ausreichend großen Gruppe vergleichbaren Alters. Die Glaubwürdigkeit der bisher veröffentlichten Studien mit überwiegend positiven Ergebnissen (23-25, 47, 57-60) soll-

te jedenfalls auf Basis der hier vorgestellten Ergebnisse nicht in Frage gestellt werden. Es könnte beispielsweise eine ausreichend große multizentrische Studie geplant werden, um gegebenenfalls eine zuverlässigere Aussage über die Wirksamkeit von Dorzolamid bei XLRS-Patienten zu generieren. Dabei könnten in den einzelnen Kliniken erfasste XLRS-Patienten in eine große Versuchsgruppe zusammengeführt und ein gemeinsames Therapieschema auf der Grundlage bisheriger Erfahrungen und standardisierter Untersuchungsprotokolle festgelegt werden. Denn eine ausreichende Evidenz zur Wirksamkeit von Dorzolamid könnte für die XLRS-Patienten, welche zurzeit noch keine alternativen Therapiemöglichkeiten kennen, die einzige Unterstützung zum prolongierten Erhalt der vorhandenen Sehfähigkeit bedeuten.

4.5 Neue Erkenntnisse und Ausblick auf weitere Studien

Weitere Anknüpfungspunkte auf dem Weg zur Entdeckung einer Therapiemöglichkeit bei XLRS stellen insbesondere Versuche zum besseren Verständnis der Pathogenese und der Pathophysiologie dar. Durch die Verfügbarkeit des Mausmodells ist die Durchführbarkeit entsprechender Untersuchungen unter Berücksichtigung ethischer Grundsätze stark vorangetrieben worden. So war die Charakterisierung des hier verwendeten Mausmodells (13) auch ein Ziel dieser Forschungsarbeit. Es konnten während der Strukturanalyse neue Erkenntnisse zu den charakteristischen Eigenschaften der Rs1h$^{-/y}$-Maus gewonnen werden. Von der auffälligen Autofluoreszenz des Fundus über das spezielle Verteilungsmuster, welches mit der Verteilung der Schisis in etwa übereinstimmt, über die Korrelation der Autofluoreszenz mit Veränderungen im entsprechenden OCT-Schnittbild bis hin zur unterschiedlichen zeitlichen Entwicklung der Autofluoreszenz im Vergleich zur Schisis. Diese Erkenntnisse sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen werden. Die hyperfluoreszenten Veränderungen im Fundus der XLRS-Maus unterliegen einem auffälligen Verteilungsmuster und treten vornehmlich in der superioren Hemiretina auf. Gleiches gilt auch für die Schisis. Während jedoch die Schisis im Alter von 7 Monaten wieder stark zurückgeht, erreicht die Hyperfluoreszenz zu diesem Zeitpunkt ihre maximale Intensität und lässt einen kausalen Zusammenhang vermuten, welcher bisher noch nicht geklärt ist. Das Verteilungsmuster von Hyperfluoreszenz und

Schisis erinnert an das Verteilungsmuster von Rot- und Grün-Zapfen-Photorezeptoren in der Mausretina (34) und zeigt, wie ähnlich der Pathomechanismus in der Maus zu dem im Menschen zu sein scheint. Denn auch beim Menschen tritt die Schisis verstärkt im Bereich erhöhter Rot und Grün-Zapfen-Photorezeptoren-Konzentration, der Makula, auf. (61-63) Eine immunohistochemische Untersuchung an einzelnen Versuchstieren zum Ende des Versuchs lieferte zwar keinen Hinweis auf einen verstärkten Untergang von Photorezeptoren in der superioren Hemiretina (Abb. 26), dennoch wäre eine genauere Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Photorezeptorart, Grad des Untergangs der Rezeptoren und Schisis für das genauere Verständnis des Pathomechanismus sinnvoll. Auch die genaue Ursache für die Hyperfluoreszenz in diesem Mausmodell ist noch nicht geklärt. Die betroffenen Stellen wurden in der Autofluoreszenzfundusaufnahme mit den Befunden in den entsprechenden OCT-Schnittbildern auf Höhe der Läsion verglichen und interessante Korrelationen zwischen Größe der Läsion und Veränderung im OCT-Schnittbild gefunden. Gut abgrenzbare hyperfluoreszente Punkte fanden sich im OCT-Schnittbild in Punkten mit erhöhter Reflexion in der inneren Körnerschicht wieder. Etwas größere hyperfluoreszente Flecken fanden sich in einer rosettenförmigen Umorganisation der Schichten der äußeren Netzhaut wieder. Selten aufgetretene große Flecken intensiver Hyperfluoreszenz fanden sich in Bereichen deutlich erhöhter Reflexion vornehmlich in der äußeren plexiformen Schicht wieder und traten zeitgleich mit einer milden, lokal begrenzten Netzhautablösung auf. Autofluoreszentes Material werden in Mäusen wie auch in Menschen höheren Alters beobachtet, wo infolge natürlicher altersbedingter Überforderung des Pigmentepithels sich zelluläre Debrits ansammelt, welches sich durch die Wirkung oxidativen Stresses zu autofluoreszentem Lipofuszin umwandelt.(64) Gerade in Geweben erhöhten Zelluntergangs, wie der Netzhaut in der XLRS-Maus, werden solche Zustände früh erreicht und die hier vorgestellten Befunde lassen nun die Vermutung zu, dass mittels hochauflösendem OCT der dazu führende Prozess auf zellulärer Ebene aufgenommen und analysiert werden kann. Diese Vermutung zu bestätigen, könnte Ziel weiterer empirischer Forschung sein. Weiterhin ist der Zusammenhang zwischen Stadium der Erkrankung und Autofluoreszenzfundusbefund eventuell von essentieller Wichtigkeit für die bessere Beurteilung der XLRS-Patienten in der Klinik. So sind während dieser Arbeit neue Ansätze und Denkanstöße für weitere Studien entstanden. Die vorliegende

Arbeit hat außerdem zeigen können, welchen Nutzen die Wissenschaft aus der Entwicklung der Optischen Kohärenztomographie und ihrer Adaptation für die Anwendung am Mausauge ziehen kann.

5. Zusammenfassung

Diese Studie wurde durchgeführt, um die Wirksamkeit von Dorzolamid auf die retinale Struktur und Funktion bei einem Mausmodell der X-chromosomalen Juvenilen Retinoschisis zu evaluieren. Die Versuchstiere wurden zweimal täglich isoliert am rechten Auge mit Dorzolamid Augentropfen behandelt. Für die Beurteilung der Struktur waren in vivo cSLO-Fundusaufnahmen, SD-OCT-Schnittbilder von der Netzhaut und histologische Schnitte ausschlaggebend. Für die Beurteilung der Funktion wurde eine Elektroretinographie durchgeführt. Für die Strukturanalyse wurden für jedes einzelne Versuchstier zu jedem Messzeitpunkt die Dicke der inneren Netzhaut und der äußeren Netzhaut separat bestimmt. Für die innere Netzhaut wurden je Versuchstier Differenzen aus den Werten für unbehandeltes und behandeltes Auge gebildet, um so den Grad der Wirkung auf die pathologische Schisisentstehung zu quantifizieren. Werte der äußeren Netzhaut wurden analog behandelt, um den Grad der Photorezeptordegeneration zwischen OS und OD zu vergleichen. Durch den intraindividuellen Vergleich von behandeltem und unbehandeltem Auge konnte die interindividuelle Varianz im krankheitsspezifischen Verlauf umgangen werden. Aus den ERG-Untersuchungen wurden insbesondere die a- und b-Wellenamplituden und die jeweiligen Latenzzeiten bestimmt und auch hier wurde wieder je Versuchstier die Differenz aus OS und OD gebildet. Die in vivo Untersuchungsmethoden cSLO, SD-OCT und ERG ermöglichten die wiederholte Untersuchung ein und desselben Versuchstieres über einen längeren Zeitraum und somit die Beurteilung des kurz-, mittel- und langfristigen Effektes von Dorzolamid. Mehrfache Messungen über ein halbes Jahr nach Ende des Therapieversuches zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den behandelten rechten und unbehandelten linken Augen, weder in Struktur noch Funktion. Es konnten jedoch neue Erkenntnisse zur Charakterisierung des Mausmodells für die XLRS gewonnen werden. Während der cSLO-Fundusuntersuchung im Autofluoreszenz-Modus wurden so hyperfluoreszente Flecken entdeckt, welche vornehmlich in der superioren Netzhauthälfte auftraten. Deren Intensität nimmt mit zunehmendem Alter der Tiere kontinuierlich zu. Die Schisis, welche ebenfalls verstärkt in der superioren Netzhauthälfte auftritt, erreicht den Grad maximaler Ausprägung hingegen im Versuchstieralter zwischen vier und sieben Monaten und nimmt im Alter von 7 Monaten wieder stark ab.

6. Literaturverzeichnis

1. Molday RS, Kellner U, Weber BH. X-linked juvenile retinoschisis: clinical diagnosis, genetic analysis, and molecular mechanisms. Progress in retinal and eye research. [Research Support, N.I.H., Extramural,Research Support, Non-U .S. Gov't, Review]. 2012 May;31(3):195-212.
2. Haas J. Ueber das Zusammenkommen von Veränderungen der Retina und Chorioidea. Arch Augenheilkd. 1898;37:343-8.
3. Pagenstecher H. Ueber eine unter dem Bilde der Nethhautabloesung verlaufende, erbliche Erkrankung der Retina. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1913;86:457-62.
4. Lee JJ, Kim JH, Kim SY, Park SS, Yu YS. Infantile vitreous hemorrhage as the initial presentation of X-linked juvenile retinoschisis. Korean J Ophthalmol. [Case Reports]. 2009 Jun;23(2):118-20.
5. Grayson C, Reid SN, Ellis JA, Rutherford A, Sowden JC, Yates JR, et al. Retinoschisin, the X-linked retinoschisis protein, is a secreted photoreceptor protein, and is expressed and released by Weri-Rb1 cells. Hum Mol Genet. 2000 Jul 22;9(12):1873-9.
6. Sauer CG, Gehrig A, Warneke-Wittstock R, Marquardt A, Ewing CC, Gibson A, et al. Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. Nat Genet. 1997 Oct;17(2):164-70.
7. Wu WW, Molday RS. Defective discoidin domain structure, subunit assembly, and endoplasmic reticulum processing of retinoschisin are primary mechanisms responsible for X-linked retinoschisis. The Journal of biological chemistry. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003 Jul 25;278(30):28139-46.
8. Brucker AJ, Spaide RF, Gross N, Klancnik J, Noble K. Optical coherence tomography of X-linked retinoschisis. Retina. 2004 Feb;24(1):151-2.
9. George ND, Yates JR, Moore AT. X linked retinoschisis. Br J Ophthalmol. 1995 Jul;79(7):697-702.
10. Renner AB, Kellner U, Fiebig B, Cropp E, Foerster MH, Weber BH. ERG variability in X-linked congenital retinoschisis patients with mutations in the RS1 gene and the diagnostic importance of fundus autofluorescence and OCT. Doc Ophthalmol. 2008 Mar;116(2):97-109.
11. Min SH, Molday LL, Seeliger MW, Dinculescu A, Timmers AM, Janssen A, et al. Prolonged recovery of retinal structure/function after gene therapy in an Rs1h-deficient mouse model of x-linked juvenile retinoschisis. Mol Ther. 2005 Oct;12(4):644-51.
12. Zeng Y, Takada Y, Kjellstrom S, Hiriyanna K, Tanikawa A, Wawrousek E, et al. RS-1 Gene Delivery to an Adult Rs1h Knockout Mouse Model Restores ERG b-Wave with Reversal of the Electronegative Waveform of X-Linked Retinoschisis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004 Sep;45(9):3279-85.
13. Weber BH, Schrewe H, Molday LL, Gehrig A, White KL, Seeliger MW, et al. Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, Rs1h, suggests a role of retinoschisin in retinal cell layer organization and synaptic structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 30;99(9):6222-7.

14. Flurkey K ea. The mouse in aging research. In: al. FJe, editor. The Mouse in biomedical research. 2nd ed. Burlington: Elsevier; 2007. p. 637 - 72.
15. Fischer MD, Zhour A, Kernstock CJ. Phenotyping of mouse models with OCT. Methods Mol Biol. 2013;935:79-85.
16. Fischer MD, Huber G, Beck SC, Tanimoto N, Muehlfriedel R, Fahl E, et al. Noninvasive, in vivo assessment of mouse retinal structure using optical coherence tomography. PLoS One. 2009;4(10):e7507.
17. Gregori NZ, Lam BL, Gregori G, Ranganathan S, Stone EM, Morante A, et al. Wide-field spectral-domain optical coherence tomography in patients and carriers of X-linked retinoschisis. Ophthalmology. [Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2013 Jan;120(1):169-74.
18. Gerth C, Zawadzki RJ, Werner JS, Heon E. Retinal morphological changes of patients with X-linked retinoschisis evaluated by Fourier-domain optical coherence tomography. Archives of ophthalmology. [Case Reports Research Support, N.I.H., Extramural,Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Jun;126(6):807-11.
19. Fishman GA, Apushkin MA. Continued use of dorzolamide for the treatment of cystoid macular oedema in patients with retinitis pigmentosa. Br J Ophthalmol. 2007 Jun;91(6):743-5.
20. Wang T, Zhou A, Waters CT, O'Connor E, Read RJ, Trump D. Molecular pathology of X linked retinoschisis: mutations interfere with retinoschisin secretion and oligomerisation. Br J Ophthalmol. 2006 Jan;90(1):81-6.
21. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. Physiol Rev. 2005 Jul;85(3):845-81.
22. Cox SN, Hay E, Bird AC. Treatment of chronic macular edema with acetazolamide. Arch Ophthalmol. 1988 Sep;106(9):1190-5.
23. Apushkin MA, Fishman GA. Use of dorzolamide for patients with X-linked retinoschisis. Retina. 2006 Sep;26(7):741-5.
24. Genead MA, Fishman GA, Walia S. Efficacy of sustained topical dorzolamide therapy for cystic macular lesions in patients with X-linked retinoschisis. Arch Ophthalmol. Feb;128(2):190-7.
25. Walia S, Fishman GA, Molday RS, Dyka FM, Kumar NM, Ehlinger MA, et al. Relation of response to treatment with dorzolamide in X-linked retinoschisis to the mechanism of functional loss in retinoschisin. Am J Ophthalmol. 2009 Jan;147(1):111-5 e1.
26. Inoue J, Oka M, Aoyama Y, Kobayashi S, Ueno S, Hada N, et al. Effects of dorzolamide hydrochloride on ocular tissues. J Ocul Pharmacol Ther. 2004 Feb;20(1):1-13.
27. Fischer MD, Tanimoto N, Bernd A, Zrenner E, Weber BHF, Seeliger MW. Retinal Structure and Function in X-Linked Juvenile Retinoschisis – a Comparison of Human Patients and Gene-targeted Mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009:ARVO E-Abstract D697.
28. Pimenides D, George ND, Yates JR, Bradshaw K, Roberts SA, Moore AT, et al. X-linked retinoschisis: clinical phenotype and RS1 genotype in 86 UK patients. J Med Genet. 2005 Jun;42(6):e35.

29. Troeger E, Sliesoraityte I, Charbel Issa P, Scholl HN, Zrenner E, Wilke R. An integrated software solution for multi-modal mapping of morphological and functional ocular data. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2010;1:6280-3.
30. Birch DG, Anderson JL. Standardized full-field electroretinography. Normal values and their variation with age. Archives of ophthalmology. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1992 Nov;110(11):1571-6.
31. Grover S, Fishman GA, Birch DG, Locke KG, Rosner B. Variability of full-field electroretinogram responses in subjects without diffuse photoreceptor cell disease. Ophthalmology. 2003 Jun;110(6):1159-63.
32. Samardzija M, Wenzel A, Aufenberg S, Thiersch M, Reme C, Grimm C. Differential role of Jak-STAT signaling in retinal degenerations. Faseb J. 2006 Nov;20(13):2411-3.
33. Secondi R, Kong J, Blonska AM, Staurenghi G, Sparrow JR. Fundus autofluorescence findings in a mouse model of retinal detachment. Investigative ophthalmology & visual science. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Aug;53(9):5190-7.
34. Szel A, Rohlich P, Caffe AR, Juliusson B, Aguirre G, Van Veen T. Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. J Comp Neurol. 1992 Nov 15;325(3):327-42.
35. Pfeiffer N. Dorzolamide: development and clinical application of a topical carbonic anhydrase inhibitor. Surv Ophthalmol. 1997 Sep-Oct;42(2):137-51.
36. Marmor MF, Maack T. Enhancement of retinal adhesion and subretinal fluid resorption by acetazolamide. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1982 Jul;23(1):121-4.
37. Grover S, Apushkin MA, Fishman GA. Topical dorzolamide for the treatment of cystoid macular edema in patients with retinitis pigmentosa. Am J Ophthalmol. 2006 May;141(5):850-8.
38. Genead MA, Fishman GA. Efficacy of sustained topical dorzolamide therapy for cystic macular lesions in patients with retinitis pigmentosa and usher syndrome. Arch Ophthalmol. Sep;128(9):1146-50.
39. Genead MA, Fishman GA, McAnany JJ. Efficacy of topical dorzolamide for treatment of cystic macular lesions in a patient with enhanced S-cone syndrome. Doc Ophthalmol. Sep 15.
40. Grover S, Fishman GA, Fiscella RG, Adelman AE. Efficacy of dorzolamide hydrochloride in the management of chronic cystoid macular edema in patients with retinitis pigmentosa. Retina. 1997;17(3):222-31.
41. Fishman GA, Gilbert LD, Fiscella RG, Kimura AE, Jampol LM. Acetazolamide for treatment of chronic macular edema in retinitis pigmentosa. Arch Ophthalmol. 1989 Oct;107(10):1445-52.
42. Wolfensberger TJ. The role of carbonic anhydrase inhibitors in the management of macular edema. Doc Ophthalmol. 1999;97(3-4):387-97.
43. Kirsch LS, Brownstein S, de Wolff-Rouendaal D. A histopathological, ultrastructural and immunohistochemical study of congenital hereditary retinoschisis. Can J Ophthalmol. 1996 Oct;31(6):301-10.
44. Sikkink SK, Biswas S, Parry NR, Stanga PE, Trump D. X-linked retinoschisis: an update. J Med Genet. 2007 Apr;44(4):225-32.
45. George ND, Yates JR, Moore AT. Clinical features in affected males with X-linked retinoschisis. Arch Ophthalmol. 1996 Mar;114(3):274-80.

46. Wolfensberger TJ, Chiang RK, Takeuchi A, Marmor MF. Inhibition of membrane-bound carbonic anhydrase enhances subretinal fluid absorption and retinal adhesiveness. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2000 Jan;238(1):76-80.
47. Khandhadia S, Trump D, Menon G, Lotery AJ. X-linked retinoschisis maculopathy treated with topical dorzolamide, and relationship to genotype. Eye. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jul;25(7):922-8.
48. Consortium TR. Functional implications of the spectrum of mutations found in 234 cases with X-linked juvenile retinoschisis (XLRS). Human Molecular Genetics. 1998;7:1185-92.
49. Xu J, Molday LL, Molday RS, Sarunic MV. In vivo imaging of the Mouse Model of X-Linked Juvenile Retinoschisis Using Fourier Domain Optical C oherence Tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Jan 31.
50. Johnson BA, Aoyama N, Friedell NH, Ikeda S, Ikeda A. Genetic modification of the schisis phenotype in a mouse model of X-linked retinoschisis. Genetics. [Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Mar;178(3):1785-94.
51. Zhour A, Bolz S, Grimm C, Willmann G, Schatz A, Weber BH, et al. In vivo imaging reveals novel aspects of retinal disease progression in Rs1h(-/Y) mice but no therapeutic effect of carbonic anhydrase inhibition. Vet Ophthalmol. 2012 Sep;15 Suppl 2:123-33.
52. Collison FT, Genead MA, Fishman GA, Stone EM. Resolution of Mid-Peripheral Schisis in X-Linked Retinoschisis with the Use of Dorzolamide. Ophthalmic genetics. 2013 Mar 20.
53. Seeliger MW, Beck SC, Pereyra-Munoz N, Dangel S, Tsai JY, Luhmann UF, et al. In vivo confocal imaging of the retina in animal models using scanning laser ophthalmoscopy. Vision Res. 2005;45(28):3512-9.
54. Huber G, Beck SC, Grimm C, Sahaboglu-Tekgoz A, Paquet-Durand F, Wenzel A, et al. Spectral domain optical coherence tomography in mouse models of retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Dec;50(12):5888-95.
55. Srinivasan VJ, Ko TH, Wojtkowski M, Carvalho M, Clermont A, Bursell SE, et al. Noninvasive volumetric imaging and morphometry of the rodent retina with high-speed, ultrahigh-resolution optical coherence tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Dec;47(12):5522-8.
56. Kim KH, Puoris'haag M, Maguluri GN, Umino Y, Cusato K, Barlow RB, et al. Monitoring mouse retinal degeneration with high-resolution spectral-domain optical coherence tomography. J Vis. 2008;8(1):17 1-1.
57. Thobani A, Fishman GA. The use of carbonic anhydrase inhibitors in the retreatment of cystic macular lesions in retinitis pigmentosa and X-linked retinoschisis. Retina. 2011 Feb;31(2):312-5.
58. Ghajarnia M, Gorin MB. Acetazolamide in the treatment of X-linked retinoschisis maculopathy. Arch Ophthalmol. 2007 Apr;125(4):571-3.
59. Collison FT, Genead MA, Fishman GA, Stone EM. Resolution of Mid-Peripheral Schisis in X-Linked Retinoschisis with the Use of Dorzolamide. Ophthalmic Genet. 2013 Mar 20.
60. Bastos ALCM. Use of topical dorzolamide for patients with X-linked juvenile retinoschisis: case report. Arq Bras Oftalmol. 2008;71(12):286-90.

61. Marc RE, Sperling HG. Chromatic organization of primate cones. Science. 1977 Apr 22;196(4288):454-6.
62. Hofer H, Carroll J, Neitz J, Neitz M, Williams DR. Organization of the human trichromatic cone mosaic. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. [Comparative Study Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S., Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2005 Oct 19;25(42):9669-79.
63. Roorda A, Williams DR. The arrangement of the three cone classes in the living human eye. Nature. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1999 Feb 11;397(6719):520-2.
64. Xu H, Chen M, Manivannan A, Lois N, Forrester JV. Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. Aging Cell. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Jan;7(1):58-68.

7. Veröffentlichung

Aus dieser Studie ist folgende Veröffentlichung hervor gegangen:

Ahmad Zhour, Sylvia Bolz, Christian Grimm, Gabriel Willmann, Andreas Schatz, Bernhard H. F. Weber, Eberhart Zrenner und M. Dominik Fischer - *In vivo imaging reveals novel aspects of retinal disease progression in Rs1h)/Y mice but no therapeutic effect of carbonic anhydrase inhibition* - Veterinary Ophthalmology – 2012 – Band 2, S.122-133.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Dominik Fischer hat die Studie konzipiert, Ahmad Zhour angelernt und in jedem Schritt betreut. Er hat das Manuskript korrigiert.

Eberhart Zrenner hat die Studie betreut und Ahmad Zhour in allen Punkten beraten. Er hat das Manuskript korrigiert.

Ahmad Zhour hat die Versuchstiere behandelt, die SLO-, OCT- und ERG-Untersuchungen durchgeführt, die Daten erhoben und ausgewertet. Er hat die Veröffentlichung in englischer Sprache gemeinsam mit Dominik Fischer zu gleichen Anteilen geschrieben und überarbeitet. Er hat die vorliegende Dissertationsschrift in deutscher Sprache vollständig selbstständig verfasst.

Regina Hofer hat einen Teil der Abbildungen nach Anleitung von Ahmad Zhour graphisch optimiert.

Tobias Peters hat das ERG-Labor zur Verfügung gestellt, Ahmad Zhour angelernt und während der Gesamtdauer aller Messungen ständig begleitet.

Sylvia Bolz hat einen Teil der von Ahmad Zhour enukleierten Augen histochemisch aufgearbeitet und untersucht. Ahmad Zhour hat die Ergebnisse ausgewertet.

Christian Grimm hat einen Teil der von Ahmad Zhour enukleierten Augen histologisch aufgearbeitet und untersucht. Ahmad Zhour hat die Ergebnisse ausgewertet.

Gabriel Willmann hat Ahmad Zhour bei der Erstellung der Veröffentlichung beraten.

Andreas Schatz hat bei der Erstellung des ERG-Protokolls beratend zur Seite gestanden.

Bernhard H.F. Weber hat das Mausmodell zur Verfügung gestellt.

9. Danksagung

Herzlichen Dank an Herrn Professor Dr. Eberhart Zrenner für die Möglichkeit, diese Studie durchzuführen und für die sehr gute Betreuung und Unterstützung während der gesamten Studiendauer.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Privatdozent Dr. Dominik Fischer für die Planung der Studienorganisation, die sehr gute Zusammenarbeit und für seine vorbildliche Beratung, Unterstützung und unermüdliche Betreuung während der gesamten Arbeit.

Danke auch an Tobias Peters für seine Mühe und seinen unglaublich wertvollen und stetigen Einsatz bei der Ermöglichung und Durchführung der ERG-Messungen. Er hat mich während aller Messungen begleitet.

Für die graphische Gestaltung eines Teils der Abbildungen bedanke ich mich herzlich bei Frau Regina Hofer.

Für die freundliche Unterstützung im Labor bedanke ich mich bei Professor Dr. Frank Schäffel und seinem gesamten Team, insbesondere Dr. Tudor Tepelus und Dr. Alexandra Penha. Sie ermutigten mich und gaben mir einen Teamrückhalt, wie man ihn sich nur wünschen kann.

Danke an Herrn Professor Christian Grimm und Sylvia Bolz für die histologische Aufarbeitung der Proben.

Danke an Gabriel Willmann und Andreas Schatz für ihre kompetente beratende Unterstützung.

Danke an Herrn Professor Weber für das Mausmodell.

Ein wertschätzendes Dankeschön an meinen Bruder Abbas Zhour für seine große mentale Unterstützung während der gesamten Studiendauer.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ahmad Zhour
Geburtsdatum	07.10.1986
Geburtsort	Al-Nabatieh, Libanon
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1993 – 1997	Grundschule Wehretal Reichensachsen
1997 – 2003	Gymnasium Eschwege
2003 – 2006	Oberstufengymnasium Eschwege (Abitur)

Studium

2007 – 2014	Studium der Humanmedizin an der Privaten Universität Witten/Herdecke, Witten, Deutschland 1. Staatsexamen: 02.03.2009, Witten 2. Staatsexamen: 08.05.2014, Wuppertal

Forschungstätigkeit

März 2008	Congenital anomalies of the optic nerve, Kairo
April – Aug. 2010	Wirkung synthetischer Peptide auf die Wundheilung mit Pseudomonas aeruginosa infizierter Wunden, Bochum
Febr. 2011 – Jan. 2012	Dorzolamide in X-linked Retinoschisis, Tübingen

Beruflicher Werdegang

Juli 2014 – heute	Assistenzarzt der Universitäts-Augenklinik Tübingen