Aus der Abteilung Augenheilkunde
(Prof. Dr. med. H. Hoerauf)
im Zentrum Augenheilkunde und Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Silikonöl als intraokulärer Medikamententräger

Interaktionen zwischen Endotamponade und Kortikosteroiden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Benjamin Braun
aus
Bremervörde

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Hoerauf

2. Berichterstatter/in:

3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

1 | EINLEITUNG **6**

1.1 | ANATOMISCHE VORBEMERKUNGEN 6
1.2 | BISHERIGE MEDIKAMENTENAPPLIKATIONEN AM AUGE 7

2 | ZIELSETZUNG **13**

3 | MATERIAL UND METHODEN **14**

3.1 | VERWENDETE METHODE 14
3.2 | VALIDIERUNG DER METHODE 16
3.3 | TEIL-VERSUCHE 21

3.3.1 | SILIKONÖL ALS MEDIKAMENTENTRÄGER 21
3.3.2 | SILIKONÖL ALS AFFEKTOR AUF DIE HALBWERTSZEIT DER KORTIKOSTEROIDE 22
3.3.3 | VERHALTEN DER WIRKSTOFFKRISTALLE BEI ÜBERSÄTTIGUNG 23

3.4 | MATERIALIEN 24

4 | ERGEBNISSE **27**

4.1 | METHODE 27
4.2 | TEIL-VERSUCHE 33

4.2.1 | SILIKONÖL ALS MEDIKAMENTENTRÄGER 33
4.2.2 | SILIKONÖL ALS AFFEKTOR AUF DIE HALBWERTSZEIT DER KORTIKOSTEROIDE 38
4.2.3 | DAS VERHALTEN DER WIRKSTOFFKRISTALLE BEI ÜBERSÄTTIGUNG 40

5 DISKUSSION **42**

5.1 | BEWERTUNG DER METHODE 42
5.2 | BEWERTUNG DER TEIL-VERSUCHE 44

5.2.1 | SILIKONÖL ALS MEDIKAMENTENTRÄGER 44
5.2.2 | SILIKONÖL ALS AFFEKTOR AUF DIE HALBWERTSZEIT DER KORTIKOSTEROIDE 49
5.2.3 | VERHALTEN UNGELÖSTER KRISTALLE IN DER WÄSSRIGEN PHASE BEI ANWESENHEIT VON SILIKONÖL 51

5.3 | KRITIKPUNKTE UND MÖGLICHE FEHLERQUELLEN 54
5.4 | PERSPEKTIVEN FÜR NEUE ENDOTAMPONADEN 55

6 | ZUSAMMENFASSUNG **57**

7 | LITERATURVERZEICHNIS **59**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AU	Absorption Unit
AUC	Area under Curve
C	Celsius
d	Tag(e)
DEXA	Dexamethason
EtAc	Ethyl-Acetat
h	Stunde(n)
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography
H_2O	Wasser
MeOH	Methanol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
PVR	Proliferative Vitreoretinopathie
SiÖl	Silikonöl
TACA	Triamcinolon-Acetonid
TV	Teilversuche
UV	Ultraviolett

1 EINLEITUNG

1.1 ANATOMISCHE VORBEMERKUNGEN

Im Folgenden soll der Leser in die für diese Arbeit relevanten anatomischen Strukturen des Auges eingeführt werden. Der anatomische Aufbau ist in Abb. 1 gezeigt.

Das Iris-Linsen-Diaphragma trennt die sogenannte vordere und hintere Augenkammer. Beide Augenkammern beinhalten das Kammerwasser, welches vom Ziliarkörper produziert wird (ca. 2 mm³ pro Minute). Das Kammerwasser dient dem Stofftransport innerhalb des Auges, der Aufrechterhaltung des Augeninnendruckes und zirkuliert dabei von der hinteren in die vordere Augenkammer. Ein Großteil des Kammerwassers wird über die Schlemm'schen Kanäle in die episkleralen Venen abgeleitet (siehe Abbildung 1 und 2). Ein kleiner Teil wird direkt über die Netzhaut, retinales Pigmentepithel und Aderhaut abtransportiert. So kommt es circa alle zwei Stunden zu einem vollständigen Austausch des Kammerwassers im Auge. Abbildung 2 verdeutlicht schematisch den Kammerwasserfluss.

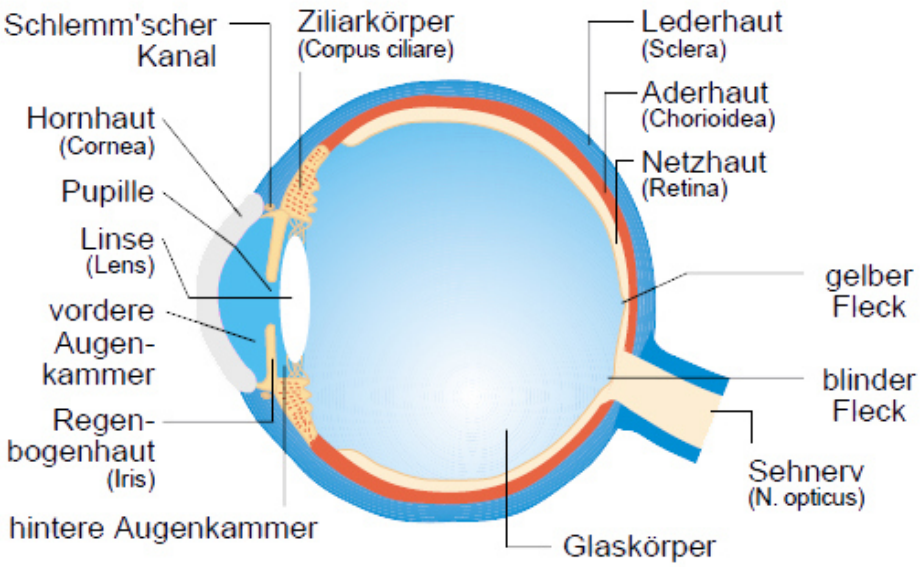

Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Strukturen des Auges. Modifizierte Abbildung aus Trebsdorf (2002), S. 321.

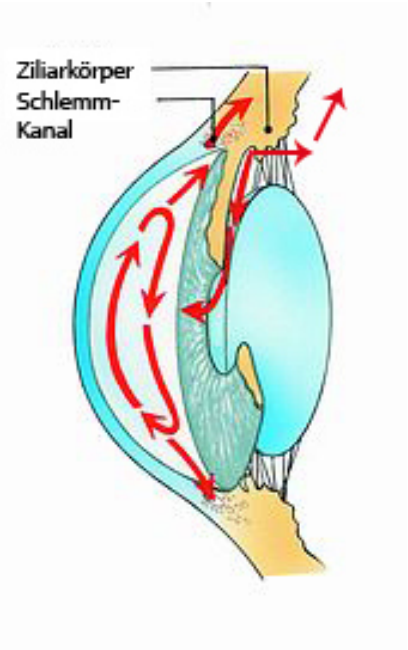

Abbildung 2: Verdeutlichung des Kammerwasserflusses. Erklärung im Text. Modifiziert nach Fehler! Hyperlink-Referenz ungültig. **(28.06.2009).**

Die Netzhaut befindet sich im hinteren Augenabschnitt und wandelt auftreffendes Licht in elektrische Signale um. Diese Signale werden über den Sehnerv (N. opticus) geleitet und in entsprechenden Hirnzentren verarbeitet, wodurch der Sinneseindruck entsteht. In der Netzhaut verlaufen Blutgefäße, die das innere Drittel der Netzhaut versorgen. Die Endothelzellen dieser Blutgefäße bilden die sogenannte „innere Blut-Retina-Schranke“. Diese Barriere erlaubt nur kleinen Molekülen den Durchtritt aus dem Blutkreislauf in das Augeninnere und nimmt eine besondere Stellung in der Pharmakotherapie ein. Im Vergleich dazu wird die „äußere Blut-Retina-Schranke“ von den Zellen des Pigmentepithels gebildet, welche über Tight-Junctions miteinander verbunden sind.

Der Glaskörper befindet sich in der hinteren Augenkammer zwischen Linse und Netzhaut und stellt den größten Teil des Auges dar. Er besteht zu 99% aus Wasser und ist in seinem Innern von Kollagenfasern netzartig durchsetzt, dabei aber völlig zellfrei.

Der Glaskörper degeneriert im Laufe des Lebens und unterliegt Alterungsprozessen. Hierbei ziehen sich die Kollagenfasern zusammen und der Wassergehalt im Glaskörper nimmt ab. Dabei kann es neben Lakunenbildungen im Innern des Glaskörpers auch zu Schrumpfungen kommen (Syneresis). Eine Schrumpfung des Glaskörpers wiederum führt zu mechanischem Zug (Traktion) an der Netzhaut, was zu einem Netzhautloch und nachfolgender Ablösung der selbigen (Ablatio retinae) führen kann.

1.1 Bisherige Medikamentenapplikationen am Auge

Topische Therapie

Augentropfen oder -salben werden in den Bindehautsack eingebracht und damit lokal auf das Auge aufgetragen. Mit dieser Methode werden hohe Wirkstoff-Konzentrationen an der Bindehaut und Hornhaut erreicht. Nachteilig an den topischen Medikamenten ist jedoch, dass die Eindringtiefe begrenzt ist und die dadurch erzielte Effektivität hauptsächlich auf den vorderen Augenabschnitt begrenzt ist (Sultana et al. 2006).

Abbildung 3: Anwendungsbeispiel Augentropfen.

Systemische Therapie

Auch eine systemische Therapie wird bei verschiedenen Augenerkrankungen durchgeführt, sie kann auf enteralem und parenteralem Weg erfolgen. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die systemische Verabreichung von Kortikosteroiden oder anderen Immunsuppressiva bei autoimmunen Entzündungen des Auges oder Carboanhydrase-Hemmern zur Reduktion des Augeninnendrucks. Problematisch bei dieser Applikationsform ist, dass die erreichbaren Konzentrationen im hinteren Augenabschnitt stark von der Wirkstoff-Konformität abhängig sind. Da die innere und äußere Blut-Retina-Schranke den Durchtritt beispielsweise von Proteinen und größeren Molekülen aus den netzhautversorgenden Gefäßen verhindert (Patzeldt 2005), ergeben sich oft niedrigere Konzentrationen an der Netzhaut und in der hinteren Augenkammer. Im Vergleich dazu sind die Konzentrationen außerhalb der Bruch'schen Membran deutlich höher, da die Aderhaut nicht über die oben genannte Blut-Retina-Schranke verfügt (Grehn 2006). So lassen sich intraokulare bakterielle Entzündungen meist nicht ausreichend durch systemische Antibiotikatherapie behandeln.

Intravitreale Injektionen

Zwar wurde schon 1945 von Sallmann vereinzelt über erste Injektionen von Penicillin in den Glaskörper berichtet (Sallmann 1945), systematische Studien hierzu finden sich allerdings erst vermehrt Anfang der 80er Jahre. Wurde 1977 die intravitreale Injektion von Antibiotika (Baum et al. 1982) noch kontrovers diskutiert, setzte sich in den Folgejahren dieser Applikationsweg schnell durch. 1979 folgten erste Tierversuche mit Kortikosteroiden (Machemer et al. 1979; Tano et al. 1980; Tano et al. 1981). Hierbei stellte sich schnell heraus, dass die intravitreale Injektion bei Erkrankungen des hinteren Augenabschnittes deutlich bessere Ergebnisse erzielte als bisherige Therapieformen (Baum et al. 1982; Barza 1989; Peyman und Schulman 1989).

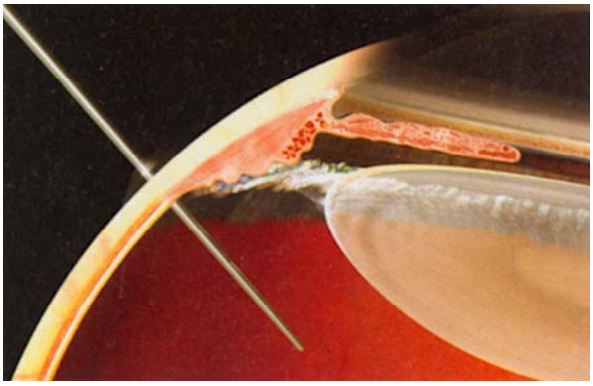

Abbildung 4: Die Intravitreale Injektion wird über die Pars plana durchgeführt.

Heutzutage hat sich die intravitreale Injektion als Standardverfahren zur Therapie vieler Erkrankungen des hinteren Augenabschnittes durchgesetzt. Zur Anwendung kommen neben den Antibiotika, bei bakteriell bedingten Erkrankungen wie der Endophthalmitis (Cornut und Chiquet 2008; Sallam et al. 2008), auch Kortikosteroide beispielsweise beim diabetischen Makulaödem (Young et al. 2001; Jonas 2005) sowie Gefäßproliferationshemmer (Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Inhibitoren) bei der altersbedingten Makuladegeneration(Rosenfeld et al. 2005; Arevalo et al. 2009; Joussen und Bornfeld 2009).

Bei der intravitrealen Injektion wird das Medikament unter sterilen Bedingungen über die sogenannte „Pars plana“ in den hinteren Augenabschnitt eingebracht. In diesem Bereich, der sich in etwa 3,5 mm Abstand zum sogenannten Limbus (Übergangszone zwischen Hornhaut und Sklera) befindet, ist der hintere Augenabschnitt gut zugänglich, ohne die periphere Netzhaut zu beschädigen oder die Linse zu verletzen. Die Pars plana wird auch als Zugang bei der Vitrektomie (Glaskörperchirurgie) genutzt. Der Wirkstoff sammelt sich nach Injektion im Glaskörper, wodurch trotz der geringen Menge hohe lokale Konzentrationen erreicht werden (Beer et al. 2003; Chin et al. 2005).

Aufgrund der Kammerwasserzirkulation ist bei dieser Applikationsform eine relativ kurze Verweildauer von wenigen Wochen als eklatanter Nachteil vorherrschend. Insbesondere bei bereits zuvor vitrektomierten Augen fällt diese noch kürzer aus (Beer et al. 2003; Chin et al. 2005).

Drug Delivery Systeme am Auge

Schon früh wurde in der Literatur diskutiert, wie das Problem der kurzen Halbwertszeiten von Medikamenten in der Augenheilkunde zu umgehen sei (Shell 1984). Alle Bestrebungen sind derzeit darauf gerichtet, durch andere Applikationsformen, sogenannte Drug-Delivery-Systeme, eine deutlich längere intravitreale Verweildauer zu erreichen. Alle zur Zeit untersuchten Alternativen basieren auf dem Prinzip, dass ein Wirkstoff über einen definierten längeren Zeitraum aus einem Transporter in seine Umgebung diffundieren soll. Die Diffusionsgeschwindigkeit und Konzentration des Wirkstoffes wird dabei durch die Zusammensetzung des Transporters bestimmt. Je nach System können diese Transporter an unterschiedlichen Lokalisationen des Auges ein- bzw. angebracht werden (siehe Abb. 5). Man kann diese Systeme sowohl nach der Verweildauer im Auge in temporäre, biologisch abbaubare, als auch in dauerhaft im Auge implantierte, biologisch nicht abbaubare Systeme unterscheiden, als auch nach der Lokalisation der Implantate (z.B. subretinal, intravitreal,

suprachoroidal) unterscheiden (Lee und Robinson 2009). Bisher ist keines dieser Systeme in Deutschland zugelassen.

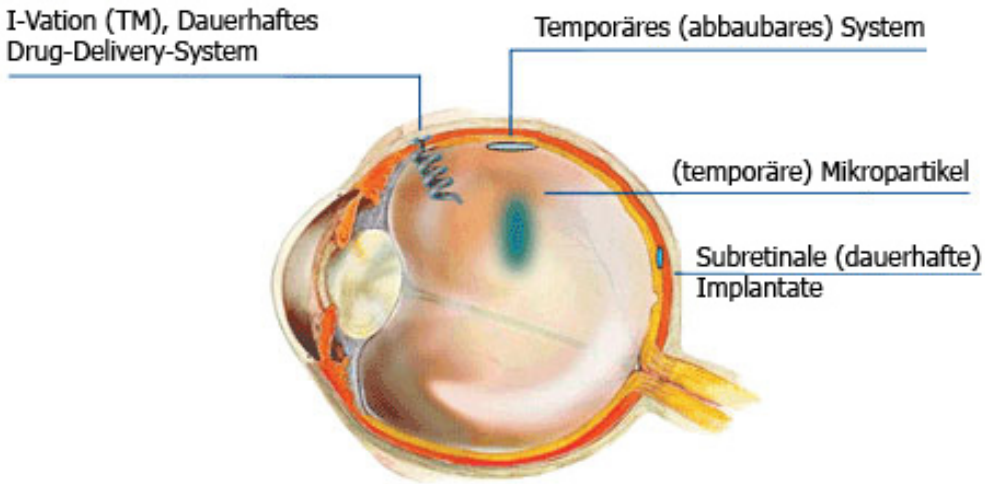

Abbildung 5: Schematische Übersicht der wichtigsten Drug-Delivery-Systeme im hinteren Augenabschnitt. Grafik modifiziert nach http://www.medgadget.com/archives/img/eye-screw.jpg (25.08.2009)

Zur Zeit stehen bisher klinisch keine ausreichenden Applikationswege zur Verfügung, um bei Erkrankungen des hinteren Augenabschnittes eine längere Halbwertszeit der intravitreal injizierten Medikamente zu erreichen. Zu den in Frage kommenden Erkrankungen gehören z.B. die komplizierte Netzhautablösung mit Narbenbildung (proliferative Vitreoretinopathie = PVR), die bakterielle Endophthalmitis, die Virusretinitis, die Uveitis, die proliferative diabetische Retinopathie und das diabetische Makula-Ödem, welche meist die Durchführung einer Glaskörper-Operation (Vitrektomie) mit Glaskörperersatz (okuläre Endotamponade) erfordern (Ikeda et al. 2000; Becker und Davis 2005; Heimann et al. 2008; Mendrinos et al. 2008) (siehe nächstes Kapitel).

Vitrektomie und okuläre Tamponadesubstanzen

Die Ursprünge der Glaskörper-Operationen liegen am Anfang der 1970er Jahre (Machemer et al. 1971; Machemer und Norton 1972). Bei dieser Operationstechnik wird über drei Zugänge im Bereich der Pars plana der Glaskörper entfernt. Anfänglich wurde nur die optische Achse freigelegt und der Glaskörper durch isotone Flüssigkeit ersetzt. Im weiteren chronologischen Verlauf wurde begonnen, den entfernten Glaskörper durch eine Tamponade zu ersetzen. Die Grundidee hierbei war es, einen gleichwertigen Ersatz für den Glaskörper im Auge zu finden.

Dieses Ziel wurde jedoch nie erreicht, so dass man sich daher auf die Funktion der Netzhauttamponade konzentrierte. Die Indikationen reichen von der einfachen bis zur schweren und traktiven Ablatio retinae (Haimann et al. 1996; Becker und Davis 2005; Heimann et al. 2008; Mendrinos et al. 2008; DeCroos et al. 2009; Kumagai et al. 2009).

Prinzipiell lassen sich auch heute zwei Formen, nämlich die gasförmigen von den flüssigen Tamponaden, unterscheiden.

Auf die gasförmigen Endotamponaden soll in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden. Als flüssige Endotamponade steht das Silikonöl seit Mitte der siebziger Jahre zur Verfügung (Grey und Leaver 1979; Haut et al. 1980; Engelmann und Herbrig 2008).

Silikonöl als Glaskörperersatz und Medikamententräger

Silikonöl wird seit drei Jahrzehnten in der Glaskörperchirurgie besonders bei komplizierten Erkrankungen und Verletzungen des hinteren Augenabschnittes und der Netzhaut breit angewendet. Das Silikonöl füllt dabei nach Eingabe am Ende der Vitrektomie die hintere Augenkammer fast vollständig aus. Es ist etwas leichter als Wasser und daher bildet sich zwischen dem Öl und der Netzhaut eine schmale wässrige Sichel aus Kammerwasser. Bereits mehrfach wurde diskutiert, ob Silikonöl als Träger für bestimmte Wirkstoffe dient, und diese in die umgebende dünne Kammerwasserschicht abgeben könnte (Kralinger et al. 2001; Pastor et al. 2008), da nicht nur die mechanische Tamponade der Netzhaut durch das Silikonöl, sondern auch die zeitgleiche Behandlung der zugrundeliegenden Netzhauterkrankung sinnvoll wäre. Beide o.g. Arbeiten wurden vor dem Hintergrund durchgeführt, die flüssige Tamponade Silikonöl als Medikamententräger einzusetzen. In der Arbeit von Kralinger et al. (2001) wurde Acetylsalicylsäure mit dem Öl vermischt und die Abgabekinetik untersucht. Pastor et al. (2008) überprüften die Löslichkeit von Kortikosteroiden in der Öl-Tamponade.

Da die Datenlage auf diesem Gebiet äußerst spärlich ist, greift die vorliegende Arbeit die wichtige Fragestellung auf, in welchem Maße Silikonöl als Transporter für eine intravitreal injizierte Wirkstoffgruppe mit einem breiten Anwendungsspektrum wie den Kortikosteroiden tauglich scheint. Ferner ist es die Absicht dieser Forschungsarbeit, generelle Interaktionen zwischen den Kortikosteroiden und Silikonöl im Hinblick auf die derzeitige Literatur (Beer et al. 2003; Chin et al. 2005; Jonas 2005) zu untersuchen und Hinweise darauf zu geben, inwiefern sich diese Stoffe möglicherweise in ihrer Anwesenheit gegenseitig beeinflussen bzw. miteinander interagieren.

Als Vertreter der Kortikosteroide sollen in dieser Arbeit Triamcinolon und Dexamethason zur Anwendung kommen. Besonders Triamcinolon hat sich in den letzten Jahren bei der Behandlung verschiedener okulärer Erkrankungen im Hinblick auf eine längerfristige Wirkung bewährt (Danis et al. 2000; Jonas et al. 2001; Jonas und Sofker 2001; Young et al. 2001; Greenberg et al. 2002; Ip und Kumar 2002; Martidis et al. 2002; Benhamou et al. 2003; Conway et al. 2003; Jonas et al. 2003; Jonas et al. 2004; Jonas 2005; Sivaprasad et al. 2006; Gillies et al. 2009; Sohn et al. 2009).

2 ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Arbeit soll Silikonöl als Trägersystem für die antiinflammatorischen Kortikosteroide Triamcinolon und Dexamethason untersucht werden.

Die quantitative Erfassung der in Silikonöl gelösten und in die wässrige Phase freigegebenen Wirkstoffmenge ist Voraussetzung für eine Bewertung der klinischen Einsetzbarkeit einer Silikonöl-Wirkstoff-Kombination.

Darüberhinaus sollen die Interaktionen zwischen Wirkstoff und Silikonöl beleuchtet werden.

In drei Teilversuchen sollen daher folgende Fragen beantwortet werden:

I. **Wie hoch ist die tatsächlich in Silikonöl gelöste und in die wässrige Phase freigegebene Menge Wirkstoff?**

II. **Kommt es zu einer Diffusion der in der wässrigen Phase gelösten Wirkstoffe zurück in das Silikonöl?**

III. **Wie verhalten sich ungelöste Wirkstoff-Kristalle in Wasser bei Anwesenheit von Silikonöl? Kommt es ggf. zu einer Depotbildung zwischen der öligen und wässrigen Phase?**

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 VERWENDETE METHODE

Für die vorliegenden Fragstellungen müssen folgende Anforderungen an die Methode erfüllt sein. Sie muss:

- qualitative Aussagen zu den Wirkstoffen Dexamethason und Triamcinolon-Acetonid treffen können und eine klare Differenzierung erlauben.
- quantitative Aussagen zu den Konzentrationen der Wirkstoffe im zweistelligen Nanogrammbereich bei niedriger Nachweisgrenze zulassen.
- präzise und einfach wiederholbar sein.

In Anlehnung an eine bereits publizierte Methode (Koupai-Abyazani et al. 1995), wurde in dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, welches diese Anforderungen erfüllt.

Diese modifizierte Methode wurde nach folgenden, in der chemischen Analytik gängigen Kriterien (Kromidas 1999), validiert:

- Linearität
- Präzision
- Richtigkeit/Wiederholbarkeit
- Nachweisgrenze.

Reverse-Phase-High-Pressure-Liquid-Chromatographie (HPLC)

In dieser Arbeit wurde ein Reverse-Phase-HPLC-System (de: Umkehrphase-HLFC) verwendet. Auf eine ausführliche Darstellung der HPLC-Systeme wird mit Verweis auf die aktuelle Literatur verzichtet. Der folgende Absatz liefert lediglich eine Übersicht.

Bei der Reverse-Phase-HPLC unterscheidet man eine polare, mobile (Eluenten, Laufmittel) von einer unpolaren, stationären Phase (Säulenfüllung) (*vgl. Normal-Phase-HPLC: unpolare, mobile mit polarer, stationärer Phase*). Die mobile Phase dient als Träger für die Probe und beeinflusst durch ihre Wechselwirkungen mit polaren Gruppen der

Einzelsubstanzen in der Probe deren Affinität zu der stationären Phase. Die Eluenten (z.B. Acetonitril und H_2O) inklusive Probe durchlaufen mit Hochdruck die stationäre Phase (modifiziertes Kieselgel). Je nachdem, wie stark die einzelnen Bestandteile der Probe mit der stationären Phase wechselwirken, verbleiben diese länger oder kürzer in der Säule und treten dementsprechend zeitlich verzögert in den zugehörigen Detektor (z.B. UV/Vis-Detektor) ein, bei dem die Extinktion (Absorption) bei einer vorher festgelegten Wellenlänge gemessen wird.

Die Identifikation eines Analyten kann über die Retentionszeit (Zeit, die ein Analyt benötigt, um in dem Detektor zu erscheinen) erfolgen. Die Quantifizierung erfolgt entweder über die dem Analyten zugeordnete Peakfläche (Area under Curve) oder anhand der Peak-Höhe (Abb. 6).

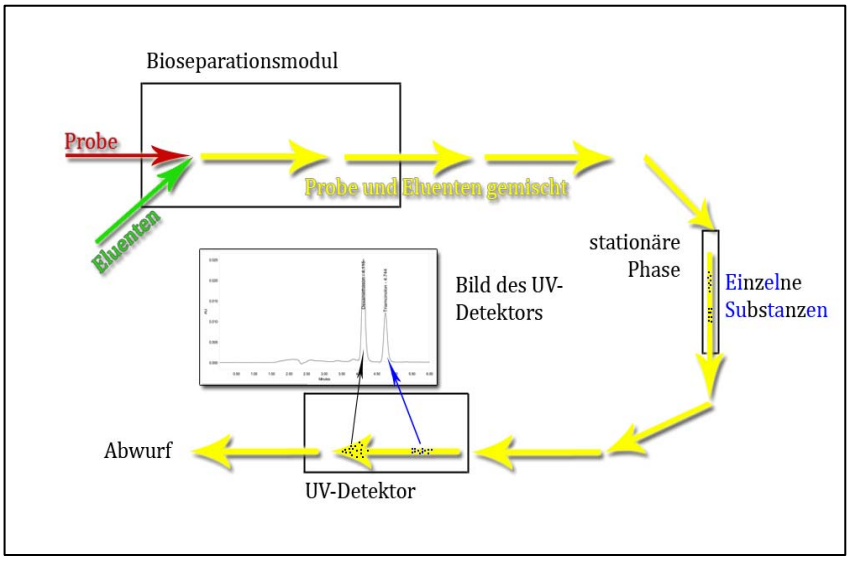

Abbildung 6: Stark vereinfachte, schematische Übersicht über die Bestandteile einer HPLC. Die Probe wird in den Eluentenstrom injiziert. Anschließend durchläuft die Probe die Säule und wird dort an der stationären Phase aufgrund verschiedener Wechselwirkungen in die Einzelbestandteile getrennt. Diese Bestandteile treten zu unterschiedlichen Zeiten in den UV-Detektor und führen zu einer Absorption. Anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten können die Substanzen voneinander unterschieden werden.

HPLC-Parameter

- Eluenten: H_2O/ACN, 1+1, isokratisch
- Flussrate: 1ml/min
- Injektions-Volumen: 10 µl
- Detektion: UV, 240 nm.

Zu erwartende Retentionszeiten:

- Dexamethason: 4,11 Minuten
- Triamcinolon-Acetonid: 4,76 Minuten

Die Aufzeichnung der Peaks erfolgte mit dem zu der HPLC gehörenden Programm EmpowerPro von Waters. Die Dokumentation der Messwerte wurde mit Microsoft Excel 2007 durchgeführt.

3.2 VALIDIERUNG DER METHODE

Herstellung der Analyt-Stammlösung

Die Stammlösung ist der Ausgangspunkt für die Herstellung der Einzelproben zur Methodenvalidierung. Die Herstellung der Proben erfolgte anschließend separat aus den beiden Stammlösungen. Bei einigen Validierungsschritten ist die Herstellung einer zweiten Stammlösung notwendig (*Präzision, Richtigkeit*). Soweit nicht anders erwähnt, sind alle Versuche bei einer Raumtemperatur von 23°C durchgeführt worden.

Zur Herstellung einer Stammlösung mit einer Konzentration von 5mg/l (=5µg/ml) werden 10mg des Wirkstoffes abgewogen. Anschließend erfolgt eine Auflösung in 2 Liter deionisiertem Wasser. Um eventuell noch vorhandene, ungelöste Kristalle in Lösung zu bringen, wird der Glaskolben bei Raumtemperatur (23°C) in ein Ultraschallbad gestellt. Nach ca. 10 Minuten wird die Lösung visuell auf verbliebenen Wirkstoff überprüft. Befinden sich noch ungelöste Kristalle in dem Glaskolben, wird der Vorgang solange wiederholt, bis diese vollständig in dem Wasser gelöst sind.

Herstellung der Proben

Im Nachfolgenden wird beschrieben, wie die einzelnen Proben für die Methodenvalidierungsparameter nach Linearität, Präzision und Richtigkeit hergestellt werden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wird aus den Ergebnissen der anderen Valdierungskriterien nach DIN 32645 errechnet.

Die Konzentrationen orientieren sich an den zu erwartenden Ergebnissen des ersten Teilversuches (Pastor et al. 2008). Für mögliche weitere Arbeiten, die auf dieser Methode basieren, wird ein Bereich von 10 – 1000 ng/ml gewählt.

Linearität

Die Linearität dient dem Nachweis der Proportionalität vom Messsignal gegenüber der Analytkonzentration. Auf dieser Basis kann mit einem Messsignal einer unbekannten Probe eine Aussage über deren Konzentration gemacht werden.

Von der oben beschriebenen Stammlösung werden sechsmal 50ml entnommen und in Glasbehälter gegeben. Anschließend werden aus jedem dieser sechs Glasbehälter sieben Proben hergestellt. Ausgehend von der ersten Probe (50ml, Konzentration 1µg/ml) wird eine Verdünnung entsprechend den nachfolgenden Tabellen (Tabelle 1 und 2) vorgenommen.

Anteil SL (Vol. SL [ml])	***Anteil H_2O (Vol. H_2O [ml])***	***Wirkstoff-Konz. [ng/ml]***
100% (10)	0% (0)	1000
75% (6)	25% (2)	750
50% (5)	50% (5)	500
25% (2)	75% (2)	250
10% (1)	90% (9)	100
5% (1)	95% (19)	50
2,5% (0,5)	97,5% (19,5)	25

Tabelle 1 : Vorbereitung der Proben zur Validierung der Linearität im Bereich 1000ng/ml - 25ng/ml. Jede Probe wird dreimal vorbereitet. SL=Stammlösung

Anteil SL (Vol. SL [ml])	***Anteil H_2O (Vol. H_2O [ml])***	***Wirkstoff-Konz. [ng/ml]***
8% (0,8)	92% (9,2)	80
7% (0,7)	93% (9,3)	70
6% (0,6)	94% (9,4)	60
5% (0,5)	95% (9,5)	50

4% (0,4)	96% (9,6)	40
3% (0,3)	97% (9,7)	30
2% (0,2)	98% (9,8)	20
1% (0,1)	99% (9,9)	10

Tabelle 2 : Vorbereitung der Proben zur Validierung der Linearität im Bereich 80ng/ml – 20ng/ml. Jede Probe wird dreimal vorbereitet. SL=Stammlösung

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze gibt die Konzentration an, ab welcher der Analyt qualitativ erfasst werden kann (Kromidas 1999). Die Bestimmungsgrenze entspricht der kleinsten quantitativ erfassbaren Größe des Analyten (Kromidas 1999).

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der HPLC, bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode, kann gemäß einem mathematisch zugrundeliegenden Modell nach DIN 32645 aus den erhobenen Daten für die Linearität errechnet werden. Hierfür wird das Statistikprogramm STATIST verwendet.

Präzision

Die Präzision entspricht der Reproduzierbarkeit eines Messergebnisses. Hierbei wird dieselbe Probe mehrmals gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen und statistisch bewertet.

Die Probenvorbereitung gleicht der oben beschriebenen; die Konzentrationen werden angepasst (siehe Tabelle 3).

Anteil SL (Vol. SL [ml])	***Anteil H_2O (Vol. H_2O [ml])***	***Wirkstoff-Konz. [ng/ml]***
10% (1)	90% (9)	100

Tabelle 3: Einzelne Probe zur Validierung der Präzision des Messgerätes. Mit dieser Probe werden fünf Messungen durchgeführt.

Richtigkeit

Mit der Richtigkeit soll herausgefunden werden, ob nach Kalibrierung der Messung an einer

Kalibriergeraden der gemessene Wert mit dem wahren Wert übereinstimmt**.** Die Bestimmung der Richtigkeit wird abhängig von den Versuchen nur bei aussagekräftigen Ergebnissen (Nachweis einer Diffusion des Wirkstoffes vom Öl in die wässrige Phase) durchgeführt.

Bei der Richtigkeit muss eine neue Analyt-Stammlösung hergestellt werden. Anschließend werden sechs Proben mit 100 ng/ml hergestellt. Diese werden mittels HPLC gemessen.

Vorbereitung des Extraktionsmittels

Das Extraktionsmittel Ethylacetat ist ein gutes Lösungsmittel für TACA und DEXA und nur in sehr geringem Maße mit Wasser mischbar. Diese Eigenschaft wird genutzt, um den Wirkstoff aus dem deionisierten Wasser zu extrahieren und nach der Phasentrennung zu konzentrieren. Die Methode, eine Extraktion mit Ethylacetat vorzunehmen, ist in der Literatur beschrieben (Koupai-Abyazani et al. 1995).

Um Verluste in der Extraktionsausbeute zu berücksichtigen, wird das Extraktionsmittel mit dem jeweils anderen Wirkstoff als internem Standard markiert (*siehe Tabelle 4, Abbildung 7*).

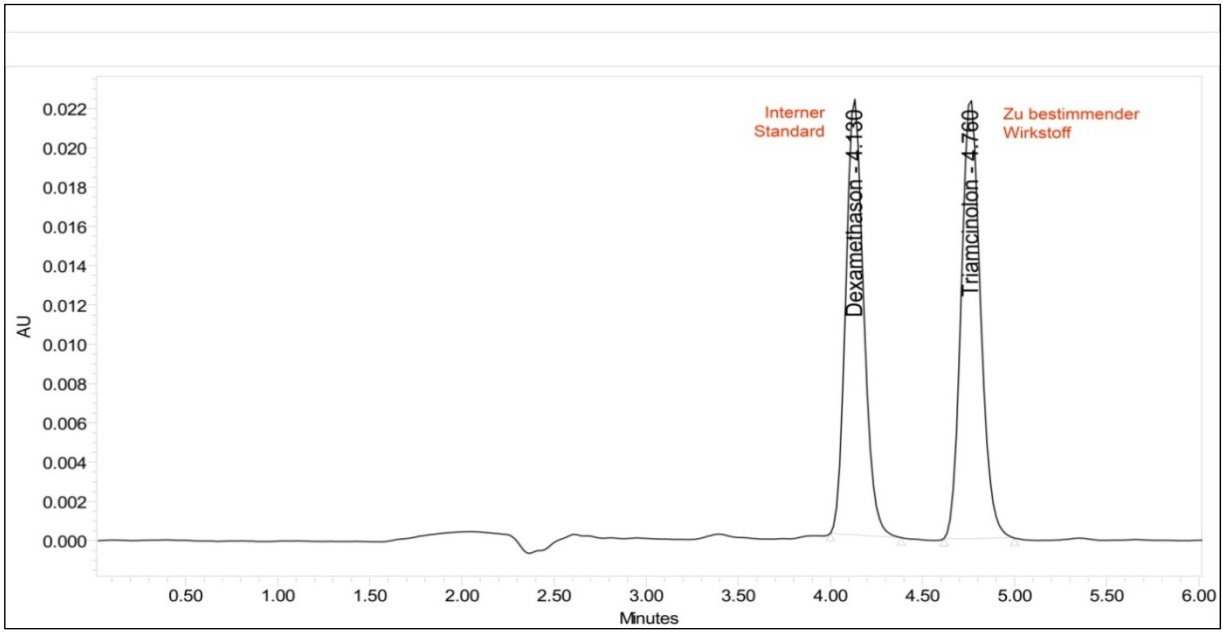

Abbildung 7: Beispiel-Chromatogramm mit Dexamethason als internem Standard und Triamcinolon-Acetonid als gesuchtem Wirkstoff. In diesem Fall sind beide Konzentrationen ähnlich. AU=Absorption Units.

Da Dexamethason als interner Standard für die erste Bestimmung der Linearität bei Triamcinolon verwendet wird, muss der Wirkstoff vorher in dem entsprechenden Bereich (250ng/ml – 1300ng/ml) selbst auf Linearität überprüft werden (siehe Ergebnisse).

Die Signalintensität (Peakhöhe oder Fläche) des internen Standards sollte im Idealfall bei

jeder Probe gleich sein. Da aber ein Extraktionsverlust auch zu einer äquivalenten und proportionalen Reduzierung des internen Standards führt, kann dieser - unter Berücksichtigung einer Kalibrierung mit bekannten Größen und eigener Validierung auf Linearität im zu erwartenden Messbereich – als Korrekturfaktor für den zu bestimmenden Wirkstoff in der Stammlösung verwendet werden.

Hierfür muss die Konzentration des zu bestimmenden Wirkstoffes mit folgendem Korrekturfaktor multipliziert werden:

$$KF = \frac{I_{(k)}}{I_{(g)}}$$

KF = Korrekturfaktor	$I_{(g)}$ = *Signal des internen Standards in der Probe*	$I_{(k)}$ = *Signal des internen Stds im Kalibrierstandard*

Wirkstoff in Stammlösung	***Interner Standard in Extraktionsmittel***
Triamcinolon-Acetonid	Dexamethason
Dexamethason	Triamcinolon-Acetonid

Tabelle 4 : Darstellung des Wirkstoffes des internen Standard bei entsprechendem Wirkstoff in der Stammlösung

10mg des jeweils nicht zu bestimmenden Wirkstoffes (siehe Tabelle 4) werden als interner Standard in 50ml EtAc gelöst ($= 200\ \frac{\mu g}{ml}$ *). Anschließend wird die Probe um* $\frac{1}{200}$ *auf* $1\ \frac{\mu g}{ml}$ *verdünnt.*

Konzentrierung der Proben

Durch Konzentrieren kann die Nachweis-Empfindlichkeit der Methode erhöht werden, indem die gleiche Menge Wirkstoff in einem kleineren Flüssigkeitsvolumen gelöst wird.

5ml jeder Probe werden mit jeweils 5ml Ethylacetat (+ internem Standard) in ein Reagenzglas gegeben. Mittels Schüttler werden die beiden Phasen für etwa eine Minute durchmischt. Im Anschluss wird die komplette obere Phase (Ethylacetat + int. Standard + zu bestimmender Wirkstoff) in ein neues Reagenzglas abpipettiert. Anschließend wird die organische Phase im Stickstoffstrom bei 65°C bis zur Trockene eingeengt.

Nachdem das Ethylacetat bei allen Proben vollständig verdampft ist, wird jede Probe in 500µl Methanol (MeOH) wieder gelöst (Verhältnis 10:1). Abschließend werden 250µl entnommen und in der HPLC gemessen.

3.3 TEIL-VERSUCHE

3.3.1 SILIKONÖL ALS MEDIKAMENTENTRÄGER

Um die verwendeten Wirkstoffe Triamcinolon und Dexamethason in Silikonöl zu lösen, muss zunächst eine Suspension aus Wirkstoff und Silikonöl hergestellt werden. Anschließend wird die Suspension filtriert, um Schwebstoffe, Partikel und Restkristalle aus dem Öl zu entfernen. Nach der Filtration werden jeweils äquivalente Mengen Silikonöl auf ein dynamisches und ein statisches Modell-Systems aufgeteilt, die Abgabekinetik gemessen und ausgewertet. 100ml Silikonöl werden mit 100mg Wirkstoff vermischt. Diese Suspension wird, mit Verweis auf die Gesetze der Fick'schen Diffusion (Abhängigkeit der Diffusion von der Zeit), für 14 Tage eingelagert. Nach 14 Tagen wird die Suspension mit Spritzenvorsatzfiltern (0,2µm) filtriert.

Anfertigen eines statischen und dynamischen Modell-Systems für den Wirkstoff-austausch

Im statischen Modell-System soll die Abgabekinetik bei gleichbleibender Austauschfläche überprüft werden und einen Hinweis darauf liefern, ob es zu einer schnellen Diffusion durch die komplette ölige Phase kommen wird.

Dafür werden in fünf Glasbehältern jeweils 5ml deionisiertes Wasser (blau) mit 5ml Silikonöl (rot) überschichtet. Die Glasbehälter werden mit einem Teflon-Deckel verschlossen und anschließend mit der verschlossenen Öffnung nach unten zur endgültigen Phasentrennung bei 2000U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Es kommt zu keiner Vermischung der Phasen (siehe Abbildung 8, zum besseren Verständnis sind die Phasen nachträglich digital eingefärbt worden).

Das dynamische System dient dem Zweck, innerhalb kürzester Zeit die maximale Konzentration des Wirkstoffes aus dem Silikonöl herauszulösen, um einen Eindruck zu vermitteln, welche Gesamtmenge sich in Silikonöl löst. Hierbei wird es nach dem Vorbild des statischen Systems angefertigt. Nun wird der Glasbehälter für 24h geschüttelt, um die Austauschfläche zu maximieren. Nach einer zweiten Schüttelphase (24h) wird die Konzentration erneut gemessen und mit den vorherigen Ergebnissen verglichen.

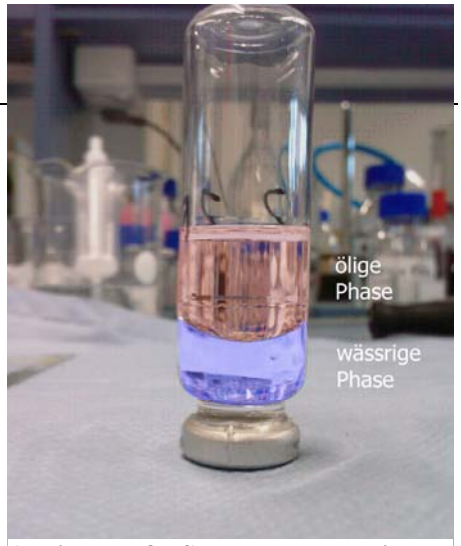

Abbildung 8: System zum statischen Austausch; Erklärung im Text.

Die Probenentnahme erfolgt alle 24 Stunden. Es werden 3ml entnommen und für die Analyse vorbereitet. Anschließend wird die entnommene Probenmenge durch neues Wasser ersetzt. Um einen systematischen Fehler bei der Auswertung zu vermeiden, wird die Konzentration entsprechend umgerechnet. Die Proben werden, wie in der Methodenvalidierung beschrieben, konzentriert und danach in der HPLC auf ihren Wirkstoffgehalt analysiert.

Um einen systematischen Fehler zu vermeiden, muss bei der Auswertung die gemessene Konzentration (Konzentration der Probe zum Zeitpunkt der Entnahme) nach jeder Probenentnahme auf die ursprüngliche Konzentration umgerechnet werden. Zusätzlich muss die Kalibrierung aus der Kalibriergeraden mit einbezogen werden.

$$c_{(WS)} = \frac{KF \times E_{(WS)}}{m} - \frac{2}{5} \times A$$

$c_{(WS)}$: *Wirkstoff-Konzentration*	*KF : Korrektur-faktor*	$E_{(WS)}$ *: Signal-Intensität der laufenden Probe*	*m : Steigung der Kalibriergeraden*	*A : Konzentration d. vorherigen Probe*

3.3.2 Silikonöl als Affektor auf die Halbwertszeit der Kortikosteroide

Zunächst wird eine mit TACA und DEXA angereicherte Stammlösung der Konzentration 1µg/ml hergestellt. Diese Lösung wird auf ihren Wirkstoffgehalt zum Zeitpunkt 0 untersucht.

Anschließend wird diese Stammlösung mit reinem Silikonöl überdeckt. Der Aufbau entspricht dem statischen System in Teilversuch 1, mit dem Unterschied, dass die Wirkstoffe in der wässrigen Phase und nicht in der öligen Phase gelöst sind. Die Glasbehälter werden

verschlossen und vorsichtig mit der Öffnung nach unten gelagert (siehe Abbildung 9). Schließlich wird in regelmäßigen Abständen der Konzentrationsgehalt der Stammlösung in der HPLC analysiert und ausgewertet.

Aus jedem Glasbehälter wird alle 24h jeweils eine Probe von 250µl Lösung (Wirkstoff/H_2O) entnommen und zur Analyse der Konzentration in die HPLC gegeben. Anschließend wird die zur Analyse entnommene Probenmenge durch neues Wasser ersetzt.

Die Formel muss entsprechend angepasst werden:

$$c_{(ws)} = \frac{B}{0{,}95 \times A} \times C$$

$c_{(ws)}$: Wirkstoff-Konzentration	*B : Messergebnis laufender Probe*	*A : Messergebnis vorheriger Probe*	*C : Erstes Messergebnis der Reihe*

3.3.3 VERHALTEN DER WIRKSTOFFKRISTALLE BEI ÜBERSÄTTIGUNG

Im folgenden Versuch wird eine mit Wirkstoff übersättigte wässrige Suspension hergestellt (Kristallbildung). Im Anschluss daran werden 20ml dieser Suspension in einen Glasbehälter gegeben und mit 10ml Silikonöl überdeckt.

Durch Magnetrühren der wässrigen Phase wird ein Absetzen der Kristalle am Gefäßboden verhindert (siehe Abbildung 9). Zur Auswertung wird das System alle 24h visuell überprüft und bewertet, ob und in welchem Maß sich die Wirkstoffkristalle aus der wässrigen Suspension zwischen den Phasen verteilen. Von dem finalen Zustand werden Fotos angefertigt.

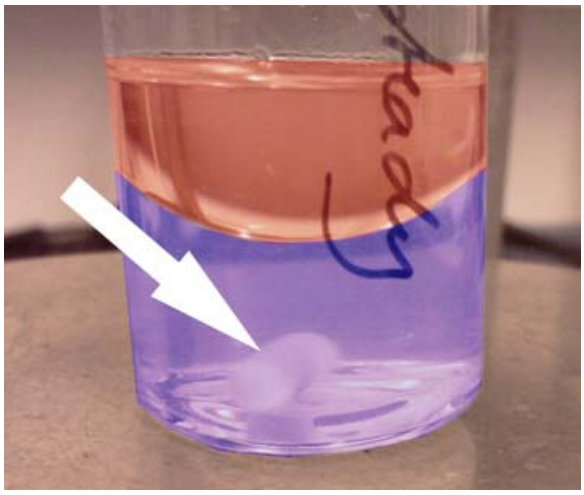

Abbildung 9: In-vitro-System mit mobilem (wässrige <u>Suspension</u> mit Wirkstoff, blau dargestellt)) und statischem (Silikonöl, rot dargestellt) Anteil (Phasen nachträglich digital eingefärbt). Der Pfeil markiert den Magnet-Rührer.

3.4 MATERIALIEN

Verwendete Substanzen

Endotamponade	Viskosität	Hersteller
Silikonöl	1000 mPas	Pharmpur (Königsbrunn)

Tabelle 5: Verwendete Endotamponade

Wirkstoff	CAS-Nummer	Hersteller
Triamcinolon-Acetonid	76-25-5	FAGRON (Barsbüttel)
Dexamethason-Acetat	1177-87-3	FAGRON (Barsbüttel)

Tabelle 6: Verwendete Wirkstoffe

Verwendete Chemikalien

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller
Ethylacetat ($CH_3COOC_2H_5$)	141-78-6	Merck (Darmstadt)
Methanol (CH_3OH)	67-56-1	Merck (Darmstadt)
Acetonitril (C_2H_3N)	75-05-8	Merck (Darmstadt)

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien

Verwendete Gerätschaften

Gerätschaft	Eigenname/Typ	Hersteller
HPLC-Anlage	Waters 2796	Waters (Eschborn)
HPLC Photodiode-Array-Detector	Waters 2996	Waters (Eschborn)

Analysewaage	CP324S-OCE	Sartorius (Göttingen)
Ultraschall-Bad, Sonorex	RK 510 H	Bandelin (Berlin)
Ultrafiltrations-Anlage	Ultra Clear UV plus	SG (Barsbüttel)
Reagenzglas-Heizblock	Dri-Block DB·3A	Techne (Jahnsdorf)
Reagenzglas-Vortexer	Reax 2000	Heidolph (Schwabach)
Zentrifuge	Rotofix 32	Hettich (Tuttlingen)
Kolbenhub-Pipette 0,25 – 25ml	Multipette ®	Brand (Wertheim)
Eppendorf-Pipette 0,1 – 1ml	Transferpette ®	Eppendorf (Hamburg)

Tabelle 8: Verwendete Gerätschaften

Verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	**Bemerkung**	**Hersteller**
Glasbehälter	10/20/50ml	VWR (Darmstadt)
Reagenzgläser	10/20 ml	VWR (Darmstadt)
Einwegspritzen	1/2/5/10/20 ml	B|Braun (Melsungen)
Einweg-Injektions-Kanüle	Sterican ®, 26G	B|Braun (Melsungen)
Spritzenvorsatzfilter 0,2µm	Minisart SRP-25	Sartorius (Göttingen)
HPLC-Mikro-Vials, 250µl	Low Volume Schraubbehälter	Wicom (Heppenheim)
Pipettenspitze	1ml	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitze	25ml	Eppendorf (Hamburg)

Tabelle 9: Verwendetes Verbrauchs- und Einweg-Material

4 ERGEBNISSE

4.1 METHODE

Linearität

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte ermittelt werden, ob Dexamethason als interner Standard für die Versuche mit Triamcinolon verwendet werden kann. Hierbei musste nur Dexamethason validiert werden, da Triamcinolon selbst durch die Validierung nach Linearität als interner Standard verwendet werden konnte.

Es zeigte sich dabei ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalintensität bei einem Korrelationskoeffizienten von >0,99 (siehe Tabelle 10).

Versuchsübersicht:	***Dexamethason***
Messbereich [ng/ml]	*0 – 1300*
Angesetzte Proben	*30*
Proben pro Konzentration	*3*
Verworfene Proben	*1*
Ergebnisse:	
Regressionsgerade:	$Y = 163.7 \frac{AU \times ml}{ng} \times X$
Korrelationskoeffizient r^2	***0,995***

Tabelle 10: Validierung der Linearität von Dexamethason für die Verwendung als interner Standard.

Die zweite Validierung sollte untersuchen, ob die Wirkstoffe bei den entsprechenden Konzentrationen Linearität aufweisen. Bei beiden Wirkstoffen wurde ein Korrelationskoeffizient von jeweils >0,99 festgestellt.

Versuchsübersicht:	***Triamcinolon***	***Dexamethason***
Messbereich [ng/ml]	10 – 1000	10 – 1000
Angesetzte Proben	45	45
Proben pro Konzentration	3	3
Verworfene Proben	3	0

Ergebnisse:		
Regressionsgerade:	$Y = 0,006 \frac{AU \times ml}{ng} \times X + 4616AU$	$Y = 164.1 \frac{AU \times ml}{ng} \times X + 4290AU$
Korrelationskoeffizient:	***0,999***	***0,997***

Tabelle 11: Validierung der Linearität von Dexamethason im möglichen Messbereich, siehe Abbildung 10.

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 10, Abbildung 11) ist der Bezug von Extinktion zu Wirkstoffkonzentration graphisch dargestellt. Zur besseren Übersicht ist eine Ausgleichsgerade hinzugefügt worden.

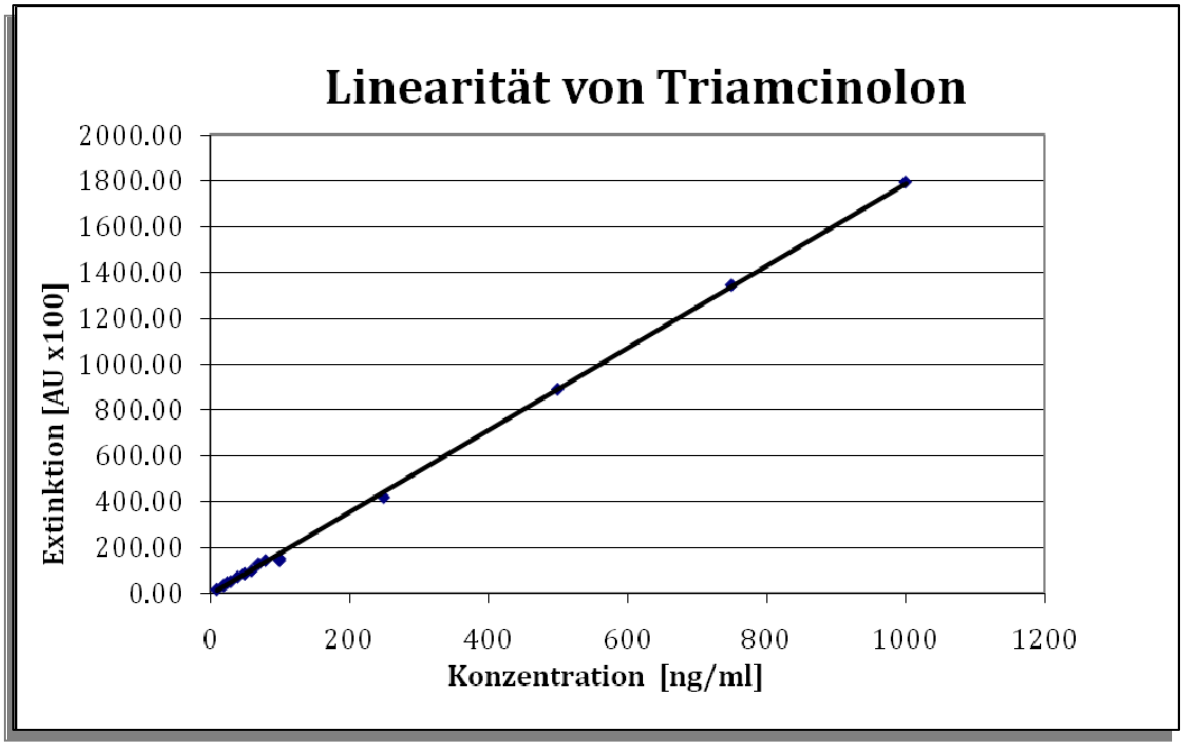

Abbildung 10: Darstellung aller Werte zur Linearitätsbestimmung von Triamcinolon. Zur Veranschaulichung der Linearität in dem entsprechenden Bereich wurde eine Ausgleichsgerade hinzugefügt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen, auf der Ordinate die Extinktionswerte eingetragen.

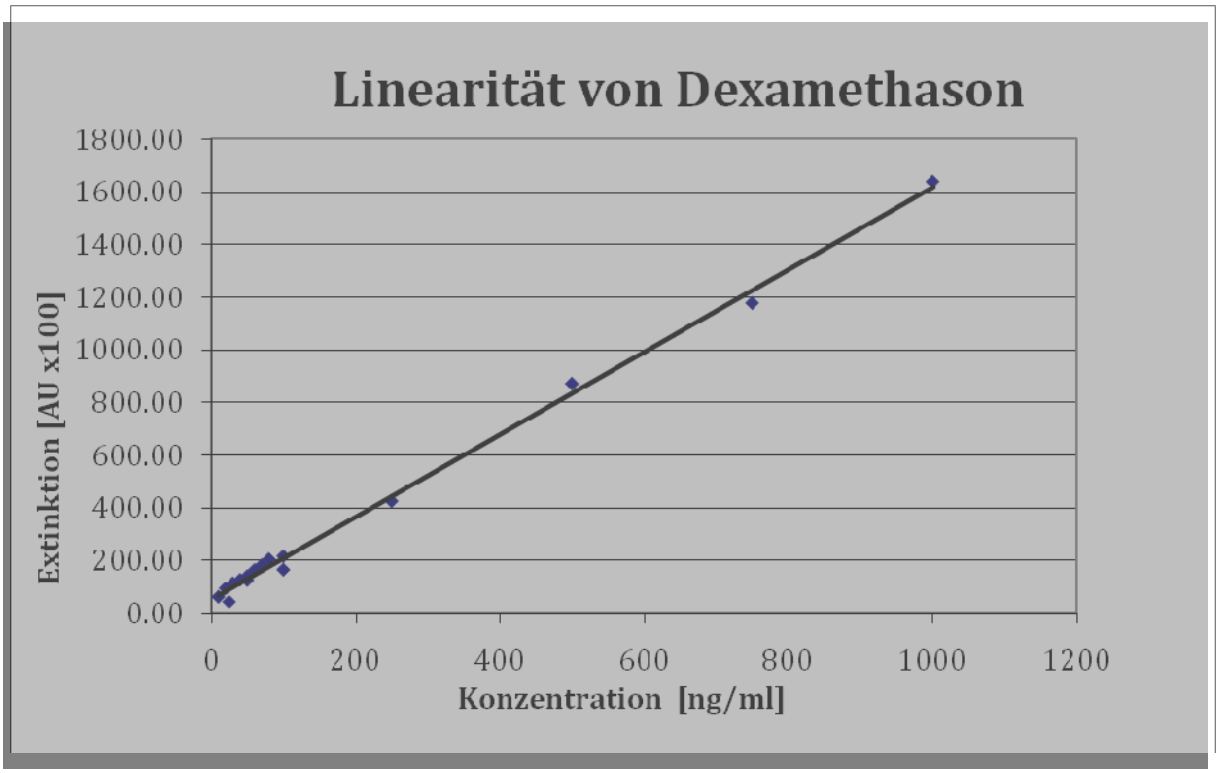

Abbildung 11: Darstellung aller Werte zur Linearitätsbestimmung von Dexamethason. Zur Veranschaulichung der Linearität in dem entsprechenden Bereich wurde eine Ausgleichsgerade hinzugefügt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen, auf der Ordinate die Extinktionswerte eingetragen.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 32645 errechnet (siehe hierzu auch Material und Methoden-Teil). Hierfür wurden 16 von insgesamt 24 angesetzten und analysierten Proben im Konzentrationsbereich 10 – 80 ng/ml ausgewählt. Von jeder Konzentration gab es mindestens zwei Proben.

Als Ergebnisse konnten eine Nachweisgrenze von 4,5 ng/ml , eine Erfassungsgrenze von 9,087 ng/ml, eine angenäherte Bestimmungsgrenze (N) von 15,35 ng/ml und eine exakte Bestimmungsgrenze (E) von 15,229 ng/ml ermittelt werden (siehe Tabelle 12).

Versuchsübersicht:	***TACA***	***DEXA***
Messbereich [ng/ml]	*10 – 80*	*10 – 80*
Angesetzte Proben	*24*	*24*
Proben pro Konzentr.	*3*	*3*
Verwendete Proben	*16*	*16*

Signifikanzniveau	*95%*	*95%*
Ergebnisunsicherheit	*33%*	*33%*
Alpha-Fehler	*5%*	*5%*
Ergebnisse:		
Nachweisgrenze [ng/ml]	***3,643***	***4,534***
Erfassungsgrenze [ng/ml]	***7,287***	***9,087***
Bestimmungsgrenze (N)[ng/ml]	***12,429***	***15,351***
Bestimmungsgrenze (E)[ng/ml]	***12,330***	***15,229***

Tabelle 12:Ergebnisse der Errechnung der Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze.

Präzision

Die angesetzte Probe wurde fünfmal gemessen. Die relative Standardabweichung wurde dabei aus dem Mittelwert und dem Wert der absoluten Standardabweichung bestimmt (siehe Tabelle 13).

Versuchsübersicht:	***Triamcinolon***	***Dexamethason***
Messbereich [ng/ml]	***	*100*
Angesetzte Proben	***	*1*
Proben pro Konz.	***	*1*
Anzahl Messungen	***	*5*
Ergebnisse:		
Relative Standardabweichung:	***	***2,6%***

Tabelle 13: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung. Da die Präzision die Messgenauigkeit der Analysegeräte erfasst, wird hier auf eine Präzisionsbestimmung bei beiden Wirkstoffen verzichtet.

Richtigkeit

Dexamethason

Die Richtigkeit wurde anhand der Ergebnisse des 1. Teilversuches aufgrund des hohen Aufwandes der Versuche nur bei Bedarf ermittelt.

Bei Dexamethason war es daher (siehe unten) nicht notwendig, eine Richtigkeit zu ermitteln, da in dem ersten Teilversuch keine Ergebnisse zu verzeichnen waren.

Triamcinolon

Die Kalibrierung konnte nach erfolgreichem Nachweis des linearen Zusammenhangs durchgeführt werden. Zum einen diente sie der Prüfung der Richtigkeit, zum anderen kam sie bei den Teilversuchen zum Einsatz. Als Ergebnis wurde eine lineare Regression bei einem Korrelationskoeffizienten von >0,99 festgestellt (siehe Tabelle 14).

Versuchsübersicht:	***Triamcinolon***
Messbereich [ng/ml]	*0, 50, 500*
Angesetzte Proben	*3*
Proben pro Konzentration	*1*
Verworfene Proben	*0*
Ergebnisse:	
Regressionsgerade:	$Y = 150,1 \frac{AU \times ml}{ng} \times X$
Korrelationskoeffizient r^2	***1***

Tabelle 14: Ergebnisse der Kalibrierung.

In Abbildung 12 ist die Kalibriergerade abgebildet. Mit den Ergebnissen der Kalibriergeraden konnte nun die Richtigkeit bestimmt werden. Es wurden sechs Proben mit 100 ng/ml Wirkstoffkonzentration angesetzt. Im Mittel betrug der wahre Wert der sechs Proben 99,789 ng/ml. Das entspricht einer Richtigkeit von >99%. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

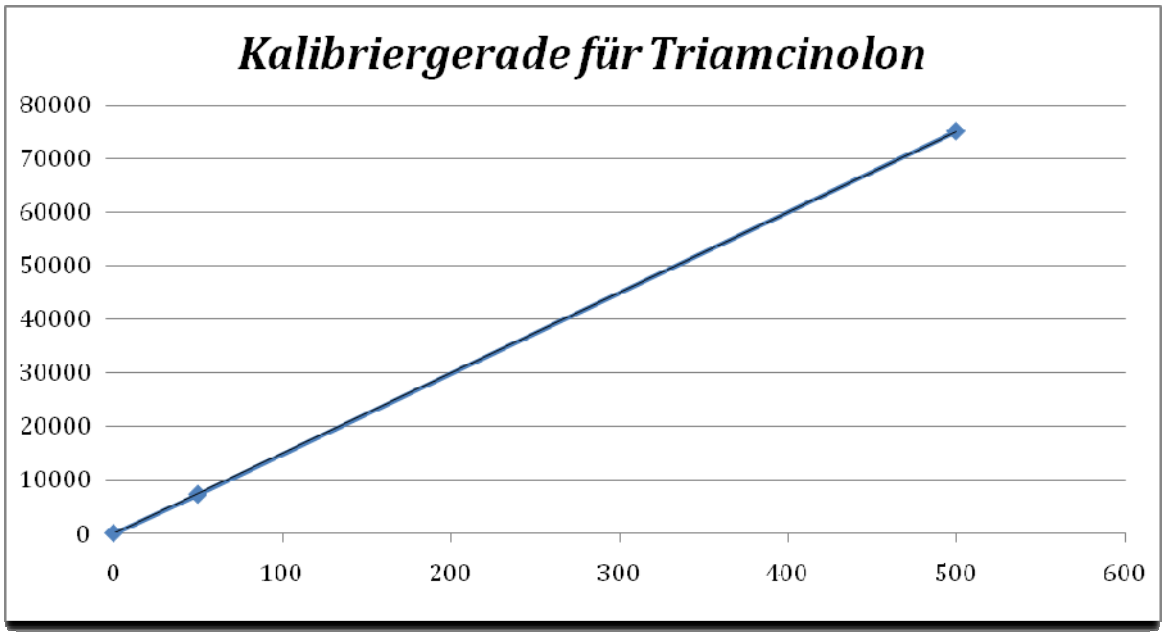

Abbildung 12: Kalibriergerade für Triamcinolon. Auf der Abszisse ist die Konzentration [ng/ml], auf der Ordinate die Extinktion [AUx100] aufgetragen.

Versuchsübersicht:	***Dexamethason***
Messbereich [ng/ml]	*100*
Angesetzte Proben	*6*
Proben pro Konzentration	*1*
Ergebnisse:	
Wahrer Mittelwert [$\frac{ng}{ml}$]	***99,789***
Rel. Standardabweichung :	***2,21%***

Tabelle 15: Ergebnisse der Richtigkeit

4.2 TEIL-VERSUCHE

4.2.1 SILIKONÖL ALS MEDIKAMENTENTRÄGER

Makroskopische Veränderungen

Nach Vermischung des Silikonöls mit dem Wirkstoff zeigt sich eine milchig-trübe, undurchsichtige Suspension, die starke Lichtstreuung verursacht. Nach anschließender Filtration mit 0,2-µm-Filtern präsentiert sich das Silikonöl klar und partikelfrei (siehe Abbildungen 13 a und b im Vergleich).

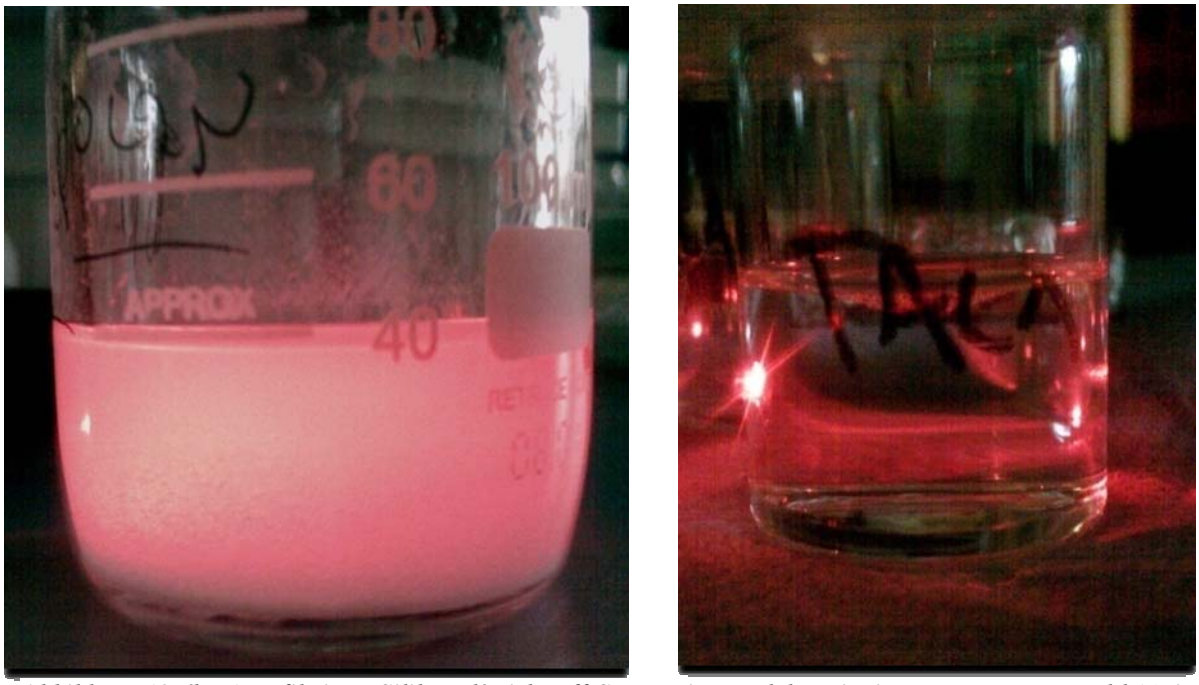

Abbildung 13a/b: a) unfiltrierte Silikonöl/Wirkstoff-Suspension, welche mit einem roten Laserstrahl (650 nm) beleuchtet wird, was zu einer starken Streuung des Lichtes führt. b) Suspension aus a) nach Filtration mit 0,2-µm-Filter. Bei Beleuchtung mit dem Laserstrahl zeigt sich nunmehr keine Streuung.

Diffusion in die wässrige Phase - Triamcinolon

Statisches System

Es wurden fünf Proben entsprechend dem beschriebenen Vorgehen im Material und Methoden-Teil angefertigt. Die Messungen erfolgten alle 24 Stunden mit Ausnahme der ersten beiden Messungen nach 2,5 und 17,5 Stunden. Zur Verdeutlichung sind die in Tabelle 16 aufgeführten Mittelwerte zusammen mit deren Standardabweichung angegeben. Eine graphische Darstellung liefert Abbildung 14.

Versuchsübersicht:	***Triamcinolon***
Probenanzahl	*5*
Anzahl Messungen(pP)	*5*
1. Messung	*Nach 2.5h*
Letzte Messung	*Nach 96h*
Verworfene Proben	*2*
Ergebnisse:	
Ausreißer	1
Extremwerte	1
1. Mittelwert 1 [ng/ml]	11,68 (± 3.47)
2. Mittelwert 2 [ng/ml]	43,03 (± 14,72)
3. Mittelwert 3 [ng/ml]	56,88 (± 21,62)
4. Mittelwert 4 [ng/ml]	63,40 (± 11,74)
5. Mittelwert 5 [ng/ml]	70,00 (± 18,80)

Tabelle 16: Ergebnisse des 1. Teilversuches.

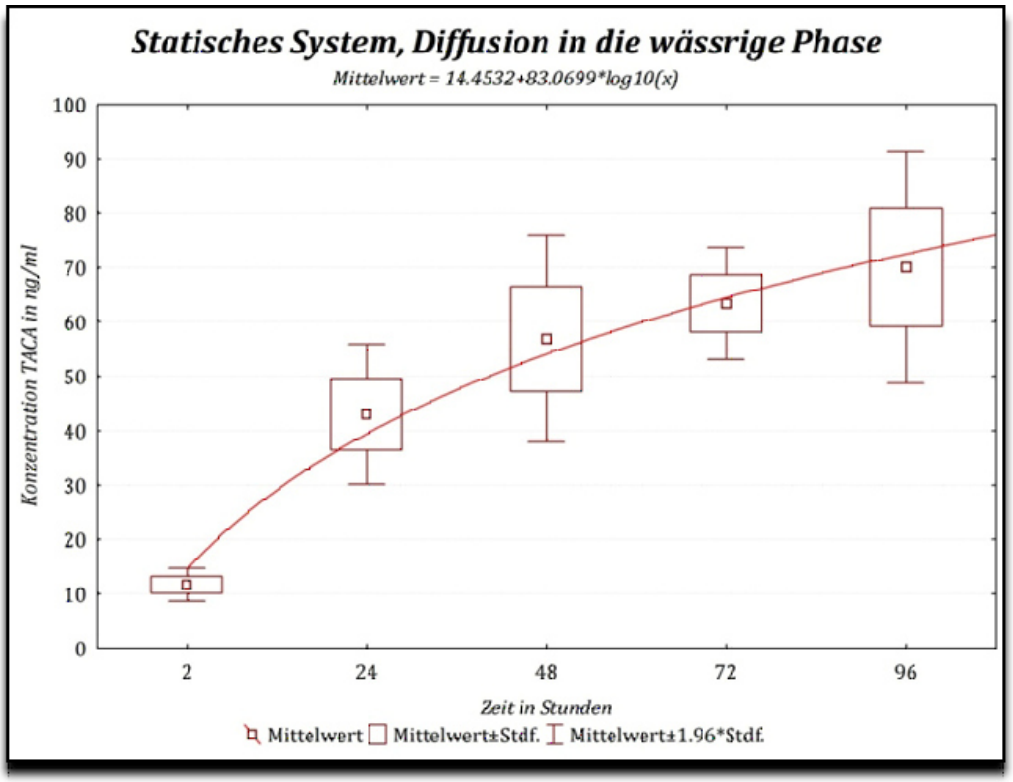

Abbildung 14: ***Darstellung der Ergebnisse des Diffusionsversuches von TACA aus der öligen in die wässrige Phase im statischen System. Die Darstellung erfolgt mittels Box-Whistler-Plot.***

Zusammenfassung

Beim statischen System zeigt die Diffusion eine signifikante Änderung über die Zeit (p = 0.00001). Jedoch ist diese Änderung nur auf einen signifikanten Sprung von Zeitpunkt 0 auf 24 Stunden zurückzuführen (s. Tabelle 17). Für eine geringere Streuung der Messergebnisse ist es erforderlich, die Stichprobenanzahl zu erhöhen. Eine Erhöhung ist aber aufgrund der Kosten und des Aufwandes der Versuche nicht im Rahmen dieser Dissertation möglich gewesen.

System	Vergleich	p
Statisch	0 vs 24	0.0042
	24 vs 48	0.11
	48 vs 72	0.40
	72 vs 96	0.75

Tabelle 17: Statisches System, zusammenfassende Auswertung

Dynamisches System

Die Proben wurden wie im statischen System vorbereitet. Die erste Messung erfolgte hier jedoch

erst nach 24, die letzte nach 72 Stunden. Bei Ermittlung des Mittelwertes, des Medianes und der Standardabweichung wurden keine Ausreißer oder Extremwerte festgestellt. Die Messungen nach 24 und 48 Stunden ergaben dieselben Ergebnisse (siehe Tabelle 17 und Abb. 15).

Versuchsübersicht:	***Triamcinolon***
Probenanzahl	*5*
Anzahl Messungen (pP)	*3 (alle 24h)*
1. Messung	*nach 24h*
Letzte Messung	*nach 72h*
Verworfene Proben	*0*
Ergebnisse:	
Ausreißer	0
Extremwerte	0
1. Mittelwert [ng/ml]	64,96 (±8,87)
2. Mittelwert [ng/ml]	68,97 (±8,37)
3. Mittelwert [ng/ml]	Siehe Mittelwert 2

Tabelle 18: Darstellung der Ergebnisse des dynamischen Systems.

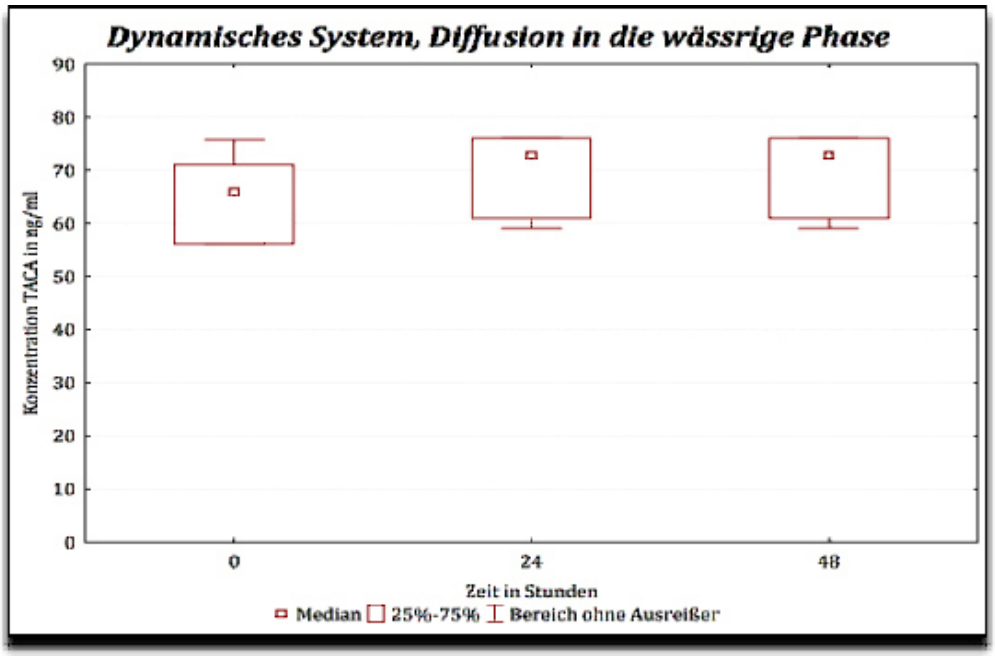

Abbildung 15: Grafische Darstellung der insgesamt aus dem Öl diffundierten Menge Triamcinolon-Acetonid im dynamischen System. Anstelle des Mittelwertes wurde der Median dargestellt. Bereits am dritten Tag konnte keine Abgabe mehr gemessen werden.

Zusammenfassung

Auch beim dynamischen System zeigt die Diffusion eine signifikante Änderung über die Zeit (p = 0.00007). Jedoch ist diese Änderung nur auf einen signifikanten Sprung von Zeitpunkt 0 auf 24 Stunden zurückzuführen (s. Tabelle 19). Um eine weitere Abgabe zu registrieren, müsste sowohl die Stichprobenanzahl als auch der Zeitraum, über den die Stichproben aufgezeichnet werden, erhöht werden.

System	Vergleich	p
Dynamisch	0 vs 24	0.00008
	24 vs 48	0.10
	48 vs 72	NA (identische Werte)

Tabelle 19: Dynamisches System, zusammenfassende Auswertung

Diffusion in die wässrige Phase - Dexamethason

Bei Dexamethason konnte weder im statischen noch im dynamischen System eine Diffusion von der öligen in die wässrige Phase festgestellt werden.

Die Versuche mit Dexamethason wurden unter gleichen Bedingungen wie diejenigen mit Triamcinolon durchgeführt. Fünf Proben wurden jeweils über 92 Stunden (statisches System) bzw. über 48 Stunden (dynamisches System) untersucht.

4.2.2 Silikonöl als Affektor auf die Halbwertszeit der Kortikosteroide

Diffusion in die ölige Phase

Bei der Probenmessung wurde eine Messpause von 72 Stunden berücksichtigt. Es konnten keine Ausreißer und keine Extremwerte festgestellt werden. Die Werte sind in AU x 10^4 in Tabelle 20 angegeben, die Standardabweichung ist in Klammern hinzugefügt. Abbildungen 16 und 17 in der Zusammenfassung verdeutlichen die Ergebnisse.

Versuchsübersicht:	***Triamcinolon***	***Dexamethason***
Probenanzahl	*35*	*35*
Anzahl Messungen	*6*	*7*
1. Messung	*Nach 0h*	*nach 0h*
Letzte Messung	*Nach 168h*	*nach 192h*
Verworfene Proben	*0*	*0*
Ergebnisse:		
Ausreißer	0	0
Extremwerte	0	0
1. Mittelwert *[AU×10^4]*	1,74 (±0,97)	1,67 (±0,65)
2. Mittelwert *[AU×10^4]*	1,72 (±0,79)	1,59 (±0,70)
3. Mittelwert *[AU×10^4]*	1,71 (±0,89)	1,58 (±1,30)
4. Mittelwert *[AU×10^4]*	1,81 (±1.51)	1,59 (±0,94)
5. Mittelwert *[AU×10^4]*	1,77 (±1,49)	1,66 (±0,98)
6. Mittelwert *[AU×10^4]*	1,68 (±1,16)	1,70 (±0,99)
7. Mittelwert *[AU×10^4]*	1,77 (±1,67)	***

Tabelle 20: Ergebnisse bei der Bestimmung der Diffusion von Wasser in Öl.

Zusammenfassung

Die Diffusion des Dexamethasons zeigt keine signifikante Änderung über die Zeit ($p = 0.983$). Auch beim Triamcinolon zeigt sich kein signifikanter Einfluss der Zeit ($p = 0.281$).

Es ist daher davon auszugehen, dass bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stichprobenumfang kein Wirkstoff in nachweisbarem Maße aus dem Wasser in das Silikonöl diffundiert ist (siehe Abb. 16, 17).

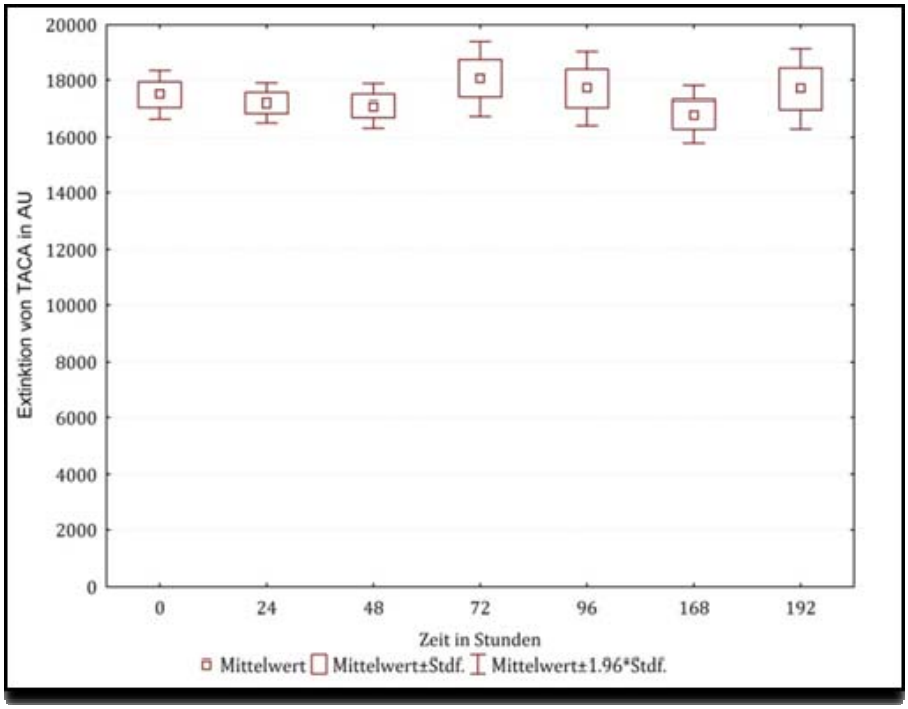

Abbildung 16: Extinktion von Dexamethason ohne Konzentrierung in einem Zeitraum von 192 Stunden.

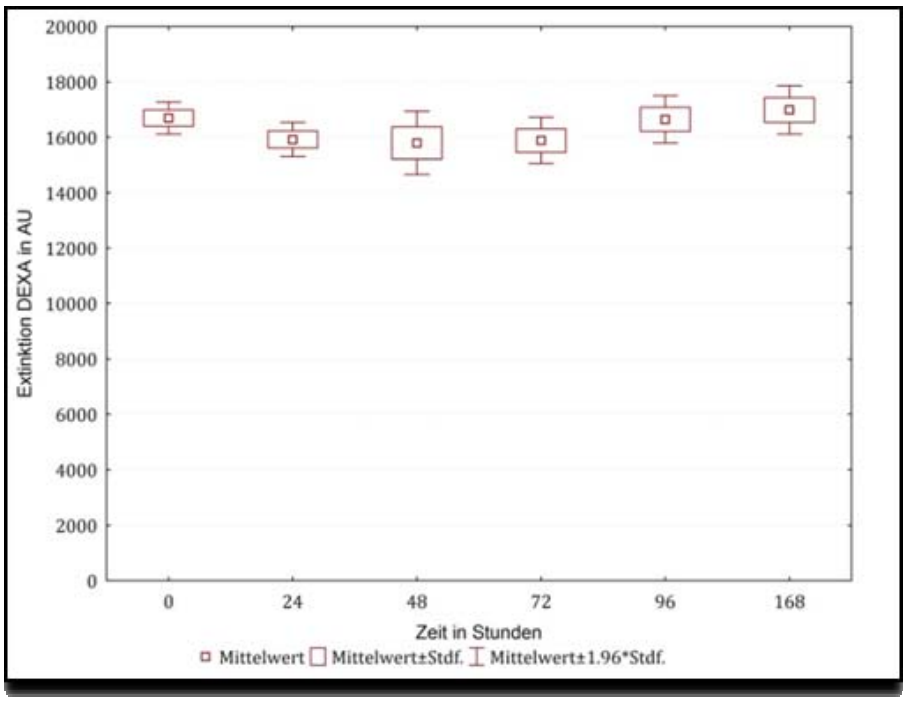

Abbildung 17: Extinktion von Triamcinolon-Acetonid ohne Konzentrierung in einem Zeitraum von 168 Stunden.

4.2.3 DAS VERHALTEN DER WIRKSTOFFKRISTALLE BEI ÜBERSÄTTIGUNG

Triamcinolon

Nach 24 Stunden konnte bei Triamcinolon eine deutliche Ansammlung von Wirkstoffkristallen zwischen der wässrigen und der öligen Phase festgestellt werden. Die Mehrzahl der Kristalle befand sich immer noch in der wässrigen Phase, wovon sich die besonders großen auf dem Glas-Gefäß-Boden abgesetzt haben. In der nachstehenden Abbildung 18 sind die Kristalle digital eingefärbt worden. Das Original-Foto (Abb. 19) ist zum Vergleich nebenstehend abgebildet.

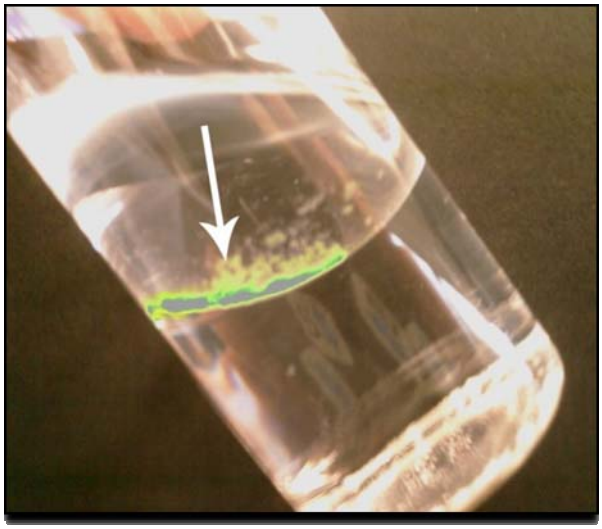

Abbildung 18: Akkumulation von Triamcinolon zwischen der wässrigen und der öligen Phase, digital eingefärbt.

Abbildung 19: Akkumulation von Triamcinolon zwischen den Phasen, Original-Foto.

Dexamethason

Unter gleichem Versuchsaufbau mit Dexamethason als Wirkstoff wurden die Probengefäße ebenfalls visuell überprüft. Bei Dexamethason zeigte sich keine Ansammlung des Wirkstoffes zwischen den Phasen. Die Mehrzahl der Kristalle hat sich nach 24 Stunden auf dem Boden des Glas-Gefäßes abgesetzt (Abb. 20).

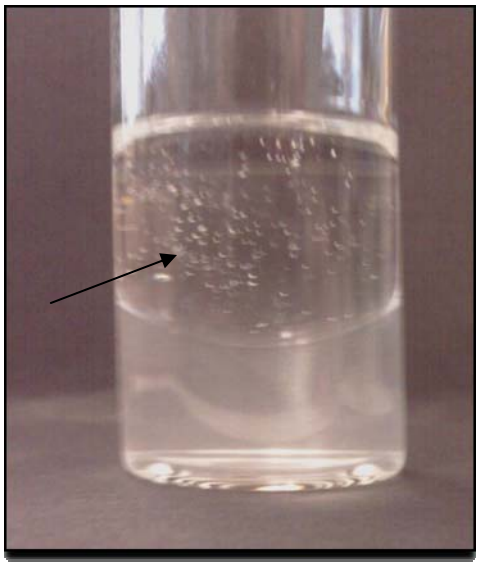

Abbildung 20: Bei Dexamethason ist keine Ansammlung der Kristalle zwischen den Phasen zu beobachten. Die wässrige Phase (unten) zeigt sich von den Kristallen eingetrübt. Die ölige Phase zeigt Lufteinschlüsse (Pfeil).

Zusammenfassung

Im Vergleich zu Dexamethason konnte bei Triamcinolon eine deutliche Ablagerung der Kristalle an der Phasengrenze Wasser-Öl festgestellt werden. Bei Dexamethason dagegen kam es nach 24

Stunden lediglich zu einem Absetzen der Kristalle am Gefäßboden. Für die klinische Anwendung kann angenommen werden, dass sich Triamcinolon wesentlich deutlicher an der Phasengrenze absetzt als Dexamethason.

5 DISKUSSION

5.1 BEWERTUNG DER METHODE

Linearität

Von der amerikanischen Arzneimittelbehörde (Federal Drug Administration = FDA) wurde in einer 2001 veröffentlichten Leitlinie nahegelegt, dass die Linearität einer Analyse möglichst einen gegen +1 strebenden Korrelationskoeffizienten [r] aufweisen (1 = perfekte Linearität) sollte, um eine Proportionalität des Detektorsignales zur Wirkstoffkonzentration aufzuzeigen. In dem Verfahren zur Validierung der Linearität hat sich sowohl bei Dexamethason im Bereich von 0 - 1300ng/ml (r > 0,997) als auch bei Triamcinolon im Bereich von 0 – 1000ng/ml (r > 0,999) eine deutlich lineare Regression bestätigt. Ein Korrelationskoeffizient von +1 bedeutet in diesem Fall, dass bei Annahme einer linearen Regression, von 100 Werten nahezu jeder Wert auf der Ausgleichsgeraden liegt. Der positive Index implementiert, dass jede Verdopplung der Konzentration des Wirkstoffes auch mit einer Verdopplung der Extinktion einhergeht (siehe Abbildung 21).

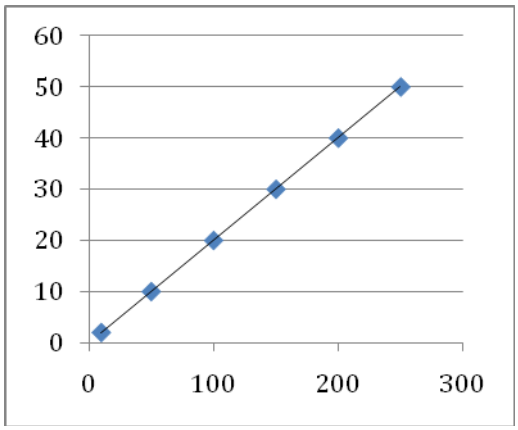

Abbildung 21: Korrelationskoeffizient von +1.

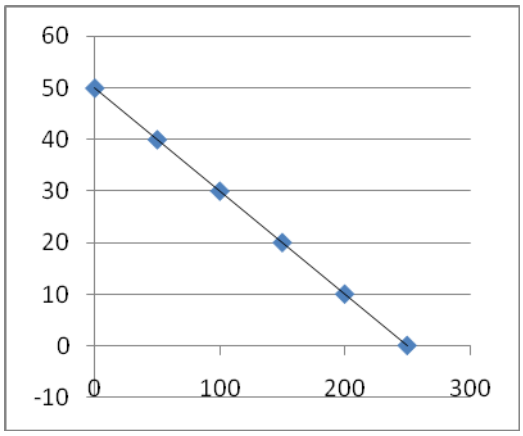

Abbildung 22: Korrelationskoeffizient von -1.

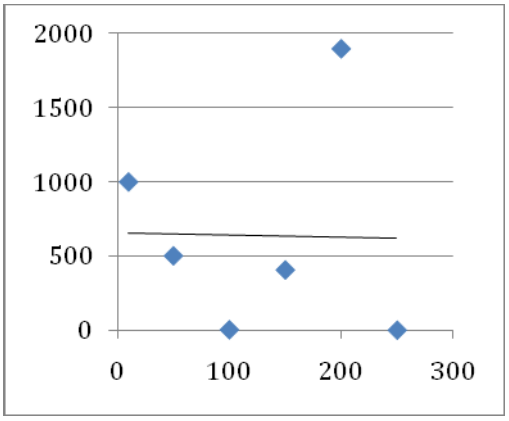

Abbildung 23: Korrelationskoeffizient von 0.

Ein negativer Index vor der 1 würde dabei aussagen, dass jede Verdopplung der

Konzentration mit einer Halbierung der Extinktion einherginge (siehe Abbildung 22). Bei einem Korrelationskoeffizienten von 0 besteht keine lineare Beziehung zwischen Wirkstoffkonzentration und gemessener Extinktion (siehe Abbildung 23). Grundsätzlich ist anzumerken, dass solche Aussagen immer nur für den entsprechenden Messbereich getroffen werden können.

Präzision

Die relative Standardabweichung (auch Variationskoeffizient genannt) der Präzision befindet sich im akzeptablen Bereich (2,6%). Idealerweise sind <2% vorgesehen, in der Literatur wird allerdings darauf hingewiesen, dass in der Umweltpolitik und Medizin Werte von <5 – 10% akzeptabel erscheinen (Kromidas 1999). Daher kann dieses Ergebnis als valide gewertet werden.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Präzision eines Messgerätes normalverteilt ist, die Messwerte also um den wahren Wert der Konzentration streuen. Die Standardabweichung von 2,6% bedeutet damit, dass sich die gemessenen Konzentrationen zu 66% im Bereich „wahrer Wert“ ± (0,026×“wahrer Wert“), 95% im Bereich „wahrer Wert“ ± (0,052×“wahrer Wert“) und 99% im Bereich „wahrer Wert“ ± (0,078× „wahrer Wert“) befinden. Die Werte 0,026, 0,052 und 0,078 entsprechen den Multiplikationsfaktoren für die einfache (2,6%), zweifache (5,2%) und dreifache (7,8%) Standardabweichung.

Richtigkeit

Die Richtigkeit liegt mit >99% im allgemein anerkannten Richtbereich (92% - 108%)(Kromidas 1999). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die gemessenen Konzentrationen auch den wahren Konzentrationen entsprechen.
Die Richtigkeit erfasst die systematische Abweichung der gemessenen Konzentration vom wahren Konzentrationswert. Eine hohe Richtigkeit bedeutet, dass die gemessene Abweichung als gering einzustufen ist und damit nur unwesentliche Abweichungen auftreten. Bei einer hohen Richtigkeit ist es nicht notwendig, einen Korrekturfaktor zu verwenden.

Schlussfolgerung

Die oben genannte Methode ist ideal für die Konzentrationsbestimmung niedrigster Kortikosteroidkonzentrationen, bei allerdings hohem Zeit- und Kostenaufwand.

5.2 BEWERTUNG DER TEIL-VERSUCHE

5.2.1 SILIKONÖL ALS MEDIKAMENTENTRÄGER

Untersuchungen zur Löslichkeit von Medikamenten in Silikonöl sind selten und erst in den

letzten Jahren Gegenstand aktueller Forschung geworden. So wurde 2001 die Löslichkeit von Acetylsalicylsäure in Silikonöl tierexperimentell untersucht (Kralinger et al. 2001). Obwohl die Möglichkeit von Silikonöl als Trägersystem äußerst interessante Therapieoptionen liefert und Silikonöl bereits seit den 70er Jahren intraokular eingesetzt wird (siehe Einleitung), ist diese Idee erst in den letzten Jahren nur langsam aufgegriffen worden (Beer et al. 2003; Hoerauf 2003; Chin et al. 2005; Jonas 2005), so dass erst 2008 weitere Löslichkeitsversuche zu Triamcinolon in Silikonöl folgten (Pastor et al. 2008).

Die vorliegende Arbeit ergänzt und erweitert die bereits vorhandenen wissenschaftlichen Abhandlungen, besonders hinsichtlich der absoluten Löslichkeit und Freisetzungskinetik von Triamcinolon und Dexamethason in Silikonöl.

Absolute Löslichkeit - Vergleich

Damit evaluiert werden kann, inwiefern die in den Ergebnissen gelieferten Konzentrationen von gelöstem Silikonöl in Triamcinolon in therapeutisch sinnvollen Bereichen liegen, werden Vergleiche mit sowohl in-vivo-Studien (Beer et al. 2003) als auch in-vitro-Studien (Pastor et al. 2008) angestellt. Hieraus kann eine bessere Beurteilung zur klinischen Einsetzbarkeit abgeleitet werden.

Vergleich der Löslichkeit — In Vivo

Beer et al. untersuchten 2003 die Konzentrationen von Triamcinolon im Kammerwasser nach intravitrealer Injektion in vier nicht-vitrektomierte Augen (vier Patienten) und in ein vitrektomiertes Auge (ein Patient). Ziel der Untersuchung war es, mit Hilfe der Konzentrationen nach Injektion einen optimalen Zeitpunkt für Re-Injektionen zu ermitteln. Die Ergebnisse können exemplarisch dafür verwendet werden, die therapeutisch sinnvollen Konzentrationen, die für einen klinisch wirksamen Einsatz nötig sind, abzuschätzen. Zum besseren Vergleich der Ergebnisse aus Teilversuch 1 unserer Arbeit mit denen von Beer et al. (vitrektomiert/nicht vitrektomiert) sind diese in Tabelle 21 zusammengefasst und ohne Standardabweichung dargestellt.

Messungszeitpunkt	Mittelwerte Konzentration [ng/ml]		
nach X Stunden	Unsere Ergebnisse (TV1)	Beer et al. (2003)	
		Vitrektomiert	Ø-vitrektomiert
2.5	11,68	*	*

24	43,03	5410	3380
48	56,88	*	*
72	63,40	3560 (1850)	2194 (1186)
96	70,00	*	*
240	*	790 (4620)	830 (2550)
408	*	160 (5250)	602 (2778)
744	*	512 (4898)	432 (2948)

Tabelle 21: TACA-Konzentrationen. Vergleich zwischen den Ergebnissen aus Teilversuch 1 (TV 1) mit den Ergebnissen von Beer et al. (2003), welche nach Injektion gemessen wurden (die roten Werte beschreiben die Wirkstoffkonzentration, welche bereits eliminiert wurde). * = Daten nicht ermittelt bzw. nicht publiziert.

Auch wenn es sich bei unserem Teilversuch um die Abgabe aus Silikonöl in die wässrige Umgebung handelte, und nicht, wie bei Beer et al., die Elimination des Wirkstoffes im Vordergrund stand, ist festzustellen, dass die Dimensionen, in welchen sich die Konzentrationen im Vergleich bewegen, deutliche Unterschiede aufweisen. Für einen geeigneten Vergleich wurden die Werte nach 72 Stunden genauer betrachtet. Sind in TV 1 aus dem Silikonöl nach 72 Stunden erst 63,4 ng/ml herausdiffundiert, so zeigt sich bei Beer eine bereits eliminierte (und damit wirksame) Konzentration von 1850 ng/ml (vitrektomiertes Auge) bzw. 1185 ng/ml (nicht-vitrektomiertes Auge) ng/ml. Auch ist in unserem Teilversuch 1 relativ zügig ein Abflachen der Diffusion von Triamcinolon aus dem Silikonöl zu erkennen, signifikant ist dabei sogar nur der Zeitraum 0 – 24 Stunden (siehe Ergebnisse), so dass es hierbei gar nicht erst zu annähernd ähnlich hohen Konzentrationen, wie bei Beer bereits eliminiert, kommt.

Beer überprüfte das Sehvermögen der Patienten mittels eines normalen Visus-Testes vor (initial), 10 Tage nach und 31 Tage (final) nach Injektion. Nach 31 Tagen (744 Stunden) sei keine Verbesserung mehr durch die verbleibende Konzentration (432 ng/ml) des einmalig injizierten Triamcinolon zu erwarten. Besonders bei dem zuvor vitrektomierten Patienten (Konzentration nach 744 Stunden: **512 ng/ml**) war bereits nach 10 Tagen (Konzentration nach 10 Tagen: **790 ng/ml**) keine Visusverbesserung mehr festzustellen.

Vergleich der Löslichkeiten – In Vitro

Die Abhandlung von Pastor et al. (2008) basiert auf der gleichen Grundidee wie Teilversuch 1 der vorliegenden Arbeit, nämlich der, dass antiinflammatorische Medikamente wie Triamcinolon, in Silikonöl gelöst, zu einer Verbesserung der Therapiemöglichkeiten

herangezogen werden könnten (siehe Einleitung). Pastor et al. mischten hierbei Silikonöl mit unterschiedlichen Konzentrationen von antiinflammatorischen Medikamenten wie Triamcinolon. Bewertet wurde die Löslichkeit anhand der visuellen Analyse auf verbleibende Partikel nach Vermischen des Triamcinolons mit Silikonöl. Hierbei verzichtet er auf eine quantitative Bestimmung wegen durchweg verbleibender Partikel in dem Silikonöl.. Abbildung 24 zeigt die Trübheit bei entsprechenden Konzentrationen bei Pastor et al. Abbildung 25 zeigt dazu im Vergleich das filtrierte Silikonöl aus Teilversuch 1.

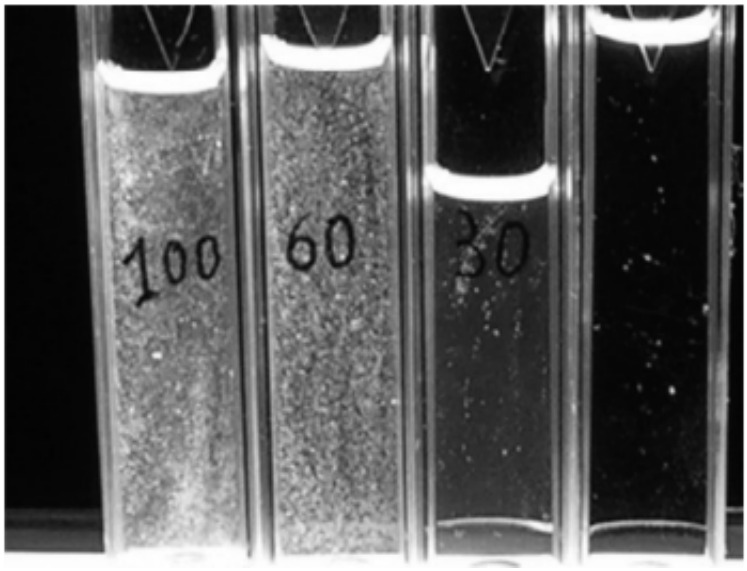

Abbildung 24: Abbildung 24 zeigt den von Pastor et al. durchgeführten Trübungstest im Photometer bei den entsprechenden Konzentrationen (100, 60, 30 und 0 µg/ml). Die Grafik wurde entnommen aus der Veröffentlichung von Pastor et al. (2008), S. 1248.

Abbildung 25: Das filtrierte Silikonöl aus Teilversuch 1 zeigt bei Beleuchtung mit einer Lichtquelle keinerlei Streuung mehr. Auch unter mikroskopischer Kontrolle zeigten sich keine Wirkstoffpartikel mehr.

Hierbei sei bei jeder der eingemischten Konzentrationen (100, 60 und 30 µg/ml) jeweils ein visuell trübes Erscheinungsbild aufgetreten. Lediglich das Silikonöl, welches nicht mit TACA in Verbindung gebracht wurde, blieb klar.

Bei der Betrachtung von Teilversuch 1 wird deutlich, warum Pastor et al. bei jeder der verwendeten Konzentrationen ein eingetrübtes Silikonöl vorgefunden haben. Die Ergebnisse bestätigen, dass ein klares Silikonöl hierbei erst bei unter 0,1 µg/ml (100 ng/ml) Triamcinolon/Silikonöl aufgetreten wäre.

Da Pastor et al. nicht beschreiben, warum die oben genannten Konzentrationen für die Versuche verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass die Orientierung an therapeutisch gängigen Injektionsmengen erfolgte., diese aber für Versuchszwecke auf ein Minimum reduziert wurden. Die übliche Injektionsgröße beträgt pro Auge 4mg Triamcinolon. Da je nach Größe des Augapfels zwischen 4 und 6 ml Silikonöl pro Auge bei einer Vitrektomie mit Endotamponade ins Auge eingegeben werden, entspräche die von Pastor et al. verwendete Menge etwa 1/10 der üblichen Injektionsmenge.

Klinische Bewertung

Vergleicht man die Ergebnisse aus Teilversuch 1 mit den beiden Arbeiten von Beer et al. (2003) und Pastor et al. (2008) so wird deutlich, dass die für einen therapeutischen Effekt benötigte Triamcinolonmenge wesentlich höher liegen muss, als in Silikonöl absolut lösbar ist. So muss nach den oben erwähnten klinischen Ergebnissen von Beer et al. vermutet werden, dass die wesentlich niedrigeren Konzentrationen, welche aus dem Silikonöl (Teilversuch 1 dieser Arbeit) in die wässrige Phase abgegeben wurden, minimalen bis keinen therapeutischen Effekt in Hinblick auf eine Visusverbesserung erwirken können.

Somit ist die Effizienz und damit der klinische Einsatz einer Silikonöl-Tamponade kombiniert mit dem Wirkstoff Triamcinolon fragwürdig. Auch wenn die Herstellung einer solchen Silikonöl-Wirkstoff-Mischung im Vergleich zur Herstellung des hochgereinigten Silikonöles an sich kostengünstig und schnell durchführbar ist, wird der Aufwand dem Ergebnis nicht gerecht.

5.2.2 SILIKONÖL ALS AFFEKTOR AUF DIE HALBWERTSZEIT DER KORTIKOSTEROIDE

Vergleicht man die Halbwertszeiten des in das Auge injizierten Triamcinolons bei nicht-vitrektomiertem mit einem vitrektomiertem Auge, fällt in der Literatur auf, dass bei Injektionen von Triamcinolon in ein Auge, welches zuvor vitrektomiert und mit Silikonöl als Endotamponade versorgt wurde, eine deutliche Verkürzung der Halbwertszeit zu verzeichnen ist (Beer et al. 2003; Jonas 2005). Gegenwärtig wird die Meinung vertreten, dass die Halbwertszeit des intraokulär injizierten Triamcinolons stark von der Anwesenheit des Glaskörpers bzw. eines Glaskörperersatzes abhängig ist (Jonas 2002; Macky et al. 2002; Beer et al. 2003; Chin et al. 2005; Jonas 2005).

Halbwertszeitenunterschiede – exemplarisch

Im der folgenden Tabelle (Tabelle 22) - werden exemplarisch und nach Autoren sortiert - die Halbwertszeitenunterschiede bei nicht-vitrektomiertem, vitrektomiertem und nach Vitrektomie mit Silikonöl versorgtem Auge aufgezeigt.

Autor	Taca-Konzentration	Nicht-Vitrektomiert	Vitrektomiert	Versuchs-Art
Chin et al. (2005)	0,3 mg (Injektion)	HWZ: 2,89 Tage	HWZ: 1,57 Tage	*In vivo (Tierexperimentell)*
Beer et al. (2003)	4 mg (Injektion)	HWZ: 18.7 ± 5,7 Tage	(+ SiÖl Tamponade) HWZ: 2,3 Tage	*In vivo (klinische Studie)*

Tabelle 22: Unterschiede (exemplarisch) zwischen den Halbwertszeiten am nicht- vitrektomierten im Vergleich zum vitrektomierten Auge. In der Arbeit von Beer et al. waren die entsprechenden Augen mit Silikonöl tamponiert worden.

Unabhängig von den Studienbedingungen kann man bei diesen Daten deutlich erkennen, dass die Halbwertszeit zwar deutlich länger ist, wenn höhere Mengen Wirkstoff in das entsprechende Auge eingegeben werden (Beer: 18,7 Tage; Chin: 2,89 Tage), es dennoch zu einem starken Rückgang der Halbwertszeit nach Einsatz von Silikonöl am Auge kommt.

Diffusion ungelöster Kristalle in das Silikonöl als Ursache der verkürzten HWZ?

Vergleicht man die Ergebnisse des zweiten Teilversuches mit den Aussagen der oben genannten Arbeiten, wird schnell deutlich, dass die Unterschiede in der Verweildauer von Triamcinolon und Dexamethason nicht damit zusammenhängen können, dass die gelösten Anteile der Wirkstoffe aus dem wässrigen Anteil in die ölige Phase diffundieren. Dies wiederum bedeutet, dass es dabei nicht zu einer Reduktion der Halbwertszeit kommen kann. Hiervon abzugrenzen ist allerdings das Verhalten der ungelösten Kristalle, auf die ausführlich in den Abschnitten zu Teilversuch 3 eingegangen wird.

Zwar ist anzunehmen, dass es zu einer minimalen Diffusion in die ölige Phase kommt, diese befindet sich allerdings in den Konzentrationsbereichen der absoluten Löslichkeit von Triamcinolon in Silikonöl (siehe oben), weshalb sich die Verschiebung der Konzentrationen nicht in dem Maße auf die Halbwertszeit auswirken kann, als dass es zu einer solch starken Reduktion, wie oben erwähnt, kommen kann.

5.2.3 Verhalten ungelöster Kristalle in der wässrigen Phase bei Anwesenheit von Silikonöl

Spitzer et al. haben in jüngsten Untersuchungen das Verhalten von Triamcinolon-Kristallen nach Injektion in eine Silikonölblase bei in-vitro-Versuchen an einem künstlichen Augenmodell analysiert. Um möglichst realitätsnahe Bedingungen zu schaffen, umspülte er die Silikonölblase mit Balanced-Salt-Solution (BSS), einer speziell für das Auge entwickelten physiologischen Salzlösung. Nach Injektion der Triamcinonsuspension in das Silikonöl beobachteten Spitzer et al. eine aus der Triamcinolonsuspension bestehende Blase im Silikonöl, welche langsam absank. Abbildung 26 (Spitzer et al. 2009) verdeutlicht den Prozess.

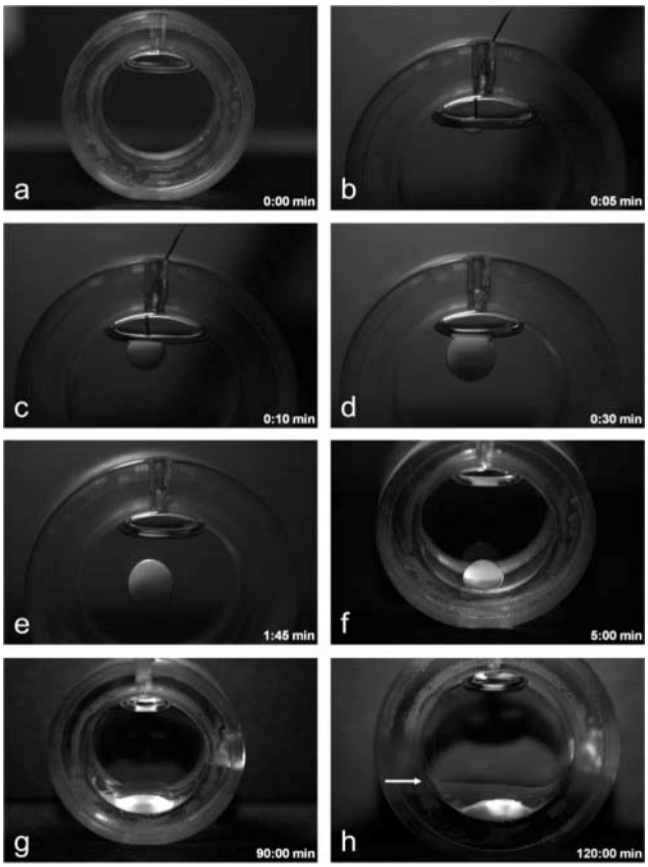

Abbildung 26: Absinken der Triamcinolonblase in Silikonöl nach Spitzer et al. 2009, S.2339.

Nach Absinken der Injektionslösung auf den Boden der Silikonölblase sammelte sich das Triamcinolon zunächst in der Phasenzwischengrenze (zwischen BSS und Silikonöl), woraus sich anschließend erste Triamcinolon-Kristalle herauslösten.

Im Vergleich zu den Ergebnissen des 3. Teilversuchs liegt die Vermutung nahe, dass **ungelöste** Triamcinolon-Kristalle bei stark zirkulierender wässriger Phase am kaudalen Pol der Silikonöl-Blase akkumulieren und dabei zu einer verringerten Gesamtkonzentration an Wirkstoff in der wässrigen Phase führen. Besonders große Kristalle sinken auf den Boden des Glasgefäßes ab und zeigen sich von der Anwesenheit des Silikonöls unbeeindruckt (Abbildung 27).

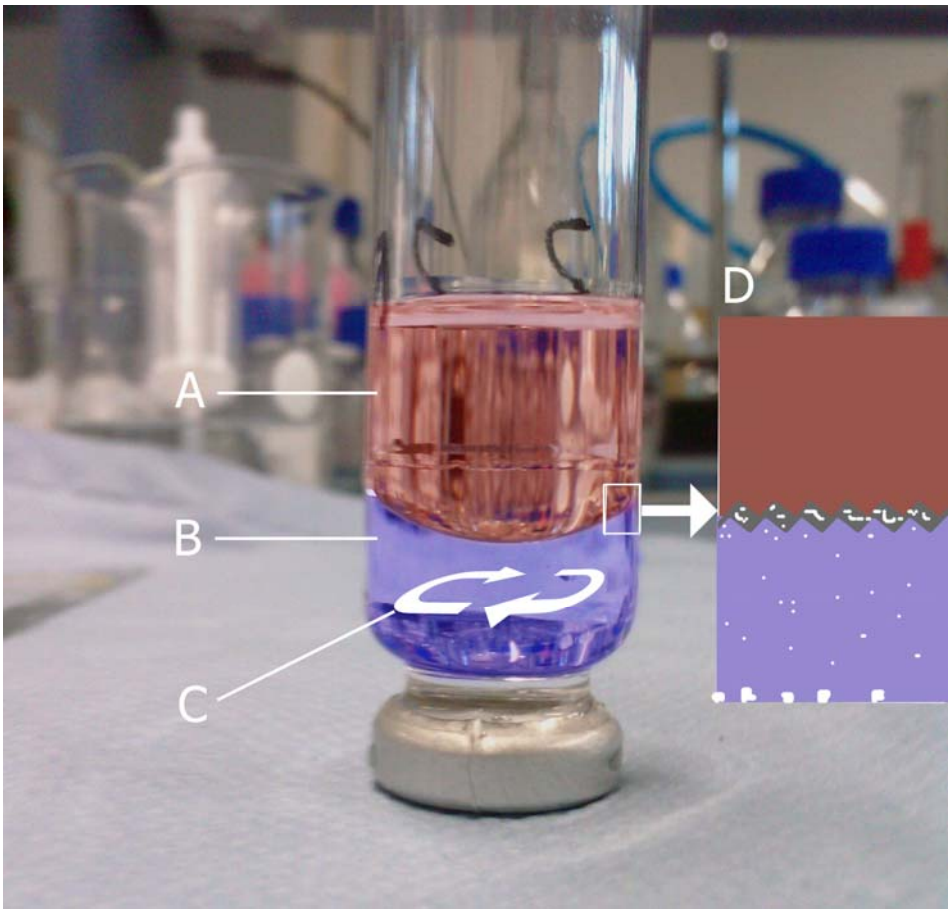

Abbildung 27: Die Abbildung zeigt schematisch das Verhalten von Triamcinolonkristallen, welche sich ungelöst in der zirkulierenden, wässrigen Phase bei Anwesenheit von Silikonöl befinden. Legende: A = ölige Phase, B = wässrige Phase, C = Zirkulation der wässrigen Phase, D = Verhalten der Triamcinolonkristalle an der Phasenzwischengrenze. Zu D: Das Silikonöl ist rötlich, die wässrige Phase bläulich und die Phasenzwischengrenze in Grau dargestellt. Die weißen Punkte entsprechen den Triamcinolonkristallen. Die schweren Triamcinolonkristalle sind durch größere weiße Punkte dargestellt und befinden sich gerade im Absinkprozess (schematisch).

Die oben geschilderten Verhältnisse könnten Ursache für eine verringerte Halbwertszeit des Triamcinolons in der die Silikonölblase umgebenden wässrigen Phase sein. Es wäre also prinzipiell möglich, dass sich die Kristalle - wie in Abbildung 27 dargestellt – zwischen den Phasen sammeln und so zu einer langsamen Abgabe von immer geringer werdenden Konzentrationen führen.

Um hierzu eine genauere Aussage treffen zu können, müsste jedoch zunächst evaluiert werden, ob es am menschlichen Auge überhaupt zu einer derartigen Akkumulation kommt, und in welchem Maße weitere Veränderungen (beispielsweise operationsbedingte Flussdynamik-Änderungen nach Vitrektomie mit Silikonöl) als Ursache für die verringerte Halbwertszeit in Frage kommen.

Bei einer solchen Ansammlung von Triamcinolon-Kristallen wäre vorstellbar, dass durch ungelöste Kristalle in der Endotamponade in vivo Lichtstreuungen mit Beeinträchtigung des

Scharfsehens auftreten. Ähnlich wie bei der Katarakt (Grehn 2006) könnte so bei Gegenlicht eine deutliche Reduzierung der Sehschärfe auftreten. Im Unterschied zur Katarakt liegt die Ursache dieser Trübung jedoch nicht in der Linse, sondern in der Phasengrenze (Abbildung 28).

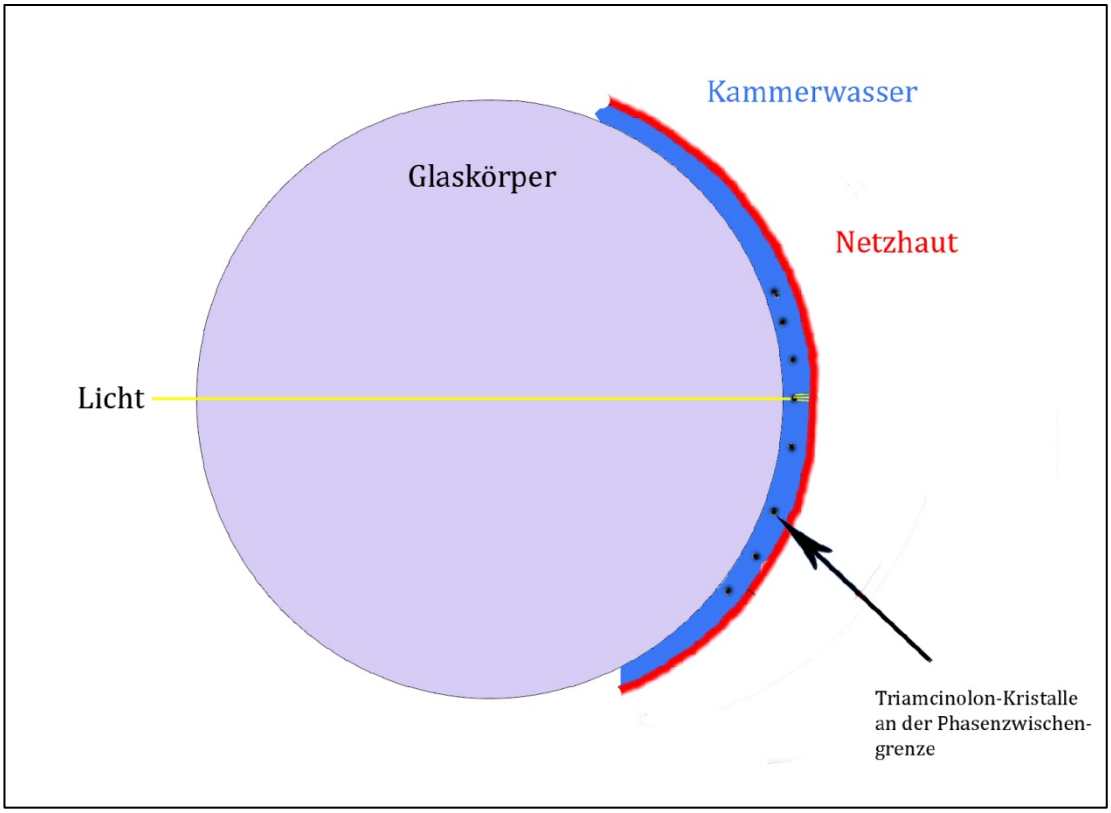

Abbildung 28: Die schematische Zeichnung zeigt stark vereinfacht und ohne Anspruch auf Richtigkeit der Proportionen die mögliche Streuung durch Triamcinolon-Kristalle, die sich an der Phasenzwischengrenze sammeln.

Ob diese Überlegung am menschlichen Auge auch wirklich eine Rolle spielt, bleibt abzuwarten, da bisher keinerlei Arbeiten vorliegen, die sich mit entsprechenden Einflüssen einer Triamcinolon-Acetonid-Injektion bei vitrektomierten Augen beschäftigen. Zudem ist anzumerken, dass bei den in der Einleitung genannten Erkrankungen in der Regel bereits ein sehr starker Visusverlust vorliegt (Gloor et al. 2001), wodurch Beeinträchtigungen des Sehvermögens durch ungelöste Kristalle möglicherweise vom Patienten nicht von den Beeinträchtigungen durch die Grunderkrankung differenziert werden können.

5.3 KRITIKPUNKTE UND MÖGLICHE FEHLERQUELLEN

Versuche

Im Zusammenhang mit den vorliegenden in-vitro-Versuchen ist es wichtig anzumerken, dass nur bedingt Vorhersagen auf die Situation in vivo möglich sind. Unberücksichtigte Faktoren

waren z.B. die Zusammensetzung des Kammerwassers, dessen dynamischer Austausch und die Gesamtaustauschfläche.

Bei jedem dieser Versuche wäre es daher theoretisch möglich, dass sie bei entsprechender Anpassung an die in-vivo-Situation zu schlechteren Ergebnissen, speziell in den Teilversuchen 2 und 3, führen könnten.

Methode

Bei der in dieser Arbeit modifizierten und validierten Methode ist zu bedenken, dass sie durch einen deutlich erhöhten Zeit- und Ressourcenaufwand mit entsprechend hohem Aufwand und Kosten verbunden ist.

Fehlerquellen

Abschließend gilt natürlich grundsätzlich, dass bei vielen Vor- und Nachbearbeitungen, bezogen auf die eigentliche Analyse, menschliches Versagen in der Regel zu Fehlern führt (Plebani 2006). Durch ungenaues Pipettieren, unsachgemäße Handhabung der Proben - wie beispielsweise Probenverlust bei übermäßig starker Begasung mit Stickstoff oder unzureichendes Abwiegen der Probenmengen - könnten systematische Fehler aufgetreten sein, die das endgültige Ergebnis verfälscht haben. Um dies auszuschließen, wurde bei den oben durchgeführten Versuchen sehr genau auf die korrekte und exakte Durchführung der Versuche geachtet. Auch wurden diverse Versuchsaufbauten (Stickstoffbegasung) und verwendete Gerätschaften (Analysewaagen) vor jeder Anwendung gründlich begutachtet und entsprechend kalibriert. Dennoch können sich unbemerkt Fehler bei der Durchführung ergeben haben.

5.4 PERSPEKTIVEN FÜR NEUE ENDOTAMPONADEN

Vergangene (Pastor et al. 2008; Spitzer et al. 2009) und die in dieser Arbeit gelieferten Ergebnisse widerlegen die Vermutung, dass Silikonöl als Medikamententräger für den lipophilen Wirkstoff Triamcinolon geeignet erscheint.

Der Ansatz, eine Endotamponade als Medikamententräger im Sinne eines Drug-Delivery-Systems zu nutzen, ist dennoch sehr sinnvoll und weiterzuverfolgen. Allerdings ist es hierzu notwendig, die Aufmerksamkeit auf die Entwicklung neuer Endotamponaden mit der schon vorhanden Eigenschaft einer Trägersubstanz für Medikamente zu richten. Vielversprechend für einen solchen Ansatz erscheint hier die Substanzgruppe der Polyaphrongele. Diese bestehen aus hunderten hydrophiler Blasen, die von einer lipophilen Hülle umgeben sind. Durch diese Amphiphilie wäre es einfacher, auch wasserlösliche Substanzen in eine solche Endotamponade unter Erhaltung der lipophilen Eigenschaften des Silikonöls einzubringen.
Studien mit dieser Substanzgruppe im Hinblick auf Eignung als okulare Endotamponaden sind derzeit nicht abzusehen, da sich diese noch in der Entwicklungsphase befinden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Silikonöl wird seit drei Jahrzehnten in der Glaskörperchirurgie, besonders bei komplizierten Erkrankungen und Verletzungen des hinteren Augenabschnittes und der Netzhaut, angewendet. Prinzipiell stehen die Tamponadeeigenschaften (Druck auf die Netzhaut) bei den heutigen Glaskörperersatzstoffen im Vordergrund. Da aber nicht nur die mechanische Tamponade der Netzhaut durch das Silikonöl, sondern auch die zeitgleiche Behandlung der zugrundeliegenden Netzhauterkrankung sinnvoll wäre, wurde schon mehrfach diskutiert, ob Silikonöl als Träger für bestimmte Wirkstoffe dienen und diese in die umgebende dünne Kammerwasserschicht abgeben könnte.

Die Datenlage zu Interaktionen bzw. Löslichkeiten von antiinflammatorischen Medikamenten wie Triamcinolon in Silikonöl ist äußerst spärlich. Ebenfalls ist nicht bekannt, wie sich die Anwesenheit von Silikonöl in seiner Eigenschaft als lipophile Substanz auf in den Glaskörper injiziertes Triamcinolon bzw. Dexamethason auswirkt.

Ziel dieser Arbeit war es, in einem ersten Teilversuch zu evaluieren, in welchem Maße die oben genannten Kortikosteroide in Silikonöl lösbar sind, diese Löslichkeit zu quantifizieren und daraus die klinische Einsetzbarkeit zu beurteilen. Für diese Quantifizierung war es nötig, eine Methode zu entwickeln, die eine Bestimmung von Triamcinolon und Dexamethason im Nanogramm-Bereich zulässt. Anschließend wurde diese Methode nach bestimmten, in der analytischen Chemie üblichen, Kriterien validiert. In zwei weiteren Teilversuchen wurde der Einfluss von Silikonöl auf Triamcinolon und Dexamethason, welche sowohl gelöst als auch ungelöst in Wasser vorlagen, analysiert.

Bei der Untersuchung der Löslichkeit hat sich gezeigt, dass ausschließlich Triamcinolon, nicht jedoch Dexamethason in Silikonöl lösbar ist. Triamcinolon war hier allerdings nur in äußerst geringen Mengen (<100 ng/ml [Wirkstoff/Silikonöl]) in Lösung zu bringen. Auch wenn die Herstellung einer solchen Silikonöl-Wirkstoff-Mischung kostengünstig und schnell durchführbar ist, würde aufgrund der niedrigen Konzentration keine klinische Wirksamkeit erreicht werden. Von einer klinischen Einsetzbarkeit eines solchen Gemisches ist daher abzusehen.

Im zweiten Teilversuch konnte bestätigt werden, dass selbst bei hohen, in wässriger Phase gelösten Wirkstoffkonzentrationen keine Diffusion in die ölige Phase stattfindet. Das legt die Vermutung nahe, dass die - im Vergleich zum nicht-vitrektomierten Auge - deutlich reduzierte Halbwertszeit der Medikamente nach Injektion in das mit Silikonöl vitrektomierte Auge nicht auf eine Diffusion in die ölige Phase zurückzuführen ist. Vielmehr kann anhand der

Ergebnisse von Teilversuch 3 vermutet werden, dass sich ungelöste Wirkstoff-Kristalle zwischen der wässrigen und öligen Phase im Sinne eines Depots sammeln und dadurch zu einer geringeren Gesamtkonzentration im Kammerwasser führen. Ob diese Vermutung am menschlichen Auge so zutrifft, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Silikonöl eignet sich somit nicht als intraokularer Medikamententräger für Triamcinolon oder Dexamethason.

Das therapeutische Konzept, eine Endotamponade als Medikamententräger im Sinne eines Drug-Delivery-Systems zu nutzen, ist dennoch sehr sinnvoll und weiterzuverfolgen. Hierzu wäre es allerdings notwendig, die Aufmerksamkeit auf die Entwicklung neuer Endotamponaden mit besserer Eignung als Trägersubstanz für Medikamente zu richten. Zur Zeit gibt es diesbezüglich diverse Forschungsprojekte, welche sich aber von einem zeitnahen Einsatz noch weit entfernt befinden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Arevalo J F, Maia M, Garcia-Amaris R A, Roca J A, Sanchez J G, Berrocal M H and Wu L (2009): "Intravitreal bevacizumab for refractory pseudophakic cystoid macular edema: the Pan-American Collaborative Retina Study Group results." Ophthalmology 116(8): 1481-7, 1487 e1.

Barza M (1989): "Antibacterial agents in the treatment of ocular infections." Infect Dis Clin North Am 3(3): 533-51.

Baum J, Peyman G A and Barza M (1982): "Intravitreal administration of antibiotic in the treatment of bacterial endophthalmitis. III. Consensus." Surv Ophthalmol 26(4): 204-6.

Becker M and Davis J (2005): "Vitrectomy in the treatment of uveitis." Am J Ophthalmol 140(6): 1096-105.

Beer P M, Bakri S J, Singh R J, Liu W, Peters G B, 3rd and Miller M (2003): "Intraocular concentration and pharmacokinetics of triamcinolone acetonide after a single intravitreal injection." Ophthalmology 110(4): 681-6.

Benhamou N, Massin P, Haouchine B, Audren F, Tadayoni R and Gaudric A (2003): "Intravitreal triamcinolone for refractory pseudophakic macular edema." Am J Ophthalmol 135(2): 246-9.

Chin H S, Park T S, Moon Y S and Oh J H (2005): "Difference in clearance of intravitreal triamcinolone acetonide between vitrectomized and nonvitrectomized eyes." Retina 25(5): 556-60.

Conway M D, Canakis C, Livir-Rallatos C and Peyman G A (2003): "Intravitreal triamcinolone acetonide for refractory chronic pseudophakic cystoid macular edema." J Cataract Refract Surg 29(1): 27-33.

Cornut P L and Chiquet C (2008): "[Intravitreal injection of antibiotics in endophthalmitis]." J Fr Ophtalmol 31(8): 815-23.

Danis R P, Ciulla T A, Pratt L M and Anliker W (2000): "Intravitreal triamcinolone acetonide in exudative age-related macular degeneration." Retina 20(3): 244-50.

DeCroos F C, Shuler R K, Jr., Stinnett S and Fekrat S (2009): "Pars plana vitrectomy, internal limiting membrane peeling, and panretinal endophotocoagulation for macular edema

secondary to central retinal vein occlusion." Am J Ophthalmol 147(4): 627-633 e1.

Engelmann K and Herbrig E (2008): "[Different endotamponade agents and their clinical indications]." Klin Monatsbl Augenheilkd 225(2): 138-45.

Gillies M C, Simpson J M, Zhu M, Hunt G, Ali H and Gaston C (2009): "Intravitreal triamcinolone." Ophthalmology 116(3): 591.

Gloor B, Landau K and Korach-Demant E (2001): "Visusverlust und Sehstörung." Schweiz Med Forum 42: 7.

Greenberg P B, Martidis A, Rogers A H, Duker J S and Reichel E (2002): "Intravitreal triamcinolone acetonide for macular oedema due to central retinal vein occlusion." Br J Ophthalmol 86(2): 247-8.

Grehn F: Augenheilkunde, 29. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2006

Grey R H and Leaver P K (1979): "Silicone oil in the treatment of massive preretinal retraction. I. Results in 105 eyes." Br J Ophthalmol 63(5): 355-60.

Haimann M H, Weiss H and Miller J (1996): "The Endophthalmitis Vitrectomy Study." Arch Ophthalmol 114(8): 1025; author reply 1026-7.

Haut J, Van Effenterre G, Ullern M and Chermet M (1980): "[Surgical treatment of retinal detachment with macular holes by vitrectomy and silicone oil injections (author's transl)]." J Fr Ophtalmol 3(2): 115-8.

Heimann H, Bartz-Schmidt K U, Bornfeld N, Weiss C, Hilgers R D and Foerster M H (2008): "[Primary pars plana vitrectomy. Techniques, indications, and results]." Ophthalmologe 105(1): 19-26.

Hoerauf H: Experimentelle und klinische Arbeiten zum Einsatz schwerer Glaskörpertamponaden. Med. Habil. Lübeck 2003.

Ikeda T, Sawa H, Koizumi K, Yasuhara T and Yamasaki T (2000): "Pars plana vitrectomy for regression of choroidal neovascularization with age-related macular degeneration." Acta Ophthalmol Scand 78(4): 460-4.

Ip M S and Kumar K S (2002): "Intravitreous triamcinolone acetonide as treatment for macular edema from central retinal vein occlusion." Arch Ophthalmol 120(9): 1217-9.

Jonas J B (2002): "Concentration of intravitreally injected triamcinolone acetonide in aqueous humour." Br J Ophthalmol 86(9): 1066.

Jonas J B (2005): "Intravitreal triamcinolone acetonide for treatment of intraocular oedematous and neovascular diseases." Acta Ophthalmol Scand 83(6): 645-63.

Jonas J B and Sofker A (2001): "Intraocular injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of diabetic macular edema." Am J Ophthalmol 132(3): 425-7.

Jonas J B, Hayler J K, Sofker A and Panda-Jonas S (2001): "Intravitreal injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of proliferative diabetic retinopathy." Am J Ophthalmol 131(4): 468-71.

Jonas J B, Kreissig I, Hugger P, Sauder G, Panda-Jonas S and Degenring R (2003): "Intravitreal triamcinolone acetonide for exudative age related macular degeneration." Br J Ophthalmol 87(4): 462-8.

Jonas J B, Kreissig I, Kamppeter B and Degenring R F (2004): "[Intravitreal triamcinolone acetonide for the treatment of intraocular edematous and neovascular diseases]." Ophthalmologe 101(2): 113-20.

Joussen A M and Bornfeld N (2009): "The Treatment of Wet Age-Related Macular Degeneration." Dtsch Arztebl Int 106(18): 312-317.

Koupai-Abyazani M R, Yu N, Esaw B and Laviolette B (1995): "Determination of triamcinolone acetonide in equine serum and urine by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry." J Anal Toxicol 19(3): 182-6.

Kralinger M T, Kieselbach G F, Voigt M and Parel J M (2001): "Slow release of acetylsalicylic acid by intravitreal silicone oil." Retina 21(5): 513-20.

Kromidas S: Validierung in der Analytik, 1. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 1999

Kumagai K, Furukawa M, Ogino N, Larson E, Iwaki M and Tachi N (2009): "Long-term follow-up of vitrectomy for diffuse nontractional diabetic macular edema." Retina 29(4): 464-72.

Lee S S and Robinson M R (2009): "Novel Drug Delivery Systems for Retinal Diseases. A Review." Ophthalmic Res 41(3): 124-135.

Machemer R and Norton E W (1972): "Vitrectomy, a pars plana approach. II. Clinical experience." Mod Probl Ophthalmol 10: 178-85.

Machemer R, Buettner H, Norton E W and Parel J M (1971): "Vitrectomy: a pars plana approach." Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol 75(4): 813-20.

Machemer R, Sugita G and Tano Y (1979): "Treatment of intraocular proliferations with intravitreal steroids." Trans Am Ophthalmol Soc 77: 171-80.

Macky T A, Oelkers C, Rix U, Heredia M L, Kunzel E, Wimberly M, Rohrer B, Crosson C E and Rohr J (2002): "Synthesis, pharmacokinetics, efficacy, and rat retinal toxicity of a novel mitomycin C-triamcinolone acetonide conjugate." J Med Chem 45(5): 1122-7.

Martidis A, Duker J S, Greenberg P B, Rogers A H, Puliafito C A, Reichel E and Baumal C (2002): "Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema." Ophthalmology 109(5): 920-7.

Mendrinos E, Dang-Burgener N P, Stangos A N, Sommerhalder J and Pournaras C J (2008): "Primary vitrectomy without scleral buckling for pseudophakic rhegmatogenous retinal detachment." Am J Ophthalmol 145(6): 1063-1070.

Pastor J C, Del Nozal M J, Zamarron E and Garcia M (2008): "Solubility of triamcinolone acetonide and other anti-inflammatory drugs in silicone oil: implications for Therapeutic Efficacy." Retina 28(9): 1247-50.

Patzeldt J: Basics Augenheilkunde, 1. Auflage; Elsevier, München 2005

Peyman G A and Schulman J A (1989): "Intravitreal drug therapy." Jpn J Ophthalmol 33(4): 392-404.

Plebani M (2006): "Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine?" Clin Chem Lab Med 44(6): 750-9.

Rosenfeld P J, Schwartz S D, Blumenkranz M S, Miller J W, Haller J A, Reimann J D, Greene W L and Shams N (2005): "Maximum tolerated dose of a humanized anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment for treating neovascular age-related macular degeneration." Ophthalmology 112(6): 1048-53.

Sallam A, Jayakumar S and Lightman S (2008): "Intraocular delivery of anti-infective drugs-bacterial, viral, fungal and parasitic." Recent Patients Antiinfect Drug Disc 3(1): 53-63.

Sallmann L (1945): "Penicillin therapy of infections of the vitreous." Arch Ophthalmol. 33: 335-344.

Shell J W (1984): "Ophthalmic drug delivery systems." Surv Ophthalmol 29(2): 117-28.

Sivaprasad S, McCluskey P and Lightman S (2006): "Intravitreal steroids in the management of macular oedema." Acta Ophthalmol Scand 84(6): 722-33.

Sohn B J, Chun B Y and Kwon J Y (2009): "The effect of an intravitreal triamcinolone acetonide injection for acute nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy." Korean J Ophthalmol 23(1): 59-61.

Spitzer M S, Kaczmarek R T, Yoeruek E, Petermeier K, Wong D, Heimann H, Jaissle G B, Bartz-Schmidt K U and Szurman P (2009): "The distribution, release kinetics, and biocompatibility of triamcinolone injected and dispersed in silicone oil." Invest Ophthalmol Vis Sci 50(5): 2337-43.

Sultana Y, Jain R, Aqil M and Ali A (2006): "Review of ocular drug delivery." Curr Drug Deliv 3(2): 207-17.

Tano Y, Sugita G, Abrams G and Machemer R (1980): "Inhibition of intraocular proliferations with intravitreal corticosteroids." Am J Ophthalmol 89(1): 131-6.

Tano Y, Chandler D B and Machemer R (1981): "Retinal neovascularization after intravitreal fibroblast injection." Am J Ophthalmol 92(1): 103-9.

Trebsdorf M: Biologie, Anatomie, Physiologie - Lehrbuch und Atlas, 7. Auflage; Lau-Verlag, Reinbek 2002

Young S, Larkin G, Branley M and Lightman S (2001): "Safety and efficacy of intravitreal triamcinolone for cystoid macular oedema in uveitis." Clin Exp Ophthalmol 29(1): 2-6.

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Prof Dr. Hans Hoerauf, der mir nicht nur diese tolle Arbeit ermöglicht hat, sondern auch maßgeblich an der Vermittlung der Kontakte nach Königsbrunn beteiligt war. Dank seiner ständigen Erreichbarkeit und immer anregenden sowie aufmunternden Worte, womit sich entstandene Motivationslöcher schnell stopfen ließen, war es mir möglich, die Arbeit zeitnah und mit einem unglaublichen Zuwachs an Interesse und Wissen in der Ophthalmologie zu beenden.

Im selben Atemzug möchte ich dabei Dr. D.-H. Menz danken, der mit seiner unglaublichen Großzügigkeit und dem Enthusiasmus eines ewigen Forschers die Ressourcen und Mitarbeiter seiner Firma Pharmpur GmbH selbstlos zur Verfügung gestellt hat und mir zu jeder Zeit mit Anregungen und Ideen zur Seite stand.

Auch möchte ich besonders Dipl.-Chem. Thorsten Lechner danken, der meine Versuche und Analysen anregend, unterstützend und kritisch betreut hat und es mir immer ermöglichte, die unterschiedlichsten Ideen im Labor umzusetzen.

Den Mitarbeitern der Pharmpur Gmbh Sandra Hofbauer, Mandy Gertz und Josy Foe, möchte ich für ihre unglaubliche Geduld mit mir bei der Einarbeitung im Labor und meinen ständigen Nachfragen und Platzbeanspruchungen danken. Auch Sebastian Hack und Kristian Fürst möchte ich für die mir fachfremden Anregungen, die immer wieder frischen Wind in meine Forschungen gebracht haben, danken.

Herzlicher Dank geht auch an Dr. K. Jung vom Göttinger Institut für medizinische Statistik, der mich bei meiner statistischen Auswertung ausführlich beraten und unterstützt hat.

Meinen Eltern bin ich zu tiefer Dankbarkeit für die unzähligen Korrekturen, Gespräche und Anregungen für die Doktorarbeit verpflichtet. So auch meinen Geschwistern Christian, der „Kollege“, der immer wissenschaftliche und formelle Unterstützung für meine Doktorarbeit geliefert hat, Boris, der kurzfristig Finanzierungsmöglichkeiten für den Augsburg-Aufenthalt zur Verfügung gestellt hat und bei organisatorischen Problemen Ansprechpartner Nr. 1 war, Daniel, der mich mit Diskussionen und Ideen auf Trab hielt und meine englischen Zusammenfassungen korrigiert hat und Marcus, der mich gerade hinsichtlich multimedialer Umsetzung der verschiedensten Probleme unterstützte. Ohne die Hilfe meiner Familie wäre ich nicht so schnell mit dieser wissenschaftlichen Arbeit fertig geworden.

Abschließend möchte ich noch ganz besonders meiner Freundin Ulrike danken, die mich nicht nur regelmäßig während der Forschungen in Augsburg wissenschaftlich beraten und

unterstützt hat, sondern sich auch die Mühe machte, immer und immer wieder meine Rohversionen der Arbeit zu lesen und zu korrigieren. Ihre Bodenständigkeit und Organisiertheit hat mir die nötige Kraft gegeben, die Arbeit zeitnah fertig zu stellen.