

7. KURZFASSUNG

7.1. Einleitung

Das Retinoblastom ist der häufigste primäre maligne Augentumor des Kindesalters. Dieser angeborene Tumor ist auf die Proliferation unreifer Netzhautzellen, welche Ähnlichkeiten mit Photorezeptorzellen aufweisen, zurückzuführen. In den USA und Europa kommt das Retinoblastom mit einer Häufigkeit von 1:15000 Lebendgeburten vor.

Das Retinoblastom kann durch Mutationen auf zwei verschiedenen Ebenen hervorgerufen werden.

Die eine Form der Keimzellmutation wird autosomal dominant vererbt und manifestiert sich in der bilateralen okulären Expression des Tumors, da alle Retinazellen betroffen sind und zum Retinoblastom entarten können. Bei dem zweiten (somatischen) Typ entsteht die Mutation in einem Retinoblasten während der embryonalen Netzhautentwicklung. Somit ist bei dieser Form nur jeweils ein Auge betroffen (unilateraler Manifestationstyp).

Der resultierende Defekt des Retinoblastomgens RB1 ist auf dem langen Arm des Chromosoms 13(13q14) lokalisiert.

Das RB1-Gen besteht aus 200 Kilobasen (Kb) DNA und ist in 27 Exons (RNA kodierende Regionen) unterteilt, welche durch non-kodierende Segmente unterbrochen werden. Es ist ubiquitär im Körper präsent. Das RB1-Gen kodiert ein Protein von 105 kD Grösse, das sogenannte Retinoblastomprotein pRB, welches als eine zentrale Komponente im Regulierungsmechanismus des Zellzyklus funktioniert. Das pRB ist in den meisten normal proliferierenden Zellen anzutreffen, wo es eine Schlüsselrolle in der Zellzyklusregulierung spielt. Weiterhin scheint es von wesentlicher Bedeutung für die endgültige Differenzierung von Retinoblasten in reife Retinazellen zu sein. Die Inaktivierung des RB1-Gens durch Mutation führt zum Verlust der Retinoblastomproteinbildung und damit zu einer unkontrollierten Zellproliferation.

Das Retinoblastom zeigt eine Tendenz zum invasiven Wachstum in die Aderhaut und den Nervus opticus, sowie auch in den Glaskörper. In fortgeschrittenen Fällen kann es zum intrakraniellen Vorwachsen entlang der optischen Nervenbahn kommen.

In den USA werden circa 90% aller Fälle bis zu einem Alter von 5 Jahren diagnostiziert. Mehr als 50% von Retinoblastomen in den USA wurden nach Befund einer Leukokorie (griech. leukos = weiss, kore = Pupille) entdeckt, da dieser Effekt durch das großflächige Vorwachsen des Tumors in den Glaskörper bedingt ist. Ein weiterer häufiger Befund ist ein Strabismus, bedingt durch den Visusverlust des betroffenen Auges. Dieser wird durch Tumorinfiltration oder subretinaler tumorbedingter Flüssigkeitsansammlung in der Makularegion hervorgerufen.

Andere, weniger häufige Zeichen sind ein rotes, schmerzendes Auge mit Zeichen eines Glaukoms, vermindertem Visus und anhaltende Entzündung.

Eine genaue und detaillierte Untersuchung ist von grundlegender Bedeutung für das weitere Wohl des betroffenen Kindes.

Der Untersuchungsablauf bei Verdacht auf ein Retinoblastom besteht, sollte aus einer Familienanamnese, einer Untersuchung durch einen Kinderarzt sowie einer Fundusbegutachtung und der Anwendung von detaillierten, bildgebenden Untersuchungsverfahren bestehen. Wichtigste Verfahren sind das CT, die Röntgenaufnahme, der Ultraschall und die Kernspintomographie. Mit Hilfe des letztgenannten Verfahrens kann man zum Beispiel typische Verkalkungsherde und die etwaige Tumorausbreitung entlang des N. opticus oder in die Orbita nachweisen. In Fällen mit extraokularer Tumormanifestation ist eine Untersuchung auf mögliche Metastasen dringend erforderlich. Unerlässlich für die weiterführende Behandlung ist die detaillierte Evaluierung, Dokumentation und exakte Klassifikation des Tumors.

Im letzten Jahrzehnt hat sich die Behandlung des Retinoblastoms von radikalen, aggressiven Methoden, wie Enukleation und externer Bestrahlung, zur Anwendung von mehr fokalen, konservativen oder kombinierten Behandlungsstrategien entwickelt.

Aufgrund frühzeitiger Entdeckung, verbesserten Familienmonitorings und der erzielten Fortschritte im therapeutischen Spektrum der Tumorbehandlung wurde die Prognose für den Visuserhalt und die Überlebensrate der betroffenen Kinder deutlich verbessert.

Obwohl eine Vielzahl von Behandlungsmethoden, wie Enukleation, externe Bestrahlung, Laserablation, Kryoablation, Laserhyperthermie und Chemotherapie existiert, sind die Untersuchungen zur Schaffung optimaler Bedingungen für eine komplette Tumorkontrolle und die Erzielung minimaler Nebeneffekte weiterhin Gegenstand der medizinischen Forschung.

Die Auswahl einer Behandlungsmethode ist abhängig von Faktoren wie Tumorgöße, Glaskörperinfiltration, Lage des Tumors, des Allgemeinzustand des Patienten sowie von den möglichen Nebeneffekten der jeweiligen Behandlungsmethode selbst.

Die wohl einschneidenste Veränderung in der Behandlung des Retinoblastoms erfolgte durch die Einführung der Chemotherapie. Durch die Anwendung der systemischen Chemotherapie zur initialen Behandlung des Tumors (Reese-Ellsworth Klassifikation Stadium III-V) konnte die Rate des Augenerhaltes verbessert werden. Dieses Ergebnis basiert auf der Einführung neuer Medikamente wie zum Beispiel Carboplatin, welche eine verbesserte okuläre Penetranz aufweisen. Eine Chemotherapie wird einerseits als neoadjuvante Therapie mit dem Ziel einer Tumorgößenreduzierung und anschließender möglicher Applikation von fokalen Behandlungstechniken verwendet. Die Kombination von Chemotherapie und lokaler Erwärmung

wird als Thermochemotherapie (TCT) bezeichnet. Andererseits wird die Chemotherapie als adjuvante Therapie zum Zwecke der Prävention einer Metastasierung bei Patienten mit erhöhtem Risiko einer extraokularer Tumorausweitung appliziert.

Wie jede Behandlungsmethode besitzt die Chemotherapie spezifische systemische Nebenwirkungen wie Leukopenie und Anämien, des weiteren wurden Ototoxizität, Nephrotoxizität, und Auswirkungen auf das ZNS verzeichnet.

Trotz des verbesserten therapeutischen Index konnte eine vollständige Tumorkontrolle mittels systemischer Chemotherapie nicht erreicht werden. Grund dafür könnte in dem Effekt der Chemoresistenz liegen, bei welchem die Wirksamkeit des Medikamentes verringert ist. Es wurde eine Theorie postuliert, nach welcher die unvollständige Tumorkontrolle durch eine inadäquate Carboplatinpenetration in die verschiedenen okularen Gewebe bedingt sei. Dies resultiere in subtoxischen intrazellulären Konzentrationen in den Tumorzellen oder in dem indirekten Effekt der Selektion von chemotherapieresistenten Zellen.

In den letzten Jahren hat sich das Interesse an der Applikation einer lokalen Chemotherapie als eine weitere Möglichkeit der Behandlung des Retinoblastoms verstärkt. Die lokale Chemotherapie impliziert das Erzielen einer effektiven therapeutischen intraokularen Gewebekonzentration bei gleichzeitiger Vermeidung unerwünschter systemischer Nebenwirkungen. Verschiedene Applikationsmethoden, wie unter anderem periorbitale und subkonjunktivale Injektionen, wurden intensiv studiert und deren Effektivität an Tiertumormodellen untersucht.

Das Ophthalmologic Oncology Laboratory sowie das Biophysics Center des Bascom Palmer Eye Institute der Medizinischen Fakultät der Universität Miami, Florida haben ihre Forschung auf ein neues System der Chemotherapie-Applikation konzentriert. Dieses soll in der Lage sein, therapeutische intraokulare Konzentrationen zu erhalten, während es gleichzeitig nicht nur die systemischen Nebenwirkungen minimiert, sondern ebenfalls die lokalen Risiken und invasiven Eingriffe reduziert. Die Applikation der sogenannten Coulomb-kontrollierten Iontophorese eröffnet die Möglichkeit einer definierten, selektiven und kontrollierten Medikamentenapplikation, welche auf das jeweils behandelte Auge limitiert ist und welche einfach und ohne die Notwendigkeit eines lokalen invasiven Eingriffes erfolgt.

Iontophorese stammt aus dem Griechischen und kann mit dem Begriff der forcierten Bewegung von geladenen Molekülen durch Gewebegrenzen unter der Applikation eines externen elektrischen Feldes umschrieben werden. Die Anwendung der Iontophorese in der Ophthalmologie beginnt mit der Arbeit des deutschen Forschers Wirtz im Jahre 1908, der diese Methode erstmalig zur Behandlung von Keratitiden, Episkleritiden und Hornhautgeschwüren

benutzte. Nach umfangreichen Studien, welche weltweit bis zur Wende des letzten Jahrhunderts durchgeführt wurden, geriet diese Applikationsmethode in Vergessenheit und wurde nie als reguläre Behandlung in den Klinikalltag eingeführt. Grund dafür lag möglicherweise in den Forschungsstudien selber, die fundiertere Kontrollversuche und Sicherheitsuntersuchungen vermissen ließen. Am Ende der achtziger Jahre erfuhr die Iontophorese eine wissenschaftliche Wiedergeburt. Intensive und umfangreiche Untersuchungen erfolgten und dokumentierten die Möglichkeiten dieses Verfahrens für die Ophthalmologie. Studien von transkornealer und transskleraler Iontophorese mit verschiedenen Medikamenten, wie unter anderem mit Antibiotika, Antimykotika und Kortikosteroiden, wurden publiziert. Allerdings demonstrierten die durchgeführten Studien auch die Gefahren dieser Technik. So wurden Schädigungen der Netzhaut und Gefäßhaut, wie Verbrennungen, hämorrhagische Zellnekrosen, Desorganisation der verschiedenen Zellschichten der Netzhaut und Okklusionen in der Choriokapillaris im Anschluss an die transsklerale Iontophorese beobachtet.

Die unterschiedlichen Forschungsgruppen arbeiteten mit sehr verschiedenen Elektroden, welche auf relativ kleinen Oberflächen verhältnismäßig hohe Stromstärken applizierten. Daraus resultierten lokale Überschreitungen der Zelltoleranzgrenze, die letztendlich zu begrenzten Gewebeschädigungen führten.

Im Unterschied zu den oben erwähnten Studien ist das am Biophysics Center des Bascom Palmer Eye Institute und OPTIS-Frankreich entwickelte Gerät, durch eine verhältnismäßig große okuläre Kontaktfläche und der Anwendung von geringen Stromstärken von bis zu 5mA gekennzeichnet. Diese technischen Charakteristiken resultieren in einer geringen Stromdichte, welche die kritische Zelltoleranzgrenze nicht überschreitet. Um so mehr, als das speziell entwickelte Coulomb- kontrollierte Iontophoresegerät (CCI) in der Lage ist, sich kontinuierlich an die Gewebewiderstandsschwankungen genau zu adaptieren. Durch die automatische Anpassung der Spannung und der Behandlungsdauer wird eine kontrollierte und dosierte Applikation des jeweiligen Medikamentes gesichert.

Die Sicherheit und die Kapazität der Coulomb- kontrollierten Iontophorese wurde bereits erfolgreich mit der Applikation von Kortikoiden, sowie Aspirin an verschiedenen Tierversuchen demonstriert.

Die Coulomb- kontrollierte Iontophorese bietet die Möglichkeit einer dosierten, selektiven und nicht invasiven Medikamentenapplikation am Auge.

Die Behandlung des Retinoblastoms schließt ein komplexes System verschiedener Techniken ein. Die Anwendung der CCI bietet eine zusätzliche Option zur Erweiterung der Behandlungsspielraumes dieses häufigsten Tumors im Kindesalter.

Ziel der vorliegenden Forschungsstudie war erstens die Evaluierung der Pharmakokinetik der systemischen transskleralen Coulomb-kontrollierten Iontophorese von Carboplatin am Kaninchenauge und die Untersuchung möglicher Toxizitätseffekte im Vergleich zur fokalen subkonjunktivalen Injektion. In einem zweiten Schritt wurde die Effektivität der transkorneoskleralen Coulomb-kontrollierten Iontophoresis (CCI) von Carboplatin zur Behandlung des Retinoblastoms am transgenetischen Mausmodell untersucht.

7.2. Material und Methoden

Das Iontophoresegerät, das in dem hier beschriebenen Forschungsprojekt benutzt wurde, ist am Biophysics Center des Bascom Palmer Eye Institute unter Kooperation mit OPTIS, Frankreich entwickelt worden.

Dieses Gerät besteht aus einem mit einer 9V Batterie betriebenen, Mikroprozessor kontrollierten Element, das einen konstanten Strom über eine vorgewählte Zeitdauer zu einem Set von transkornealen oder transskleralen Elektroden und einer Rückelektrode liefert.

Die okularen Elektroden sind so gestaltet, dass der Platindraht nicht in unmittelbarem Kontakt mit der Gewebeoberfläche steht, sondern vielmehr die Leitung des Stromes über die Medikamentenlösung erfolgt, in welche der Draht getaucht ist.

Im Gegensatz zu anderen Elektroden besitzt die im vorliegenden Experiment benutzte transsklerale Elektrode eine relativ große Kontaktfläche von 0.5cm^2 .

Das Tierversuchsprotokoll wurde bestätigt durch das Medicine Animal Care and Use Review Board der Universität Miami. Alle Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Association for Research in Vision and Ophthalmology für die Verwendung von Tieren in der Ophthalmologie und Augenforschung.

Die Pharmakokinetikstudie und die Untersuchung zur Sicherheit von wiederholten CCI Applikationen wurde an 84 New Zealand White (NZW) Kaninchen (Durchschnittsgewicht: $3.37\pm 0.33\text{kg}$) durchgeführt.

Für die Untersuchung der Effektivität der CCI von Carboplatin an einem Tumormodell, wurde das Simian Virus 40 T Antigen (SV40 Tag) transgenetische Mausmodell benutzt.

Zweiundsechzig SV 40 Tag Tiere wurden für die Carboplatin-Iontophoresestudie an Mäusen, im Alter von 6 Wochen beginnend, behandelt.

Die DNA-Kontrolle erfolgte mittels Polymerasekettenreaktionsanalyse (PCR) der jeweiligen Schwanzprobe. Transgenetisch positiv befundete Tiere entwickeln einen bilateralen, erblichen Tumor, welcher dem menschlichen Retinoblastom ähnelt. Der Nachweis des Tumors gelingt im Alter von 4 Wochen. Dieser expandiert im Alter von 16 Wochen auf die Größe des gesamten Augapfels.

Alle Tiere wurden vor jeder Behandlung mit einer intramuskulären Injektion von Ketamin und Xylazine anästhesiert. Die Euthanasie erfolgte bei den Kaninchen mit einer intravenösen Injektion von Pentobarbital und bei den Mäusen mit einer Überdosis von Ketamin und Xylazine.

Die pharmakologische Verteilung von Carboplatin wurde an New Zealand White Kaninchen im Anschluss an eine einzelne intravenöse Infusion von Carboplatin (18.7mg/kg Körpergewicht), eine einzelne subkonjunktivale Carboplatininjektion ($5.0\text{mg}/400\mu\text{l}$), oder eine

einzelne Applikation einer Coulomb- kontrollierten Iontophorese ($5\text{mA}/\text{cm}^2$) für eine Behandlungsdauer von 20min (14mg/ml Carboplatinlösung) untersucht. Die behandelten Tiere wurden 1, 2, 6, oder 24 Stunden nach der jeweiligen Behandlung euthanasiert und die Augen enukleiert. Sechs Tiere pro Zeitpunkt wurden jeweils am rechten Auge behandelt, das linke unbehandelte diente zur Kontrolle. Nach Carboplatinextraktion mittels konzentrierter 16M Nitratsäure wurde zur Bestimmung der Carboplatinkonzentrationen in der Netzhaut, der Aderhaut, des Nervus opticus und des Glaskörpers, sowie des Blutplasmas die Atomare Absorptionsspektrophotometrie (AAS) verwendet.

Zwölf erwachsene Kaninchen wurden zur Evaluierung der histopathologischen und funktionellen Toxizität der mehrfach applizierten Coulomb-kontrollierten Iontophorese benutzt. Die Kaninchen unterliefen sechs CCI Behandlungen (20min, 2.5mA) mit entweder physiologischer Kochsalzlösung oder Carboplatinlösung (14mg/ml) am rechten Auge mit jeweils 72-Stunden Intervallen. Die linken Augen dienten als unbehandelte Kontrollaugen.

Elektroretinogramme (ERG) wurden vor der ersten Behandlung, nach der zweiten Behandlung und 4 Wochen nach der letzten sechsten Iontophoreseapplikation durchgeführt. Alle Augen wurden im Anschluss an die Behandlung ophthalmoskopisch untersucht. Zur histopathologischen Begutachtung potentieller Gewebeschädigung wurden die Augen nach der Entnahme in 10% Formalinlösung fixiert und die histologischen Schnitte in Hematoxylin-Eosinlösung eingefärbt. Die Evaluierung der Schnitte erfolgte von einem unabhängigen Gutachter.

Vierundfünfzig 6 Wochen alte SV 40 Tag Mäuse unterliefen sechs transkorneosklerale Iontophoresesitzungen ($2.57\text{mA}/\text{cm}^2$, 5min) mit Carboplatin. Vierundvierzig Tiere erhielten Carboplatinbehandlungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 1.4, 7.0, 10.0 oder 14.0mg/ml mit oder ohne Strom. Zehn Tiere wurden durch CCI ($2.57/\text{cm}^2$, 5min) mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Sicherheitsparameter wie Stromstärke und Behandlungsdauer der Coulomb- kontrollierten Iontophorese wurden an acht weiteren Mäusen untersucht. Behandelte und Kontrollaugen durchliefen vor und im Anschluss an jede Behandlung eine ophthalmologische Untersuchung. Von allen Tiere wurden jeweils beide Augen im Alter von 16 Wochen enukleiert, in 10% Formalinlösung fixiert und die histologischen Schnitte in Hematoxylin-Eosinlösung eingefärbt. Die histopathologische Einschätzung und die Graduierung der Tumorkontrolle erfolgte in maskierter Weise. Die Tumoreinstufung wurde im Falle jeglichen histopathologischen Nachweises des Tumors als positiv bewertet.

7.3. Ergebnisse

In der Netzhaut, der Aderhaut, im Nervus opticus sowie im Glaskörper der Kaninchen, die mittels subkonjunktivaler Injektion oder CCI behandelt wurden, konnten signifikant höhere Carboplatinkonzentrationen gemessen werden, als in den Tieren, welche eine systemische intravenöse Carboplatininfusion erhielten. Die höchsten Gewebekonzentrationen wurden in der ersten und zweiten Stunde nach Behandlung erreicht. Im Unterschied dazu wurden im Glaskörper die maximalen Carboplatinkonzentrationen der einzelnen Behandlungstechniken zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet. Mit 4560ng/ml Carboplatin wurde der absolute Höchstwert der untersuchten Techniken eine Stunde nach subkonjunktivaler Injektion erreicht. Interessanterweise zeigten die CCI mit einem Wert von 1955ng/ml und die intravenöse Infusion mit einer Carboplatinkonzentration von 1220ng/ml erst nach einer Zeitspanne von 6 Stunden die höchsten Werte im Glaskörper der jeweils angewandten Applikationsmethode. Die Blutplasmawerte von Carboplatin zeigten deutlich höhere Konzentrationen nach intravenöser Infusion als bei subkonjunktivaler Injektion und nach Coulomb- kontrollierter Iontophorese.

Lichtmikroskopisch konnten keine histopathologischen Anzeichen für toxische, okuläre Gewebeeränderungen nachgewiesen werden. Es wurden keine Entzündungszeichen oder andere pathologische Veränderungen auf zellulärer Ebene im vorderen oder hinteren Augenabschnitt beobachtet. Es konnten keine histopathologischen Unterschiede zwischen den Augen, welche eine Coulomb- kontrollierte Iontophorese mit Carboplatin und solchen, welche eine wiederholte Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung erhielten, registriert werden.

Die aufgezeichneten Elektroretinogramme dokumentierten, dass die b-Wellen nicht durch wiederholte CCI-Behandlungen beeinträchtigt wurden. Es konnten im Vergleich zu den unbehandelten linken Augen keinerlei pathologische Veränderungen beobachtet werden. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Augen, welche mit Carboplatin behandelt wurden und solchen, die eine Iontophorese mit physiologischer Kochsalzlösung erhielten, beobachtet.

Schlussfolgernd konnten sowohl auf histopathologischer als auch auf funktioneller Ebene keine Beeinträchtigungen oder Schädigungen aufgrund einer wiederholten Coulomb-kontrollierten Iontophorese mit physiologischer Kochsalzlösung als auch bei der Carboplatinapplikation festgestellt werden.

Die Untersuchung auf Iontophoreseparameter bei der transkorneoskleralen Applikation am Mausauge zeigten keine Schädigungen des vorderen und hinteren Augenabschnittes bei einer Stromdichte von 2.57mA/cm^2 . Keine pathologischen Veränderungen konnten zwischen einer Behandlungsdauer von 2 bis 5 Minuten beobachtet werden. Stromdichten höher als 5.14mA/cm^2 waren verbunden mit Schädigungen an Hornhaut und Sklera.

Grosse intraokulare Tumore wurden in allen unbehandelten Augen sowie Augen mit CCI-Applikation von physiologischer Kochsalzlösung und in Augen mit CCI ohne Strom beobachtet. Augen, welche eine Behandlung mit einer Carboplatinkonzentration von 1.4mg/ml durchliefen, zeigten eine Verkleinerung der Tumorgröße im Vergleich zu den Kontrollaugen, jedoch konnte bei keinem Tier eine vollständige Tumorregression nachgewiesen werden. Behandlungen mit einer Carboplatinkonzentration von 14mg/ml (maximale Löslichkeit von Carboplatin in physiologischer Kochsalzlösung) zeigten in allen Augen (9 von 9, 100%) eine vollständige Tumoregression. Gleichzeitig wurde jedoch eine beträchtliche Schädigung des gesamten Auges (Phthisis) bei allen Augen beobachtet, die mit dieser Konzentration behandelt wurden.

Histopathologische Untersuchung von Augen, welche eine Iontophoresebehandlung mit 7.0mg/ml erhielten, dokumentierten eine komplette Tumoregression in 50% der Augen. Anzeichen von Kataraktbildung, Verdünnung der Sklera, Schädigungen der Hornhaut, Netzhautabnormalitäten konnten in keinem der behandelten Augen dieser Gruppe gefunden werden. Bei Carboplatinkonzentrationen von 10mg/ml wurden geringe bis mittlere Schädigungen der Hornhaut beobachtet.

In der vorliegenden Studie konnte eine dosisabhängige Hemmung der intraokularen Tumorentwicklung beobachtet werden. (**Tabelle 1, Abbildung 1**) Die Tumorkontrolldosis von 50% der behandelten Augen (TCD₅₀) mit Coulomb-kontrollierter Iontophorese wurde durch Regressionsanalyse mit 7.0mg/ml bestimmt. Eine LogXact logistische Regressionsanalyse wurde zur Bestimmung der Dosiskurve und zur Einschätzung der Beziehung der Carboplatinkonzentration sowie der Tumorkontrolle benutzt. Es konnte demonstriert werden, dass eine verbesserte Tumorkontrolle direkt mit der Applikation erhöhter Carboplatinkonzentrationen korreliert ist ($p < 0.001$).

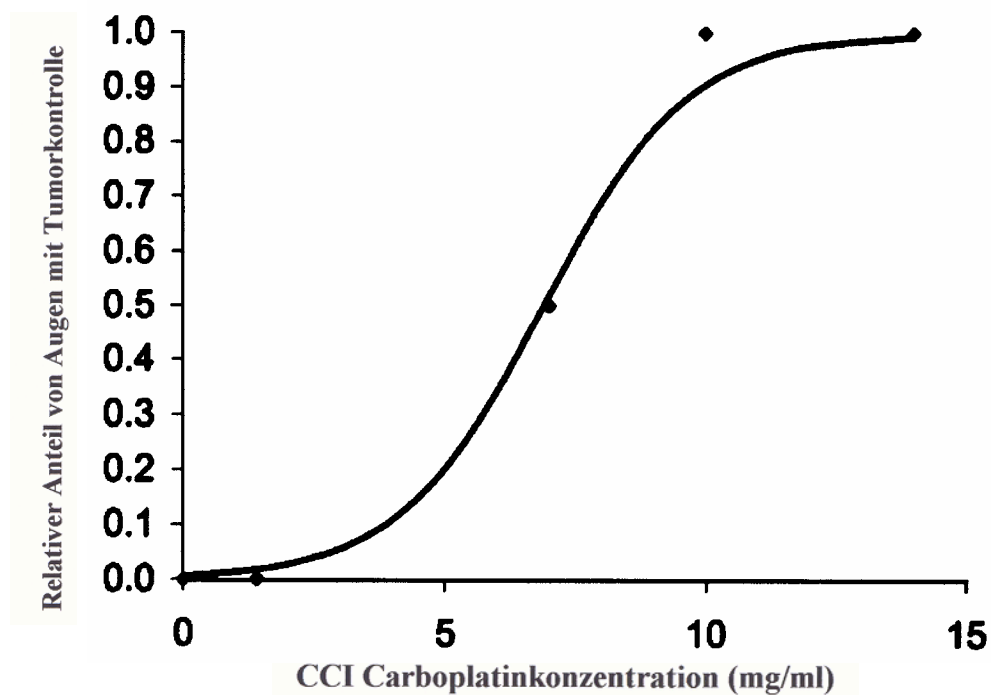
Tabelle 1.

Coulomb-kontrollierte Iontophorese (CCI) von Carboplatin am Retinoblastom des transgenetischen Mausmodell.

Carboplatin Konzentration (Elektrode)	Anzahl (%) Augen mit Hornhautschäden	Anzahl (%) Augen mit kompletter Tumorkontrolle
14mg/ml	9/9 (100)	9/9 (100)
10mg/ml	5/6 (83)	6/6 (100)
7.0mg/ml	0/8 (0)	4/8 (50)
1.4mg/ml	0/7 (0)	0/7 (0)
BSS	0/7(0)	0/7 (0)

Abbildung 1.

Relation von Carboplatindosis zur Rate der Augen mit Tumorkontrolle.



7.4. Diskussion

Die Chemotherapie ist zu einem wichtigen Bestandteil der Retinoblastombehandlung geworden. Kombinationstherapien von Chemoreduktion mit lokalen Behandlungsmethoden wie Laserhyperthermie oder Kryoablation wurden mit Erfolg eingesetzt. Ein weiterhin existentes Problem stellt jedoch die Infiltration von Tumorzellen in den Glaskörper dar. Ungenügende Konzentrationen von Chemotherapeutika in Netzhaut und Glaskörper nach systemischer Applikation aufgrund ungenügender Verteilung, Dosislimitierung und Clearanceeffekte, scheinen mögliche Ursachen für dieses Problem zu sein.

Frühere Forschungsstudien am Bascom Palmer Eye Institute demonstrierten die erfolgreiche Behandlung mittels subkonjunktivaler und intravitrealer Carboplatininjektion am Retinoblastommodell der Maus. Obwohl erfolgreich, besteht durch die intravitreale Injektion das erhöhte Risiko für eine Tumorausbreitung durch den Injektionskanal.

Eine alternativer Lösungsansatz besteht in der Anwendung der Technik der Iontophorese. Wie bereits dargestellt, benutzt diese Methode das Prinzip der erhöhten Gewebepenetration von geladenen Molekülen in einem applizierten elektrischen Feld, nach dem elektrischen Prinzip, dass gegensätzliche Ladungen sich anziehen und gleiche sich abstoßen.

Das in diesem Experiment benutzte Coulomb- kontrollierte Iontophoresegerät ist speziell für den Gebrauch in der Ophthalmologie gebaut. Dieses System garantiert eine konstante applizierte Stromdichte (mA/cm^2), in dem es sich automatisch an die Gewebewiderstandsveränderungen adaptiert. Eine konstante Konzentration der Carboplatinlösung wird durch eine permanente, pumpeninduzierte, gleichmäßige Zirkulation an der Augenoberfläche aufrecht erhalten.

Im ersten Teil dieser Studie konnte dargestellt werden, dass sowohl die Coulomb kontrollierte Iontophorese als auch die subkonjunktivale Injektion höhere Carboplatinkonzentrationen in Netzhaut, Gefäßhaut, Nervus opticus und Glaskörper erreichten als eine systemische intravenöse Applikation. Gleichzeitig konnte demonstriert werden, dass mit Hilfe der lokalen Carboplatinkonzentrationen systemische Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert werden können, da die gemessenen Blutplasmawerte um ein Vielfaches geringer waren (maximaler Wert von $327\text{ng}/\text{ml}$ 2 Stunden nach subkonjunktivaler und $261\text{ng}/\text{ml}$ nach 1 Stunde nach CCI Applikation) als die bei systemischer Infusion erreichten Konzentrationen ($6222\text{ng}/\text{ml}$ 1h nach Behandlung).

Die über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessenen Carboplatinkonzentrationen im Glaskörper zeigten verschiedene Pharmakokinetikmuster zwischen subkonjunktivaler und CCI- Applikation auf. Spitzenwerte wurden 1 Stunde nach subkonjunktivaler Injektion erreicht und sanken im Anschluss stetig ab. Die Verteilung im Glaskörper nach transskleraler CCI zeigte erhöhte Werte

im Zeitraum von 1-6 Stunden, mit den niedrigsten gemessenen Werten 24 Stunden nach der Behandlung. Diese okulare Verteilung von Carboplatin im Anschluss an die transsklerale CCI ähnelt dem okularen Verteilungsmuster von verschiedenen Therapeutika nach transskleraler CCI, wie Aspirin, Ganciclovir und Methylprednisolon, die am Bascom Palmer Eye Institute bereits untersucht wurden.

Es scheint, dass die transskleral CCI induzierte Penetration von Medikamentenmolekülen von dem vorderen in den hinteren Abschnitt des Auges über die unmittelbar angrenzenden Gewebe wie Sklera, Aderhaut und Netzhaut erfolgt. Die Molekülverteilung in den Glaskörper könnte durch passive Diffusion aus der Netzhaut und Aderhaut erfolgen, die wie Speicher funktionieren. Vergleiche mit der transskleralen CCI-Applikation ohne Strom (Aspirinstudie) zeigten nicht dieses Muster und bestätigten, dass die gemessenen intraokularen Konzentrationen in der Tat Ergebnis der verstärkten Penetration durch den Aufbau eines externen elektrischen Feldes ist.

Die Möglichkeit, Carboplatin in einer kontrollierten und relativ konstanten Konzentration im Glaskörper zu erhalten, könnte von potentieller Bedeutung für die klinische Behandlung des Retinoblastoms mit Glaskörperzellinfiltration sein.

Die Effektivität der systemischen Applikation von Carboplatin wurde in einer Studie von Murphree et al. anhand enukleierter Augen von Kindern, die eine Chemotherapiebehandlung erhielten, bewertet. Intratumorale Konzentrationen von 2.17pg/ μ g DNA sind geringer als die in der vorliegenden Studie beschriebenen Carboplatinwerte.

Im zweiten Teil der Studie wurde die Sicherheit von wiederholten Coulomb-kontrollierten Iontophoreseapplikationen untersucht. Die in der Studie benutzte maximale Stromdichte von 5mA/cm² ist im Vergleich zu einer anderen, bereits publizierten Studie deutlich geringer. In der bisher einzigen veröffentlichten Studie von multiplen Iontophoreseapplikationen von Yoshizimi et al. wurde eine Stromdichte von circa 527mA/cm² verwendet. Trotz effektiver okularer Medikamentenapplikation (Foscarnet) wurden dabei Schädigungen der Netzhaut und Aderhaut im Bereich der Elektrodenplatzierung lichtmikroskopisch nachgewiesen.

Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass eine klinisch simulierte Serienbehandlung von CCI sowohl mit physiologischer Kochsalzlösung als auch mit Carboplatin in histopathologischer und funktioneller Sicht keine Schädigungen des gesamten Auges, insbesondere der Netzhaut hervorriefen.

Subkonjunktivale Injektionen beinhalteten im Gegensatz zur Iontophorese, bei der die applizierte Medikamentenlösung die Augenoberfläche an der Stelle der Elektrodenplatzierung zwischen Limbus und Pars plana für einen kurzen Zeitraum passiert, eine Injektion eines bestimmten Volumens von Carboplatinlösung und damit eine längere Kontaktzeit, die von der

Diffusionskapazität der Moleküle abhängig ist. Die so exponierten Gewebe wie Bindehaut, Muskeln, Hornhaut und orbitales Fettgewebe unterliegen möglichen unerwünschten Wirkungen des jeweils applizierten Medikaments. Mit der Applikation der CCI, als eine lokale, nicht invasive zeitlimitierte Medikamentenapplikation, ist dieses Risiko minimiert.

Im dritten Teil dieser Forschungsstudie lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Behandlung des Retinoblastommodells der Maus mittels Carboplatin-CCI. Erfolgreich konnte demonstriert werden, dass mittels Coulomb-kontrollierter Iontophorese von Carboplatin eine Tumorkontrolle in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration erreicht werden kann.

Allerdings ist die transkorneosklerale Coulomb-kontrollierte Iontophorese am Mausauge nicht ohne Einschränkung mit einer Behandlung am menschlichen Auge zu vergleichen. Die Anatomie des menschlichen Auges ist verschieden zu dem der Maus hinsichtlich intraokularer Volumina und Gewebeproportionen, sowie der Gefäßversorgung. Im Gegensatz zum menschlichen Auge nimmt die Hornhaut des Mausauges proportional mehr Platz ein. Deshalb ist es sehr schwierig, Hornhautkontakt mit der Elektrode zu verhindern. In diesem Sinne sind die in den beschriebenen Versuchen beobachteten Hornhautschäden nicht vergleichbar mit einer CCI-Applikation am menschlichen Auge. Die für die Applikation am humanen Auge gestaltete transsklerale Elektrode ist analog zu der am Kaninchen benutzten Elektrode gebaut. Wie im zweiten Teil der Versuchreihe gezeigt wurde, konnten im Unterschied zur transkorneoskleralen Applikation an der Maus keine Schädigungen an der Kaninchenhornhaut beobachtet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Anwendung der Coulomb-kontrollierten Iontophorese von Carboplatin eine effektive, sichere, nichtinvasive lokale und leicht handhabbare Technik zur Behandlung des Retinoblastoms ist.

Die Integration der Coulomb-kontrollierten Iontophorese von Carboplatin in das Arsenal der bisher etablierten verschiedenen Behandlungsmethoden des Retinoblastoms eröffnet die Möglichkeit einer selektiveren und ergänzenden Behandlung des häufigsten okularen Tumors des Kindesalters.