

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. med. habil. G. I. W. Duncker



**Funktionelle und morphologische Veränderungen der Retina von Mäusen nach  
chronischer Gabe von Tamoxifen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Julia Klaua  
geboren am 30.7.1972 in Halle/Saale

Gutachter: Prof. Dr. med. habil. G.I.W. Duncker  
Prof. Dr. med. habil. H. J. Holzhausen  
Prof. Dr. med. habil. H. Krastel

Halle, 7.10.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007706**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007706>]

## Referat

Die vorgelegte Arbeit hatte zum Ziel, funktionelle Schäden der Retina von Mäusen nach Langzeitapplikation von Tamoxifen sowie deren Reversibilität nach Absetzen des Tamoxifens zu untersuchen.

Tamoxifen ist ein synthetisches nichtsteroidales Antiöstrogen, welches in der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt wird. Es gehört zu den kationisch-amphiphilen Pharmaka, welche durch Behinderung des hydrolytischen Abbaus von Lipiden eine Lipidose in zahlreichen Organen hervorrufen können.

24 pigmentierte Mäuse wurden 16 Wochen lang mit Tamoxifen (150-180 mg/kg KG) gefüttert. Nach Absetzen des Tamoxifens wurden die Tiere weitere 29 Wochen nachbeobachtet. Die Kontrollgruppe bestand aus 19 Tieren.

Vor Beginn der Fütterung mit Tamoxifen sowie alle 4 Wochen im Versuchsverlauf erfolgten elektoretinografische Messungen unter skotopischen Bedingungen. Die Elektoretinografie ist eine nicht-invasive Methode, bei der durch Lichtreizung elektrische Potentiale der Retina erzeugt und mittels Kontaktelektroden über der Cornea abgeleitet werden. Ausgewertet wurden die Amplituden der a- und b-Wellen, sowie deren Gipfelzeiten.

Zusätzlich wurden nach jedem Messzyklus die Retinae zweier Mäuse für die histologische Untersuchung aufgearbeitet.

Nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation waren die Amplituden der a- und b-Wellen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert. Nach weitem 29 Wochen ohne Tamoxifenapplikation waren die Veränderungen reversibel.

Die Gipfelzeiten beider Wellen unterschieden sich nach 16 Wochen Versuchsdauer nicht signifikant.

Lichtmikroskopisch waren keine eindeutig tamoxifenbedingten Einlagerungen zu beobachten. Die Reduktion von a- und b-Wellen spricht für einen komplexen Schaden in mehreren Netzhautschichten, da die a-Welle von den Photorezeptorinnensegmenten generiert wird, die b-Welle jedoch die Funktion der Bipolarzellen, vermittelt durch die Müllerzellen widerspiegelt. Die fehlende morphologische Nachweisbarkeit bei funktionellen Veränderungen spricht möglicherweise für einen Frühschaden durch Tamoxifen, der noch reversibel ist.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole</b>	
<b>1. Einleitung und Fragestellung</b>	1
<b>1.1. Einleitung</b>	1
1.1.1. Wirkungsweise des Tamoxifens	3
1.1.2. Metabolismus	4
1.1.3. Pharmakokinetik	5
1.1.4. Pathophysiologie	5
1.1.5. Allgemeine Nebenwirkungen	6
<b>1.2. Fragestellung</b>	6
<b>1.3. Elektoretinographie</b>	7
1.3.1. Komponenten des ERG	8
1.3.2. Entstehung der a- und b-Welle	9
1.3.3. Intensitätsabhängiges Verhalten	10
1.3.4. Indikationen des ERG	11
<b>1.4. Normale Netzhaut der Maus</b>	12
<b>2. Material und Methoden</b>	12
<b>2.1. Versuchssubstanz Tamoxifen</b>	12
<b>2.2. Versuchstiere</b>	13
2.2.1. Haltung der Tiere	14
2.2.2. Applikation der Medikamente	15
2.2.3. Vorbereitung der Tiere auf die ERG-Ableitungen	16
<b>2.3. Aufbau des ERG-Meßplatzes</b>	18
<b>2.4. Durchführung der Messungen</b>	19
<b>2.5. Auswertungsparameter</b>	19
<b>2.6. Fehlerquellen</b>	21
<b>2.7. Gewebepräparation für Lichtmikroskopie</b>	22
<b>2.8. Statistik</b>	22
<b>3. Ergebnisse</b>	23
<b>3.1. Allgemeine Nebenwirkungen des Medikamentes</b>	23
<b>3.2. ERG-Meßergebnisse</b>	25
3.2.1. Ausgangswerte	25
3.2.2. ERG-Veränderungen bei behandelten Tieren	28

<b>3.3. Lichtmikroskopische Befunde</b>	36
3.3.1. Kontrolltiere	36
3.3.2. Behandelte Tiere	36
<b>3.4. Ophthalmoskopische Befunde</b>	37
<b>3.5. Diskussion</b>	39
<b>5. Zusammenfassung</b>	46
<b>6. Literatur</b>	48
<b>7. Anlagen</b>	55
<b>8. Thesen</b>	60

**Lebenslauf**

**Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche**

**Danksagung**

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Aa	Amplitude a-Welle
Ab	Amplitude b-Welle
Abb.	Abbildung
AZ	Aktenzeichen
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CL-2L	Arbeitsbezeichnung eines Acridinderivates 3,6-bis(2-(Piperidino)ethoxy)acridin
cm	Zentimeter
d	Tag
DDE	Dynamic Data Exchange
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ERG	Elektroretinogramm
ERP	Early Receptor Potential
g	Gramm
G1	postmitotische Ruhephase
Gza	Gipfelzeit a-Welle
Gzb	Gipfelzeit b-EWelle
Hz	Hertz
IGF-I	Insulin-like growth factor I
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
LH-RH	luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon
Max.	Maximum
mcds/m <sup>2</sup>	Millicandelasekunden pro Quadratmeter
MDR	Multiple Drug Resistance
Min.	Minimum
MLU	Martin-Kuther-Universität
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
N	Anzahl
OP	Oszillatorische Potentiale
p	Wahrscheinlichkeit
PC	Personal Computer
%	Prozent
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SF	Standardfehler
t <sup>1/2</sup>	Halbwertszeit
TGFα,β	Tissue Growth Factor

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1. Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste Krebsform bei Frauen und in den Industrieländern die bedeutendste Todesursache bei Frauen im Alter von 35-54 Jahren.

Vor über hundert Jahren machte Beatson (Lonning und Lien 1995) die Beobachtung, dass eine Ovariectomie prämenopausaler Frauen eine Regression des fortgeschrittenen Brustkrebses bewirken kann.

Damit begann die Geschichte der Hormontherapie des Mammakarzinoms. In der weiteren Entwicklung folgten Adrenalectomie und Hypophysektomie (Lonning und Lien 1995), die bei postmenopausalen Frauen eine Tumorregrression induzieren konnten. Später wurde die Therapie mit Androgenen, Glukokortikoiden und Östrogenen eingeführt.

Der Schwerpunkt der weiteren Forschung lag auf der Verbesserung der Effizienz der Therapie sowie der Verringerung der Toxizität der Medikamente.

Tamoxifen war das erste sogenannte Antiöstrogen, das in der Therapie des fortgeschrittenen Brustkrebses verwendet wurde. Die Wirkung beruht auf der Blockade der Östrogenrezeptoren.

Tamoxifen wird in der postchirurgischen adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms angewandt. Die neuesten Leitlinien unterscheiden dabei zwei Risikogruppen. Bei Patientinnen mit niedrigem Risiko (rezeptorpositiv und Tumorgröße  $<1$  cm) kann auf eine adjuvante Therapie verzichtet oder Tamoxifen angeboten werden.

Bei höherem Risiko (rezeptorpositiv und Tumorgröße  $>1$  cm) gibt es mehrere Möglichkeiten, wobei der endokrinen Therapie ein hoher Stellenwert zugeschrieben wird. Prämenopausale Patientinnen erhalten eine Kombination aus ovarieller Suppression (LHRH-Analoga) und Tamoxifen oder Chemotherapie und Tamoxifen mit oder ohne ovarieller Suppression.

Postmenopausale Frauen mit hohem Risiko können mit Tamoxifen allein oder in Kombination mit einer Chemotherapie behandelt werden.

Rezeptornegative Tumoren sprechen am besten auf alleinige Chemotherapie an (Rutqvist et al. 1992).

Neuesten Publikationen zufolge verfügt Tamoxifen über eine protektive Wirkung gegenüber der Entstehung von Brustkrebs, welche in Studien zur Bewertung der Effektivität

prophylaktischer Gabe von Tamoxifen bei Hochrisikopatientinnen (familiäre Häufung, kontralaterale Seite) für Brustkrebs untersucht wurde (Vogel 2001).

Tamoxifen gehört zu den sogenannten kationisch-amphiphilen Pharmaka. Grundsätzlich kommt es nach chronischer Einnahme von Pharmaka dieser Gruppe zu einer Lipidspeicherung in zahlreichen Organen des Organismus, die auch als Lipidose bezeichnet wird. Die Pharmaka bilden mit polaren Lipiden Komplexe, wodurch der hydrolytische Abbau der Lipide behindert wird (Lüllmann und Lüllmann-Rauch 1981).

Solch eine generalisierte Lipidose von unterschiedlichen kationisch-amphiphilen Substanzen (Tiloron, CL-2L, Chloroquin, Chlorphentermin, Amiodaron, Tamoxifen) führt z.B. bei Ratten im Lungengewebe zur Ausbildung von schaumzellartigen Makrophagen. Muskeln weisen Degenerationen und Nekrosen auf, Lymphozyten lamelläre Einschlüsse.

Im Bereich der Netzhaut konnte nachgewiesen werden, dass sich diese Pharmaka in unterschiedlichen Retinaarealen anreichern und hier zur Ausbildung einer Lipidose führen. (Bredehorn und Duncker 1999, Duncker und Bredehorn 1994 und 1996).

Im retinalen Pigmentepithel wie auch in den Ganglienzellen finden sich nach Tamoxifengabe kristalline und lamelläre Einschlusskörperchen.

Solche Ablagerungen fanden sich auch in autonomen Nerven sowie in endokrinen Drüsen (Hypophysenvorderlappen, Nebennierenrinde und -mark).

Über eine okuläre Toxizität des Tamoxifens wurde erstmals ausführlich von Kaiser-Kupfer et al. (1981) berichtet. Bei Patienten, die hohe Dosierungen (120-150 mg, 2x/d) erhalten hatten, fanden sie ein Makulaödem, weiße kristalline Einlagerungen in der Makula und paramakulär, Störungen des retinalen Pigmentepithels, weiße, wirbelartige Corneatrübungen sowie Visusverschlechterungen. Auch nach Absetzen der Tamoxifentherapie bildeten sich die Einlagerungen nicht zurück.

Andere Falldarstellungen, wie die von Griffin und Garnick (1981), Chern und Danis (1993), Griffiths (1987), Heier et al. (1994) und Vinding und Nielson (1983) berichteten über Retinopathien auch bei niedrigen Dosierungen von Tamoxifen (10-20 mg, 2x/d), die sich als intraretinale kristalline Ablagerungen, Neuritis nervi optici und Makulaödem manifestierten. Im Gegensatz zu Schäden durch hohe Dosierungen waren sie jedoch reversibel. Pavlidis und Petris (1992) berichteten in ihrer prospektiven Studie von okulären Nebenwirkungen (Visusabfall, korneale Einlagerungen, Makulaödem, paramakuläre weiße Einlagerungen) in 6,3% der mit 20 mg Tamoxifen täglich behandelten Patienten.

Lazzaroni et al. (1998) konnten in ihrer Studie bei niedriger Dosierung jedoch in keinem Fall ein Makulaödem bzw. eine Visusverschlechterung bemerken. Auch wiesen sie auf die schwierige Differentialdiagnose der kristallinen Ablagerungen zur idiopathischen juxtafovealen retinalen Teleangiektasie und zu Frühformen der alterskorrelierten Makuladegeneration hin.

Ihre elektroretinografischen Untersuchungen wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit („presumed tamoxifen retinopathy“) und ohne retinale Ablagerungen auf.

Parkkari et al. (2003) konnten in ihrer randomisierten Follow-up-Studie keine signifikanten okuläre Nebenwirkungen von Tamoxifen feststellen.

In der Fall-Kontroll-Studie von Gorin und Constantino (1998) konnte keine Visusbeeinträchtigung außer für das Farbsehen festgestellt werden. Dagegen waren intraretinale kristalline Ablagerungen und postkapsuläre Trübungen in der behandelten Gruppe häufiger.

Auch Longstaff (1989) et al. konnten keine okuläre Toxizität von Tamoxifen in niedriger Dosierung feststellen.

Morphologische tierexperimentelle Untersuchungen zur Lipidose durch Tamoxifen sind für die Species Ratte bekannt (Lüllmann und Lüllmann-Rauch 1981), jedoch gibt es bisher keine funktionellen Untersuchungen an Mäusen zu diesem Thema.

### **1.1.1. Wirkungsweise des Tamoxifens**

Tamoxifen ist eine synthetische, nichtsteroidale, antiöstrogene Substanz mit partiellen östrogen-agonistischen Effekten. Desweiteren hat Tamoxifen antioxidative, antivirale (durch Steigerung der Aktivität von „Natural Killer Cells“) und antibakterielle Eigenschaften sowie membranmodulierende und die intrazellulären Botensysteme verändernden Aktivitäten.

Zusätzlich besitzt Tamoxifen in vitro die Fähigkeit, auf die Zytostatikaresistenz (multiple drug resistance, MDR) z.B. von Doxyrubicin und Vinblastin Einfluß zu nehmen.

Die Wirkungsweise von Tamoxifen beruht auf der kompetitiven Hemmung am Östrogenrezeptor, wodurch die östrogenbedingte Stimulation der DNS-Synthese von Mammakarzinomzellen gehemmt wird. Dies ist jedoch nur möglich in Tumoren, die Östrogenrezeptoren exprimieren (etwa 50% der Fälle). Eine intrazelluläre Signalkaskade kann



die Wirkung von Tamoxifen in Richtung östrogen oder antiöstrogen modulieren (Mertens 1999).

Tamoxifen bindet auch an Antiöstrogenrezeptoren, die in rezeptornegativen Mammakarzinomzellen exprimiert werden.

Andererseits bewirkt Tamoxifen auch eine Hemmung der Proteinkinase C, welche für die Signalübertragung von der Zelloberfläche in das Zellinnere verantwortlich ist.

Die Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängigen cAMP-Phosphodiesterase vermindert deren zellproliferative Wirkung.

Weiterhin induziert Tamoxifen in den den Tumor umgebenden Zellen die Sekretion eines negativen Wachstumsfaktors, der TGF- $\beta$  transformiert und damit wachstumshemmend auf rezeptorpositive und –negative Tumorzellen wirkt.

Tamoxifen supprimiert IGF-I, der die Proliferation von rezeptorpositiven und –negativen Tumorzellen fördert.

Ebenso wird TGF- $\alpha$  gehemmt, welches in Überkonzentration zur malignen Veränderung von Geweben führt.

Diese Inhibition und die Aktivierung von Wachstumsfaktoren führen letztendlich zu einer Arretierung des Zellteilungszyklus in der G1-Phase.

### **1.1.2. Metabolismus**

Tamoxifen wird gut über den Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die Metabolisierung in Form von Phase-1-Reaktionen wie Demethylierung, Desaminierung und Hydroxylierung erfolgt in der Leber. Nur geringe Mengen werden über die Niere ausgeschieden. Die Hauptmetaboliten (N-Desmethyldamoxifen, 4-Hydroxydamoxifen) haben antiöstrogene Eigenschaften, welche wahrscheinlich zur gesamten antitumorösen Aktivität von Tamoxifen beitragen. Einige Metaboliten besitzen auch östrogene Eigenschaften, ihr Einfluß auf das Gesamtwirkungsprofil wird jedoch kontrovers diskutiert (Jordan and Chern 1982). In einer Reihe von Phase-II-Reaktionen, hauptsächlich Konjugation mit Glukuronsäure, wird eine höhere Löslichkeit in wässrigen Lösungen erreicht. Die Metaboliten werden über die Galle und den Stuhl ausgeschieden.

### 1.1.3. Pharmakokinetik

Zu 98% sind Tamoxifen und seine Metaboliten an Plasmaproteine gebunden. Ebenso ist die enterohepatische Rezirkulation hoch. An Östrogenrezeptoren werden nur freies Tamoxifen oder seine Metaboliten gebunden.

Während einer Dauertherapie wird die steady-state-Serumkonzentration von Tamoxifen nach ungefähr 4 Wochen erreicht, der Hauptmetabolit N-Desmethyltamoxifen benötigt dafür etwa 8 Wochen. Nach Absetzen der Therapie sinkt der Serumspiegel von Tamoxifen schneller ( $t^{1/2} = 7$  d) als der von N-Desmethyltamoxifen ( $t^{1/2} = 14$  d) (Fritsch and Jordan 1994). Es dauert jedoch einige Wochen, bis das Serum komplett von Tamoxifen und Metaboliten frei ist. Im Gewebe verbleiben sie sogar einige Monate.

Tamoxifen kann die Blut-Hirn-Schranke bei Brustkrebspatienten mit Hirnmetastasen überwinden, was auf das Fehlen einer Blut-Hirn-Schranke in neugebildeten Tumorgefäßen hinweist. Auch gibt es Hinweise, dass Tamoxifen die Choriokapillaris penetriert und zumindest das Pigmentepithel alterieren kann (Nayfield und Gorin 1996). Flaxel et al. (2000) berichten über die Nachweisbarkeit von Tamoxifen im Glaskörper und Kammerwasser.

### 1.1.4. Pathophysiologie

Durch den amphiphil-kationischen Charakter ist Tamoxifen in der Lage, in den Lysosomen zu akkumulieren und mit dem Katabolismus von polaren Lipiden zu interferieren. Dies führt zu lysosomalen Speicherstörungen, die sich in einer generalisierten Lipidose äußern (Lüllmann und Lüllmann-Rauch 1981, Ioannidis 1998). Die Lipidose ist ultrastrukturell gekennzeichnet durch lamelläre und kristalline Einschlusskörperchen.

Die kristallinen retinalen Einlagerungen bei Tamoxifentherapie scheinen mit axonalen Degenerationen in Zusammenhang zu stehen (Nayfield and Gorin 1996).

Tamoxifen bewirkt über Pyknose und Eingriffe in den Zellzyklus eine Veränderung der Lipidzusammensetzung intrazellulärer Membranen und Plasmamembranen. Diese Membranveränderungen im retinalen Pigmentepithel könnten das Entstehen einer Tamoxifenretinopathie begünstigen (Engelke et al. 2002).

### **1.1.5. Allgemeine Nebenwirkungen**

Die häufigsten Nebenwirkungen einer Tamoxifentherapie sind Hitzewallungen, Übelkeit/Erbrechen, vaginaler Ausfluß bzw. vaginale Blutungen, menstruelle Störungen und Hautausschlag. Weniger häufig, jedoch schwerwiegender sind Nebenwirkungen wie Knochenschmerzen, Hyperkalzämie, Endometriumhyperplasie, Polypen und Adenokarzinom des Endometriums. Hepatotoxische Nebenwirkungen reichen von asymptomatischer Transaminasenerhöhung bis zur Steatosis hepatis, cholestatischer Gelbsucht und Lebernekrose.

Seltene Nebenwirkungen sind Thrombozytopenie und Leukopenie.

Es wurde eine erhöhte Neigung zu thromboembolischen Komplikationen beschrieben (Saphner et al. 1991).

Positive Nebenwirkungen sind eine Besserung der Osteoporose und der Cholesterinwerte im Serum.

## **1.2. Fragestellung**

Ziel unserer Untersuchungen war es, unter Verwendung von elektrophysiologischen Methoden wie der Elektretinografie im Vergleich zu histologischen Untersuchungen und der Ophthalmoskopie Tamoxifen-induzierte funktionelle und morphologische Schädigungen der Netzhaut zu lokalisieren und gegebenenfalls zugrundeliegende Wirkungsmechanismen weiter aufzuklären.

Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

1) Bilden die Konzeption und der Aufbau eines ERG-Meßplatzes, mit dem tierexperimentelle Untersuchungen unabhängig von der Tierspezies (Maus, Ratte) und mit verschiedenen Reizparametern (Einzel- und Serienblitze, Ganzfeldstimulation, Variation der Lichtintensität) durchgeführt werden können, die notwendigen Voraussetzungen für die funktionellen Untersuchungen?

2) Ist die Auswahl der Stimulationsprogramme (Stimulation mit ansteigenden Intensitäten, skotopische Stimulation) geeignet, funktionelle Beeinträchtigungen zu ermitteln?

- 3) Lassen sich durch die Anwendung computergestützter Auswertungsmethoden (Einsatz von Hochpaß- und Tiefpaßfiltern) objektive und reproduzierbare ERG-Parameter bestimmen?
- 4) Kann durch Verlaufsmessungen der Einfluß der Dauer der Medikamentenapplikation unter besonderer Betrachtung des Einflusses auf Amplituden und Gipfelzeiten der a- und b-Wellen aufgezeigt werden?
- 5) Lassen sich funktionelle und morphologische Veränderungen nach chronischer Gabe von Tamoxifen und gegebenenfalls deren Reversibilität durch Messungen 16 Wochen nach Absetzen des Medikamentes nachweisen?
- 6) Welche Veränderungen lassen sich durch die ophthalmoskopische Untersuchung und Photodokumentation mittels Videoaufzeichnung nachweisen?
- 7) Welche histologischen Veränderungen der Retina können erhoben werden? Ist eine Korrelation der Ablagerungsmuster mit funktionellen Veränderungen möglich?
- 8) Tamoxifen soll an pigmentierten Mäusen eingesetzt werden. Können die Ergebnisse mit bereits an unpigmentierten Ratten gewonnenen Ergebnissen aus der Literatur verglichen werden?

### **1.3. Elektroretinographie (ERG)**

Die Elektroretinografie ist ein wichtiger Bestandteil der ophthalmologischen Diagnostik. Als nichtinvasive Untersuchungsmethode spiegelt sie die Funktion der Sehbahn auf der Ebene der Netzhaut wider.

Durch einen Lichtreiz werden in der Retina Einzelzellsignale ausgelöst, die in ihrer Gesamtheit das Elektroretinogramm ergeben. Dieses Gesamtsignal wird von der Retina über den Glaskörper bis zur Cornea in abgeschwächter Form weitergeleitet, wo es mittels Elektroden abgeleitet werden kann.

In unseren Untersuchungen wurde das Ganzfeld-ERG verwendet, das durch maximale Mydriasis und gleichmäßige Ausleuchtung eine Reizung der gesamten Netzhaut ermöglicht und damit ein Summenpotential der gesamten Netzhaut darstellt.

### 1.3.1. Komponenten des Elektretinogramms

Das ERG stellt ein Summenpotential dar, das durch Überlagerung verschiedener Signale entsteht. Die einzelnen Komponenten sind als „Prozesse“ P I - P III beschrieben worden (Adler 1959, Walsh 1992). Als Summe resultiert das typische biphasische ERG. (Abb. 1).

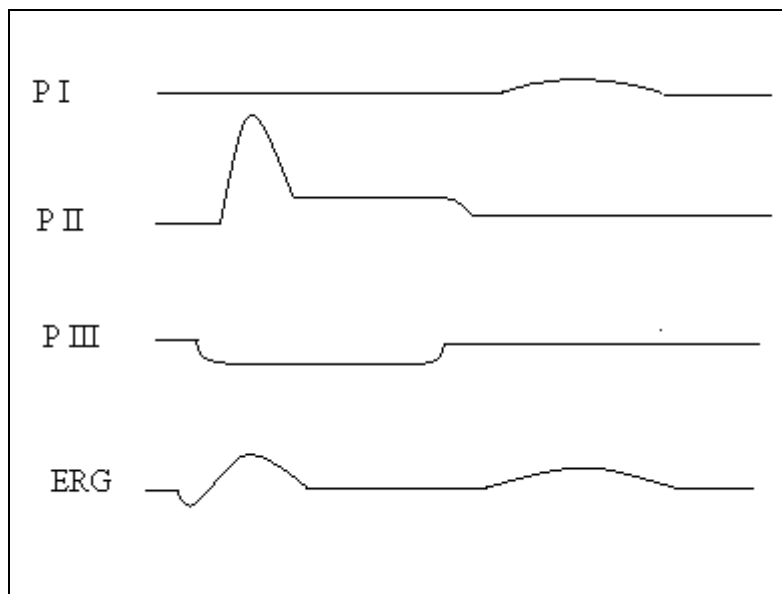


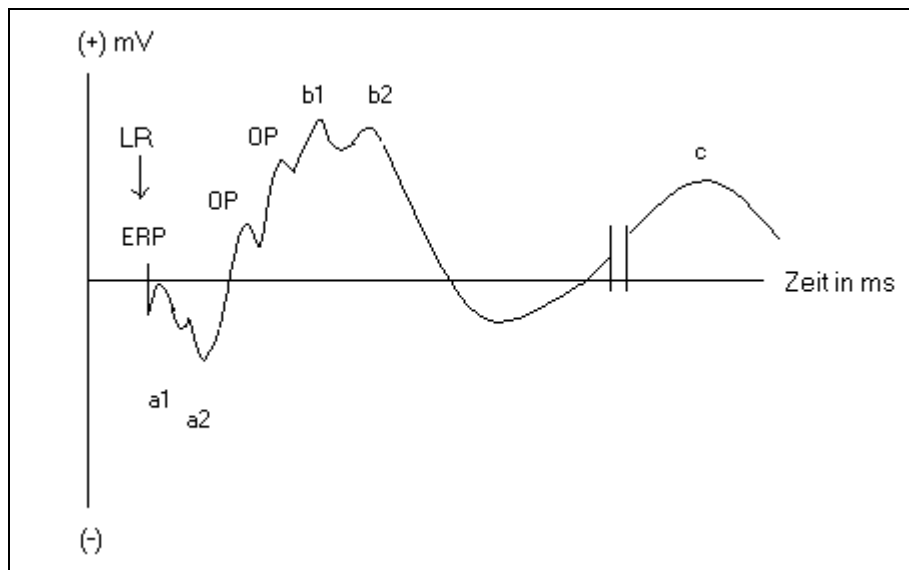
Abb. 1: Das ERG entsteht durch die Summation von P I, P II und P III.

Die a-Welle repräsentiert den ersten negativen Abfall von P III, dessen anhaltende Negativität von P II überlagert wird, der steile positive Ausschlag von P II resultiert in der b-Welle. Relativ unbeeinflusst zeigt sich der langsame positive Ausschlag von P I in der c-Welle.

Bei hohen Blitzintensitäten ist unmittelbar nach dem Blitzsignal als erstes das „Early Rezeptor Potential“ (ERP, siehe Abb. 2) sichtbar. Es besteht aus einer kleinen positiven und nachfolgend einer negativen Schwankung (Walsh 1992, Wachtmeister 1998). Nach dem ERP wird die negative doppelgipflige a-Welle sichtbar. Danach folgt die positive, ebenfalls doppelgipflige b-Welle, der die hochfrequenten oszillatorischen Potentiale aufgelagert sind. Bei niedrigen Blitzintensitäten ist die a-Welle noch nicht sichtbar, da sie ein länger dauerndes Signal ist, welches von der b-Welle überlagert wird. Bei zunehmender Lichtintensität tritt die a-Welle früher auf und wird dadurch vor der b-Welle sichtbar (Bach 1996).

Wird mit einem länger als 10s anhaltenden Lichtblitz gereizt, zeigt sich nach dem Abfall der b-Welle erneut ein langsamer Anstieg, die c-Welle (siehe Abb. 2).

Den unterschiedlichen Komponenten des Elektretinogramms können verschiedene Ursprungsregionen in der Netzhaut zugeordnet werden. Dies macht man sich zunutze, indem man zur Diagnostik retinaler Erkrankungen gezielt geeignete Lichtreize zur Analyse verschiedener Signalkomponenten auswählt (Bach 1996).



LR = Lichtreiz

OP = Oszillatorische Potentiale

ERP = Early Receptor Potential

a1, a2 = zweigipflige a-Welle

b1, b2 = zweigipflige b-Welle

c = c-Welle

Abb. 2: Schematische Darstellung des ERG

### 1.3.2. Entstehung der a- und b-Welle

Das Early Receptor Potential (ERP) wird durch das Ausbleichen des Pigments in den Rezeptoraussensegmenten nach Lichteinfall ausgelöst (Walsh 1992). Die zweigipflige a-Welle ist das späte Rezeptorpotential, ausgelöst durch die lichtinduzierte Hyperpolarisation der Photorezeptorinnensegmente (Wachtmeister 1998, Dowling 1970). Als Ursprung des a<sub>1</sub>-Gipfels werden die Zapfen (photopisch) und des a<sub>2</sub>-Gipfels die Stäbchen (skotopisch) angenommen (Berson 1991). Die ebenfalls zweigipflige b-Welle spiegelt die Funktion der Bipolarzellen wider, die indirekt über die Müller-Zellen vermittelt wird (Rager 1979). Eine

intakte Stäbchenfunktion ist auch hierfür vorauszusetzen. Der  $b_1$ -Gipfel ist wiederum zapfengesteuert (photopisch), der  $b_2$ -Gipfel ist stäbchengesteuert (skotopisch) (siehe Abb. 2).

Für die Beurteilung beider Wellen benutzt man das Blitz-ERG.

Durch länger anhaltende (10 s) Lichtreize wird die c-Welle generiert, welche die Funktion des Pigmentepithels widerspiegelt (Mieckley 1975, Wachtmeister 1998).

Das photopische Flimmer-ERG (nach 5-minütiger Helladaptation, 30 Hz Flimmerfrequenz) stellt eine reine Zapfenantwort dar, da die Stäbchenfunktion durch die Hintergrundbeleuchtung unterdrückt wird und die Stäbchen durch die hohe Frequenz ermüden.

Die hochfrequenten Oszillatorischen Potentiale spiegeln wahrscheinlich die Funktion der Horizontal- bzw. Amakrinzellen wider (Bach 1996).

Die Funktion der Ganglienzellen kann durch das Muster-ERG, das die Netzhaut nicht durch Blitzlicht, sondern durch Musterumkehr reizt, dargestellt werden.

Die Interaktion von Pigmentepithel und Photorezeptoren wird durch das Elektrokulogramm widergegeben.

### **1.3.3. Intensitätsabhängiges Verhalten**

Mit zunehmender Reizintensität nimmt die Amplitude der b-Welle zu, bis sie ein Plateau erreicht und bei maximaler Reizintensität ( $25000 \text{ mcDs/m}^2$ ) wieder ein wenig abfällt. Desgleichen verkürzt sich die Gipfelzeit mit zunehmender Reizintensität kontinuierlich (Hanitzsch 1970 a und b, Mieckley 1975).

Die a-Welle ist bei niedrigen Intensitäten noch nicht sichtbar, zeigt sich oberhalb einer Schwellenintensität und nimmt bis zu einem Plateau zu. Die Latenz verhält sich ebenso wie die der b-Welle.

Die Frequenz der oszillatorischen Potentiale nimmt mit ansteigender Lichtintensität ab, wohingegen die Amplituden zunehmen (Algvere et al. 1972, Wachtmeister 1974), siehe Abb. 3.

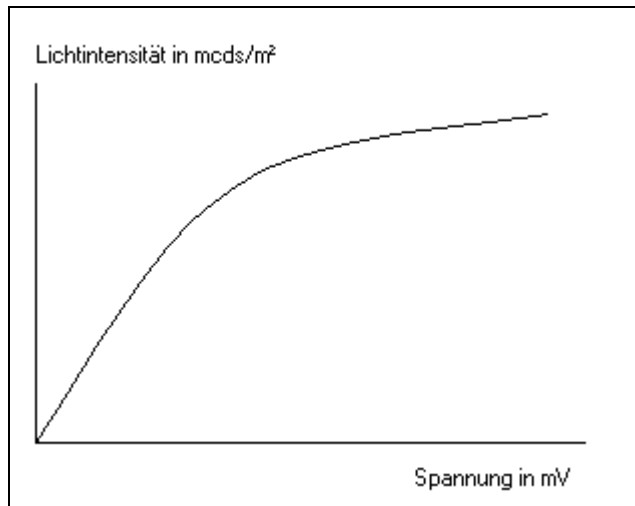


Abb. 3: Spannungs-Intensitätsfunktion der b-Welle

#### 1.3.4. Indikationen des ERG

Indikationen zur ERG-Untersuchung sind u.a. unklare Sehstörungen beim Säugling und Kleinkind, Frühstadien tapetoretinaler Degenerationen vorwiegend der Netzhautperipherie (z.B. Retinitis Pigmentosa) sowie des Netzhautzentrums (Zapfendystrophie), Multiple Sklerose, Achromatopsie, Leber's kongenitale Amaurose, kongenitale stationäre Nachtblindheit, unklare Gesichtsfeldveränderungen, Dunkelanpassungsstörungen, nicht objektivierbare Sehstörungen, Funktionsprüfung bei trüben Medien, posttraumatisch und bei Verdacht auf Aggravation (Niemeyer 1979 und 1999, Rüter und Zrenner 1993).

Vorbeugende Untersuchungen können bei eventuell zu erwartenden toxischen Veränderungen, die medikamentös bedingt sind (z.B. Chloroquin, Ethambutol, Phenothiazin, Alkohol/Tabak, Tamoxifen, Desferroxamin, Siderosis, Vitamin-A-Mangel) sinnvoll sein, um z.B. Ausgangsbefunde für Verlaufskontrollen zu erhalten. Ergänzende Farbsinnuntersuchungen sind oft notwendig.

Bei noch nicht funduskopisch sichtbarer diabetischer Retinopathie kann die Veränderung Oszillatorischer Potentiale (OP) prognostischen Wert haben. Die Verringerung bzw. Auslöschung der Amplituden der OP bei retinalen Gefäßverschlüssen kann das Ausmaß der Schädigung verdeutlichen und prognostische Hinweise hinsichtlich des Visus geben (Wachtmeister 1998).

Das Muster-ERG wird wegen der Reizung der Ganglienzellen vor allem in der Glaukomdiagnostik angewendet.



## 1.4. Normale Netzhaut der Maus

Der Aufbau der Netzhaut der Maus gleicht der des Menschen in seiner horizontalen, schichtförmigen Struktur. Sie besteht ebenfalls von außen nach innen aus dem retinalen Pigmentepithel, der Schicht der Stäbchen und Zapfen, der Membrana limitans externa, der äußeren Körnerschicht (Kerne der Photorezeptoren), der äußeren plexiformen Schicht (Fortsätze der Photorezeptoren und Dendriten der Bipolarzellen), der inneren Körnerschicht (Kerne der Bipolarzellen), der inneren plexiformen Schicht (Dendriten der Bipolarzellen und der Ganglienzellen), der Ganglienzellschicht, der Nervenfaserschicht und der Membrana limitans interna. Die Müllerzellen (glöse Stützzellen) durchziehen die gesamte Netzhaut.

Die Retina der Maus ist vom Stäbchentyp (Bellhorn 1981). Im Gegensatz zur humanen Netzhaut besitzt die der Maus keine Fovea centralis. Die Stäbchen (ca. 97,2%) und Zapfen (ca. 2,8%) sind etwa gleichförmig über die gesamte Netzhaut verteilt (Carter-Dawson und LaVail 1979). Die Zapfen der Maus unterteilen sich in 2 unterschiedlich spektral sensitive Klassen mit spezifischer Verteilung: Die Zapfen für mittlere Wellenlängen befinden sich in der oberen Netzhauthälfte (für das vom Boden reflektierte Licht), die Zapfen für kurze Wellenlängen befinden sich in der unteren Netzhauthälfte (Szel et al. 1992).

Aufgrund der oben beschriebenen Verteilung der Zapfen und Stäbchen bei der Maus, ist die Ganzfeld-ERG-Untersuchung, bei der die gesamte Netzhaut ausgeleuchtet und stimuliert wird, eine adäquate Methode zur Untersuchung funktioneller Veränderungen bei der Maus.

Das ERG der Maus unterscheidet sich prinzipiell nicht von dem des Menschen. Alle Komponenten sind vorhanden. Die Oszillatorischen Potentiale sind allerdings weitaus stärker ausgeprägt, so dass durch die Überlagerung der b-Welle durch die OP die Bestimmung des b-Wellenmaximums schwieriger wird. Auf diese Problematik wird unter 2.5. eingegangen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Versuchssubstanz Tamoxifen

Synonyme: - (Z)-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-butenyl)-phenoxy]-N,N-dimethylethylamin  
- 1-[p-[2-(Dimethylamino)-ethoxy]phenyl]-trans-1,2-diphenyl-1-buten

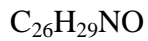
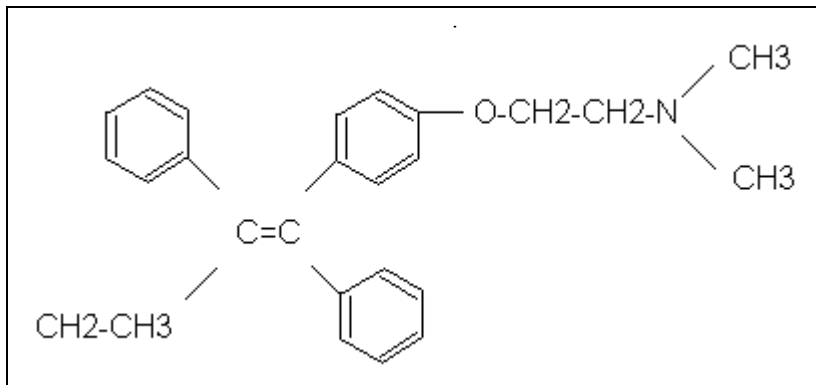


Abb. 4: Strukturformel des Tamoxifens

## 2.2. Versuchstiere

Die Tierversuche wurden gemäß dem gültigen deutschen Gesetz für Tierversuche durchgeführt (AZ 43a-42502 MLU-Halle).

Es wurden weibliche pigmentierte Mäuse vom Stamm C57Bl eingesetzt. 24 Tiere wurden 16 Wochen lang mit Tamoxifen (150-180 mg/kg KG) gefüttert, die Kontrollgruppe bestand aus 19 Tieren (siehe Tab. 1). Nach jedem Messzyklus im Abstand von 4 Wochen wurden einige Tiere zur histologischen Aufarbeitung herausgenommen.

**Tab. 1:** Anzahl und Versuchsdauer für behandelte Tiere und Kontrollen

	Tamoxifen	Kontrollen
Beginn	24	19
4 Wochen	24	19
8 Wochen	22	18
12 Wochen	18	17
16 Wochen	14	17
32 Wochen	11	15
37 Wochen	11	15
45 Wochen	11	14

Bei Versuchsbeginn hatten die Tiere ein Alter von 4 Wochen und ein Ausgangsgewicht von 19-22 g.

### 2.2.1. Haltung der Tiere

Die Mäuse wurden im Tierstall der MLU in standardisierten Käfigen zu je 5 oder 6 Tieren gehalten. Die Kennzeichnung der Tiere erfolgte durch eine Codierung über den Käfig (A-F) und Markierungen an den Ohren (keine Markierung: “(.)“, rechts: “r“, links: „l“, rechts und links: „rl“, zwei mal rechts: „rr“, zwei mal links: „ll“), z.B. A(.), Ar, Crl, Err usw. (siehe Abb.5).



Abb. 5: Beispiel für eine Ohrmarkierung

Das Markieren der Ohren ist für die Tiere nicht schmerzhaft und unblutig, da in der dünnen Haut der Ohren weder sensible Nervenfasern noch Blutgefäße vorhanden sind.

Nach Ankunft der Tiere im Tierstall wurden sie zunächst zur Adaptation an die Bedingungen im Tierstall eine Woche lang mit Normalfutter (in Pellets) gefüttert. Danach erhielten sie gemahlene Normalfutter aus speziellen, von uns entwickelten Futtertrögen, die eine Futteraufnahme ermöglichen, das Verspielen von Futter jedoch weitgehend verhindern sollen und zu denen die Mäuse freien Zugang hatten. In einer Gewöhnungsphase wurde die durchschnittlich aufgenommene Futtermenge ermittelt.

Bei der Medikamentenapplikation entschieden wir uns für das gemahlene Futter mit eigens angemischter Tamoxifenkonzentration statt für industriell gemischte Medikamenten-Pellets, da wir so flexibler auf Schwankungen in der Futteraufnahme reagieren konnten.

Zu Versuchsbeginn bestimmten wir das Ausgangsgewicht der Tiere. Im weiteren Verlauf wurde alle 2-3 Tage das Gewicht kontrolliert, die verbrauchte sowie verspielte Futtermenge bestimmt und daraus die effektiv von den Mäusen gefressene Futtermenge bestimmt.

Die Kontrolltiere wurden zu den gleichen Bedingungen wie die behandelten Tiere gehalten, jedoch ohne Medikamentenzusatz zum Futter.

### **2.2.2. Applikation der Medikamente**

Anhand der ermittelten Futtermenge, welche die Mäuse pro Tag aufnehmen, wurde dem gemahlene Futter eine bestimmte Menge Tamoxifen zugemischt, um die Zieldosis von 150-180 mg Tamoxifen pro kg Körpergewicht pro Tag zu erreichen. Aus der Differenz zwischen verbrauchter Futtermenge und verspieltem Futter, dessen Menge durch Aussieben der Spreu vom Boden des Käfigs ermittelt wurde, dividiert durch die Anzahl der Mäuse pro Käfig und Zahl der Tage zwischen den Messungen ergab sich die tatsächlich aufgenommene Futtermenge pro Maus pro Tag.

Eine Dosisreduktion erfolgte, wenn die Tiere zu stark unter den Nebenwirkungen litten und vital gefährdet waren. Dass hierbei die Zieldosis nicht eingehalten werden konnte, wurde in Kauf genommen.

Die Dauer der Tamoxifenapplikation betrug 16 Wochen, weitere 29 Wochen (Versuchsende nach 45 Wochen) wurden die Mäuse mit Normalfutter in Form von Pellets gefüttert, da diese eher der physiologischen Nahrungsaufnahme von Nagetieren entsprechen als gemahlene Futter.

### 2.2.3. Vorbereitung der Tiere auf die ERG-Ableitungen

Mäuse sind nachtaktive Tiere und reagieren sehr empfindlich auf Lichtwechsel, deshalb erfolgte die Dunkeladaptation über 14 Stunden in der Nacht. Die Messungen wurden am nächsten Vormittag durchgeführt, wodurch die Tiere keinem mehrmaligen Hell-Dunkel-Wechsel ausgesetzt wurden. Alle Tiere wurden gleichermaßen unter diesen Bedingungen untersucht.

Die weitere Vorbereitung der Tiere unmittelbar vor der Messung führten wir unter schwachem Rotlicht durch.

Etwa 10 min. vor Beginn der Messungen wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Mischinjektion von Ketanest und Rompun (Ketavet= 100 mg / kg KG; Rompun= 1,5 mg / kg KG) narkotisiert. Die Dilatation der Pupillen erfolgte mit Tropicamid (Bellhorn 1981, Kueng-Hitz et al. 1999) sofort im Anschluß. Eine wiederholte Applikation des Mydriatikums erfolgte unmittelbar vor Beginn der Messung, um die Mydriasis für die gesamte Messung aufrechtzuerhalten. Auf Atropin- und Cyclopentolat-Tropfen wurde verzichtet, da über eine erhöhte Mortalität in Kombination mit der Ketamin- und Xylazinnarkose berichtet wurde (Heckenlively et al. 1989). Mit Oxybuprocain 0,4% Augentropfen wurden die Augen zusätzlich anästhesiert.

In vollständiger Narkose wurden die Tiere an das Meßgerät angeschlossen. Die ringförmigen Ableitungselektroden (Platindraht, Durchmesser 0,25 mm, siehe Abb. 5) wurden auf beide Augen platziert. Aufgrund der geringen Größe des Mausauges wurde auf die Verwendung von Kontaktlinsen wie bei Untersuchungen an Ratten (Bredehorn und Duncker 2000, Bredehorn et al. 2001) verzichtet, sondern mittels einer Methocelbrücke der elektrische Kontakt zur Hornhaut hergestellt. Zwei Referenzelektroden (Stahldraht) stachen wir in die Haut über dem Nasenrücken ein. Zur besseren Stabilisierung der Ableitungsvorrichtung wurden die Kabel am Meßtisch angeklebt. Die Erdung erfolgte am Schwanz der Maus mittels Methocels auf einer Metallplatte. Die Applikation der Elektroden an der Maus erfolgte außerhalb des Ganzfeldstimulators, danach wurde die Meßplatte soweit in die Ganzfeldkugel geschoben, daß der Kopf der Maus im Zentrum der Ganzfeldkugel positioniert wurde, vergleiche Abb. 6.

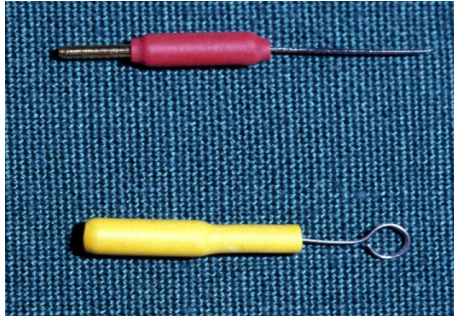


Abb. 6 : Referenzelektroden (oben) und Ableitelektroden (unten)

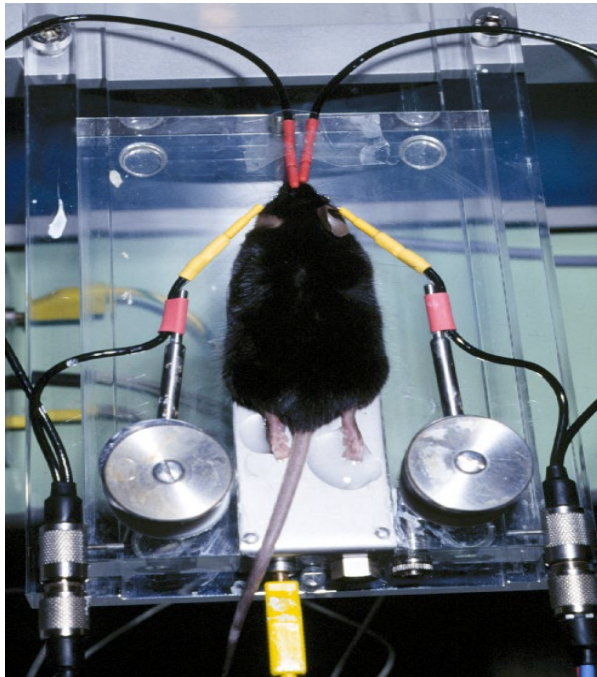


Abb. 7: Versuchsanordnung der Maus

Nach jeder Messung wurden die Elektroden mit handelsüblicher Desinfektionslösung desinfiziert und von Methocelresten gesäubert.

Im Fall einer nicht ausreichenden Narkose wurde nicht nachinjiziert, da Narkotika selber einen Einfluß auf das ERG haben und dieses dann nicht mehr vergleichbar zu dem bei allen anderen Tieren gewesen wäre (Kueng-Hitz et al. 1999). Diese Tiere wurden nach einer Erholungsphase einige Tage später erneut narkotisiert und untersucht.

### 2.3. Aufbau des ERG-Meßplatzes

Das Grundprinzip des Messplatzes übernahmen wir aus Erfahrungen der Arbeitsgruppe Bredehorn et al. (1994), welches jedoch mit neuen technischen Möglichkeiten weiterentwickelt wurde. Wir führten die Messungen mit dem Ganzfeldstimulator der Firma Roland Consult durch. Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurde eine spezielle Schiebemeßplatte aus durchsichtigem Polyacryl mit einer speziellen Halterung für die Ringableitelektroden (Platindraht, Ringdurchmesser 2,5 mm) und Referenzelektroden (Stahldraht) zur Positionierung im Ganzfeldstimulator gebaut.

Die Triggerung und Steuerung der Beleuchtungsstärke erfolgte über den PC. Der ERG-Verstärker (2-Kanal), Bandbreite 0,3-1000 Hz, Verstärkung 100, 1000, 10000 war über den PC einstellbar.

Es wurde ein Pentium PC mit dem Betriebssystem Windows NT 4.0 verwendet. Die originalen Analogdaten (ERG) wurden in EXCEL-Dateien gespeichert. Die Bearbeitung der Analogdaten, sowie manuelle und interaktive Merkmalsextraktion erfolgte mit Hilfe der grafischen Programmiersprache „LabView“ (National Instrument, Ennetbaden, Schweiz).

Die Übergabe der ermittelten Merkmale an EXCEL erfolgte via DDE (Lehnich et al. 1999 und 2000) siehe Abb. 8.

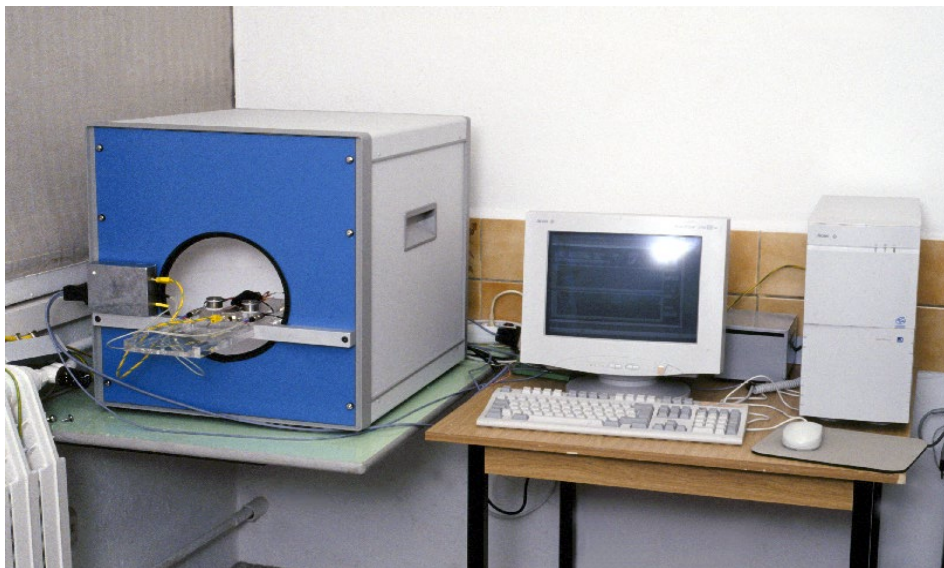


Abb. 8 Aufbau des Messplatzes

## 2.4. Durchführung der Messungen

Vor Fütterungsbeginn und nach 4-, 8-, 12- und 16wöchiger Tamoxifenapplikation wurden ERG-Messungen durchgeführt. 16, 21 und 26 Wochen nach Ende der Tamoxifenapplikation wurden die Tiere zur Verlaufskontrolle gemessen. Nach den oben angegebenen Zeiten wurden je 1-2 Tiere zu histologischen Untersuchungen herausgenommen.

Die Messungen erfolgten unter skotopischen Bedingungen.

### Reizparameter

Die Meßreihe bestand aus einer Serie von 15 Einzelblitzen, deren Meßergebnisse mittels des elektronischen Auswerteprogramms LabView gemittelt wurden.

Mit folgenden Lichtintensitäten wurden die Retinae gereizt:

- 1 mcDs/m<sup>2</sup>, 10 mcDs/m<sup>2</sup>, 30 mcDs/m<sup>2</sup>, 100 mcDs/m<sup>2</sup>, 300 mcDs/m<sup>2</sup> mit einer Frequenz von 0,5 Hz
- 3000 mcDs/m<sup>2</sup> mit 0,2 Hz (entspricht Standardblitz)
- 25000 mcDs/m<sup>2</sup> mit 0,1 Hz

Nach Abschluß der Messungen entfernten wir vorsichtig etwa vorhandene Reste des Methocels vom Auge und applizierten einen Tropfen Tränenersatzmittel (Liquifilm) auf beide Augen, um das Austrocknen der Hornhaut zu vermeiden.

## 2.5. Auswertungsparameter

Die sehr ausgeprägten Oszillatorischen Potentiale stellten ein Problem bei der Auswertung der b-Welle dar, da diese von den Oszillatorischen Potentialen stark überlagert ist. Eine Möglichkeit der Darstellung der Oszillatorischen Potentiale besteht in der Benutzung eines Hochpassfilters (ab 70 Hz), der die niederfrequenten a- und b-Wellen herausfiltert. Wir haben uns gegen einen Hardwarefilter entschieden, da er von vornherein die gemessenen Urdaten verfälscht. Mit Hilfe eines Softwareprogramms filterten wir die Meßkurve



nachträglich, um die Oszillatorischen Potentiale bzw. die „gereinigte“ b-Welle allein darstellen zu können.

Um die Amplituden und Gipfelzeiten der a- und b-Welle zu bestimmen, nutzten wir folgende Methode:

1. Gipfelzeiten: vom Blitz (definiert nach 50 ms) bis zum Maximum der a- oder b-Welle
2. a-Welle: vom Ausgangspotential bis zum ersten negativen Tal
3. b-Welle: Da die b-Welle sehr stark von den Oszillatorischen Potentialen überlagert ist, wurde das Maximum auf einer geglätteten Kurve durch die Oszillatorischen Potentiale hindurch gesetzt. Die Amplitude der b-Welle wurde vom Tal der a-Welle bis zum Gipfel der b-Welle (geglättete Kurve) gemessen ( nach Algvere et al. 1972), vergleiche Abb. 9.

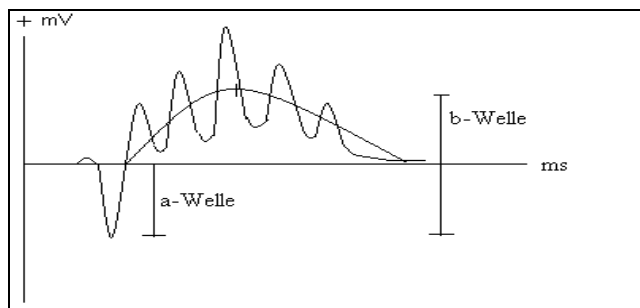


Abb. 9 Schematische Bestimmung der b-Welle nach Algvere et al. (1972)

Mittels eines Softwarefilters (20 Hz) wurden die Oszillatorischen Potentiale herausgefiltert und ein Cursor automatisiert auf dem Maximum der resultierenden „reinen“ b-Welle gesetzt (siehe Abb. 9, blaue Kurve).

Bei niedrigen Lichtintensitäten beträgt die Frequenz der Oszillatorischen Potentiale etwa 100 Hz, sie lassen sich gut von a- und b-Welle trennen und herausfiltern. Bei höheren Lichtintensitäten, z.B. 3000 mcDs/m<sup>2</sup>, sinkt die Frequenz der Oszillatorischen Potentiale auf 50-70 Hz und kommt damit in die Bereiche der a-Welle, die durch den Filterungsprozess verändert wird. Das heißt, die Amplitude der a-Welle wird kleiner und die Gipfelzeit verschiebt sich nach hinten.

Aus diesem Grund wurde die Messkurve für die Bestimmung der a-Welle mit 150 Hz gefiltert, was die a-Welle unverändert belässt. Auch die Bestimmung der a-Wellen-Amplitude erfolgte automatisch (Abb. 10, rote Kurve). Die Lage der automatisch gesetzten Cursor bei Bestimmung der a- und b-Wellenamplituden wurde durch den Untersucher kontrolliert und

bei selten aufgetretenen groben Unstimmigkeiten nach medizinischem Sachverstand korrigiert.

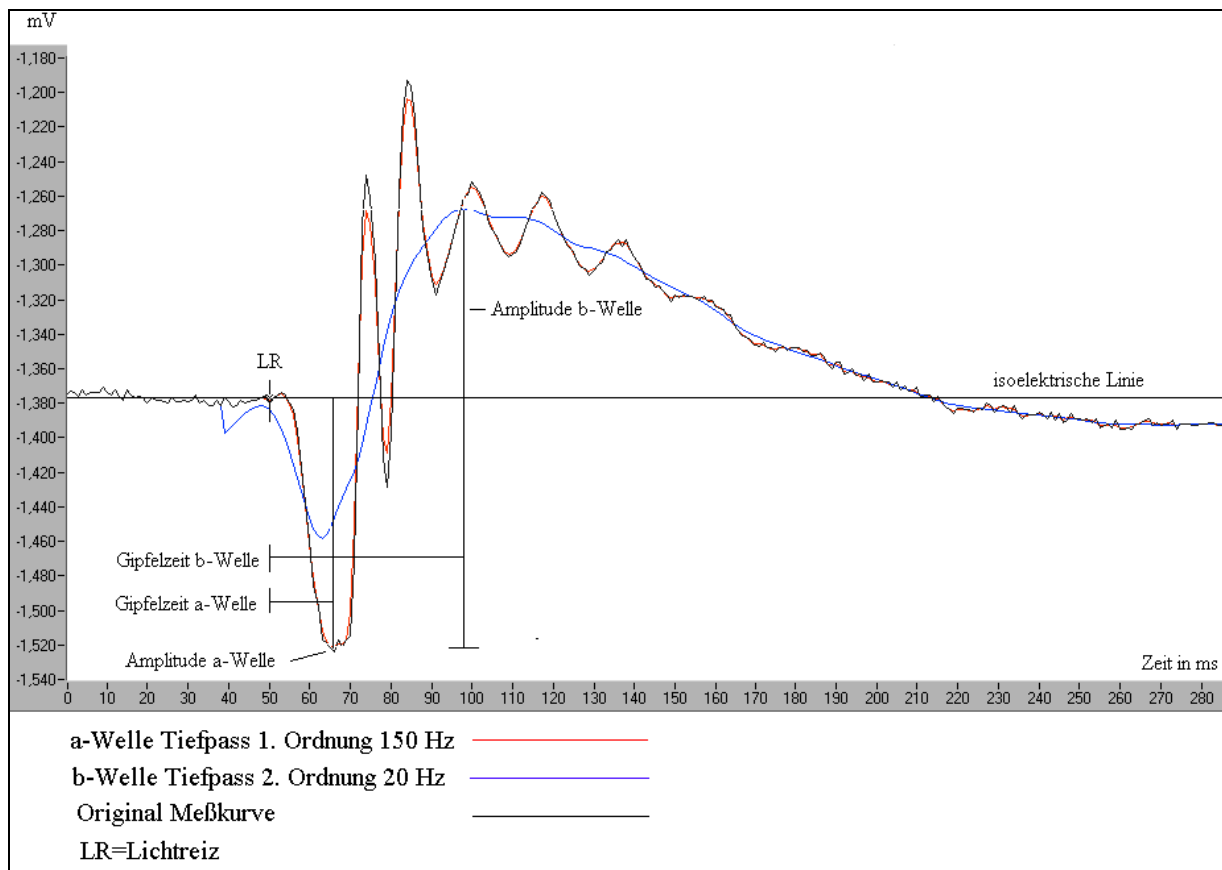


Abb. 10: Original Messkurve, Kontrolltier 0 Wochen, Reizintensität 3000 mclds/m<sup>2</sup>, skotopisch

## 2.6. Fehlerquellen

Um die methodischen Fehlerquellen gering zu halten, wurde streng darauf geachtet, den Versuchsablauf bei jeder Messung gleich zu halten.

Ein Einfluß der zirkadianen Rhythmik der Maus wurde ausgeschlossen, indem die Messungen immer zur gleichen Tageszeit erfolgten.

Bei nicht ausreichender Narkose wurde kein Narkotikum nachinjiziert, sondern das Tier einige Tage später nachuntersucht. Der Einfluß eines Narkotikums auf das ERG ist bekannt (Jaißle 2000). Mit der späteren Nachuntersuchung wollten wir eine unterschiedlich hohe Blutkonzentration des Narkotikums vermeiden, um diesen Parameter bei allen Mäusen gleich zu halten.

Die Elektrodenpositionierung stellte den empfindlichsten Teil des Versuchsaufbaus dar. Zeigte eine aufgezeichnete ERG-Kurve Störungen, lag dies meist an den Elektroden, die sofort repositioniert wurden, bis eine störungsfreie Kurve gemessen werden konnte.

Das Mydriatikum wurde nach strengem Zeitplan appliziert, nämlich 10 min. und unmittelbar vor Beginn der ERG-Ableitung. Besonders wichtig ist eine weite Pupille bei der skotopischen Ableitung, da hier die in der gesamten Peripherie befindlichen Rezeptoren (vor allem Stäbchen) gereizt werden (Müller-Limmroth 1959, Ogden 1989). Bei der photopischen Ableitung sind hauptsächlich die Zapfen in Anspruch genommen, die in der Peripherie nicht so häufig vorkommen, wenn auch der Gradient weniger deutlich als beim Menschen ist. Somit ist die Auswirkung auf die Amplitude durch eine engere Pupille photopisch nicht so gravierend wie skotopisch (Hoffmann et al. 1978).

## **2.7. Gewebepräparation für die Lichtmikroskopie**

Nach erfolgter ERG-Messung, noch in tiefer Narkose, wurden die Tiere nach Eröffnung des Thorax durch Eröffnung des linken Ventrikels getötet. Eine Vorderkammerspülkanüle wurde in den linken Vorhof vorgeschoben und das Gefäßsystem mit Fixiermittel (3% Glutaraldehyd in 0,1molarem Phosphatpuffer) perfundiert. Über den eröffneten rechten Vorhof floß das Fixiermittel ab.

Danach erfolgte die Entnahme der Bulbi sowie weiterer Organe und Gewebe wie Hirn, Leber, Lunge und Rippe.

Das Gewebe wurde dann in 0,1molarem Phosphatpuffer gespült und in 2%iger, ungepufferter Osmiumlösung zwei Stunden nachfixiert. Danach erfolgte die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 100%) und die Einbettung über das Intermedium Propylenoxid in Araldit.

Die Semidünnschnitte (0,5µm) wurden mit 0,1%iger Toluidinblaulösung gefärbt und mit einem Photomikroskop photographiert.

## **2.8. Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Computerprogramme Microsoft Excel und SPSS 9.0.

Mit der explorativen Datenanalyse wurden aus den Messwerten Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen und Quartile bestimmt. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.

Die Mittelwertvergleiche (Amplituden der a- und b-Wellen, Gipfelzeiten der a- und b-Wellen,) erfolgten mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Zur graphischen Darstellung wurden Boxplots verwendet. Die Normalverteilung der Messwerte wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Allgemeine Nebenwirkungen des Medikamentes

Die behandelten Tiere verloren im Verlauf des Versuches durchschnittlich 14,6% ihres Körpergewichtes (22,4 g auf 19,2 g). Im Gegensatz dazu nahmen die Kontrolltiere um durchschnittlich 4 % (21,2 g auf 22,5 g) zu (vergleiche Abb. 11).

Nach Absetzen des Tamoxifens nahmen die Tiere innerhalb von wenigen Tagen wieder um 20,8% (4 g) zu.

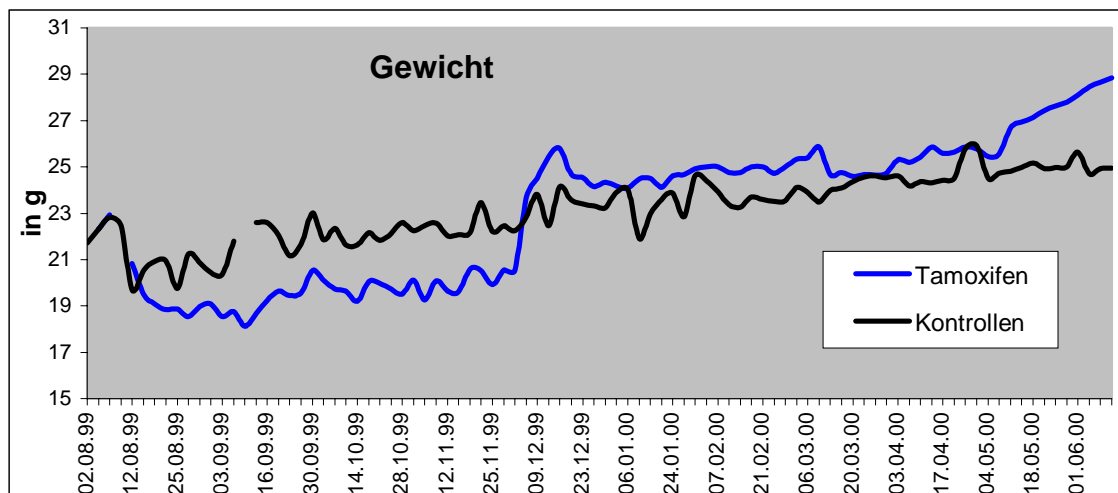


Abb. 11: Gewichtsentwicklung der Tamoxifen- und Kontrolltiere

Die Futtertröge wurden von den Tieren gut angenommen. Es wurden durchschnittlich 2-10% der Futtermenge verspielt.

Die behandelten Mäuse nahmen täglich 2,5 g Futter zu sich. Die Kontrolltiere fraßen 2,9 g (siehe Abb. 12).

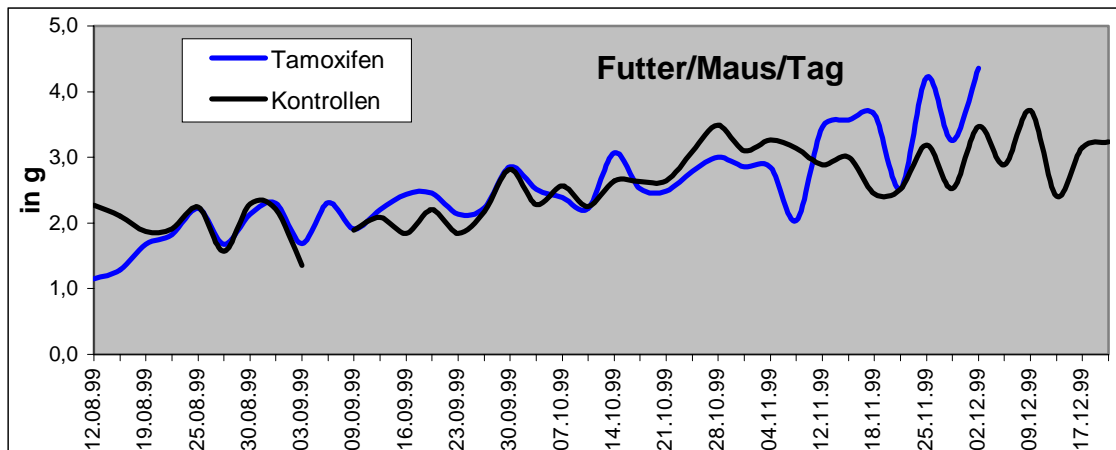


Abb. 12: Futteraufnahme pro Tag

Damit lag die tägliche Dosis von Tamoxifen im Durchschnitt bei 184,7 mg pro kg Körpergewicht (siehe Abb. 13).

Die mittlere kumulative Dosis Tamoxifen betrug 410 mg nach 16 Wochen Medikamentenapplikation.

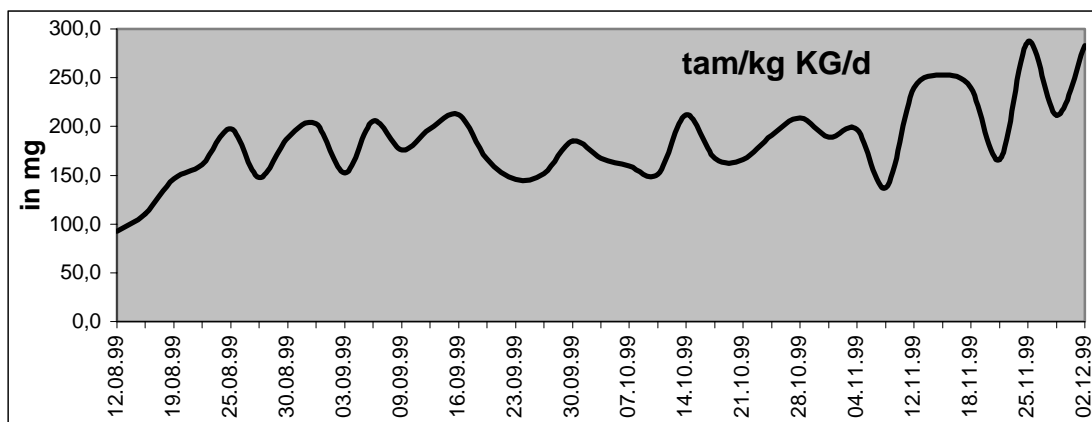


Abb. 13: Tamoxifendosis pro kg KG pro Tag

Während der Tamoxifenbehandlung wurden die Mäuse zunehmend apathisch, schwach und reagierten träge. Nach Absetzen des Medikamentes besserte sich der Zustand der Tiere sofort. Sehr deutlich war eine diffuse Alopezie zu beobachten, die jedoch nicht so schnell reversibel war.

Zwei Tiere litten unter Wundheilungstörungen der Elektrodeneinstichstellen.

Die Kontrolltiere waren in ihrem Verhalten und Befinden in keiner Weise beeinträchtigt.

Drei Tiere sind an den Tamoxifennebenwirkungen verstorben. Zwei von fünfundzwanzig behandelten und eines von neunzehn Kontrolltieren erwachten nicht aus der Narkose.

## 3.2. ERG-Meßergebnisse

### 3.2.1. Ausgangswerte

Für die Auswertung der Ausgangswerte standen insgesamt 40 Mäuse zur Verfügung, 23 zu behandelnde Tiere und 17 Kontrolltiere.

Erwartungsgemäß bestanden zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede in Amplituden und Gipfelzeiten vor Beginn der Tamoxifenapplikation.

Aus gerätetechnischen Gründen war eine Schwellenwertbestimmung nicht möglich. Die kleinste Lichtintensität betrug 1 mcDs/m<sup>2</sup>. Dabei sind eine deutliche b-Welle sowie häufig auch schon oszillatorische Potentiale zu erkennen. Bei Steigerung der Reizintensität nahm die Amplitude der b-Welle bis zu einem Plateau bei 300-3000 mcDs/m<sup>2</sup> zu, um dann bei 25000 mcDs/m<sup>2</sup> wieder etwas zu sinken. Dieses Verhalten spiegelt eine normale Intensitäts-Spannungs-Funktion wider (siehe Abb. 14 und 15).

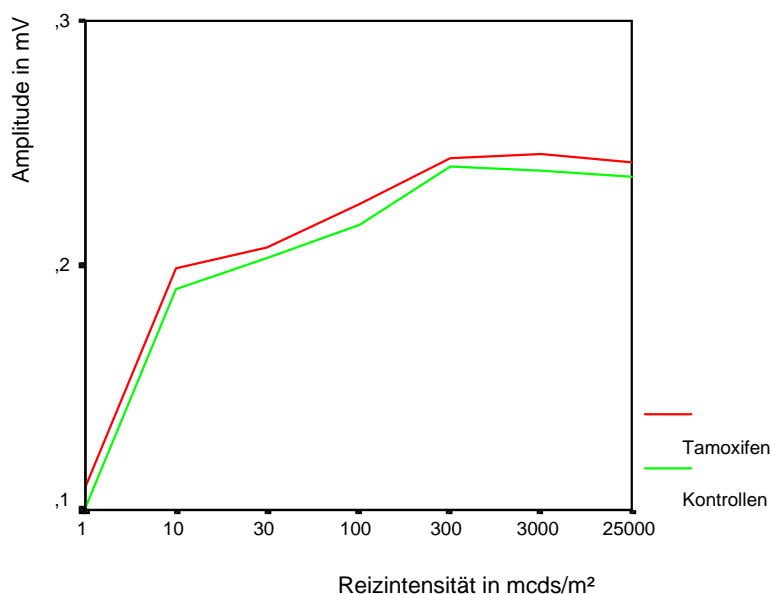


Abb. 14: Mittelwerte der Amplitude der b-Welle in Abhängigkeit von der Reizintensität zu Versuchsbeginn

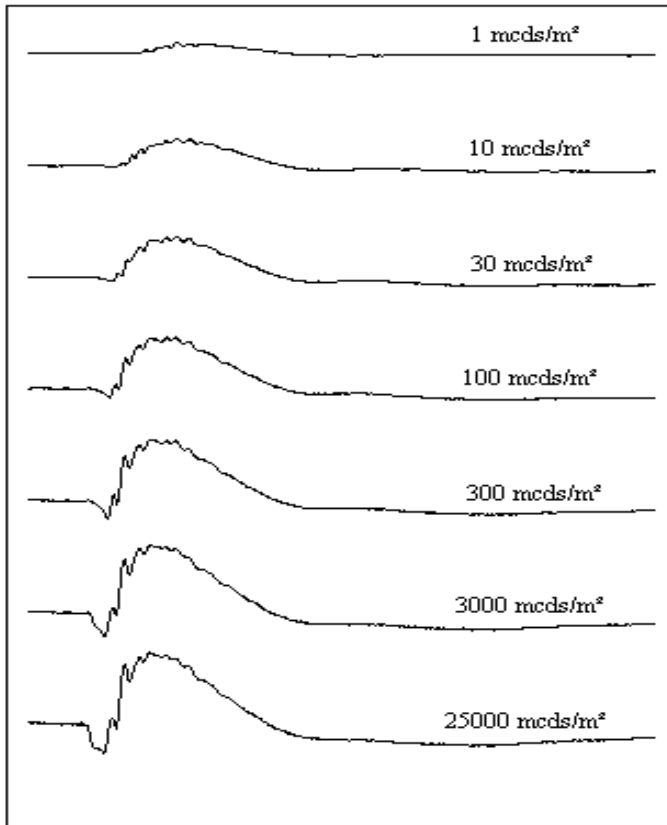


Abb. 15: Original-Messkurven zu Versuchsbeginn mit ansteigender Reizintensität

Die Gipfelzeiten der a- und b-Welle verringerten sich mit zunehmender Reizintensität. Auch dies entspricht der normalen Intensitätsabhängigkeit (siehe Abb. 16).

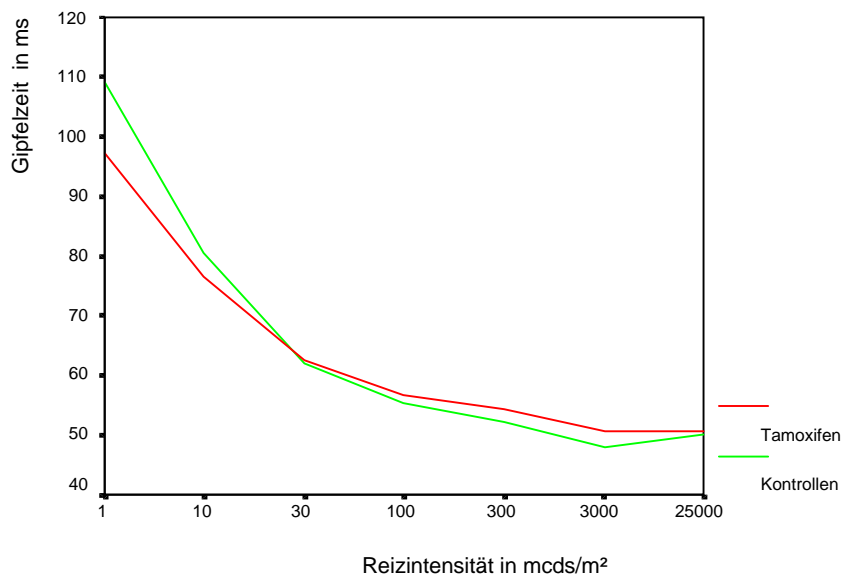
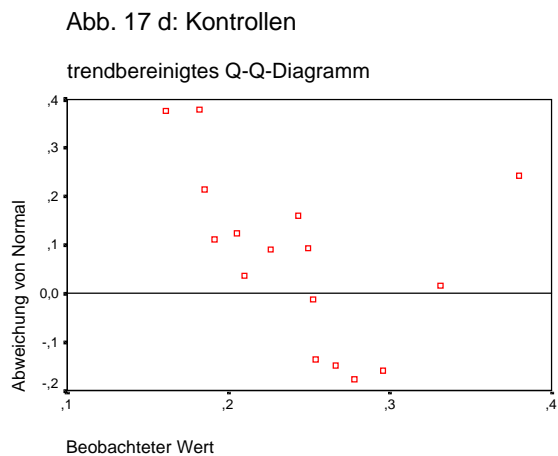
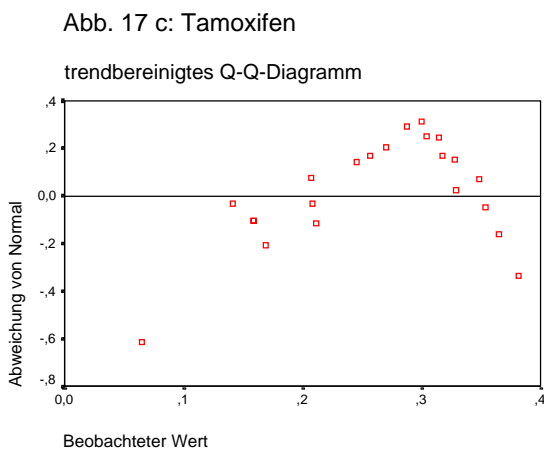
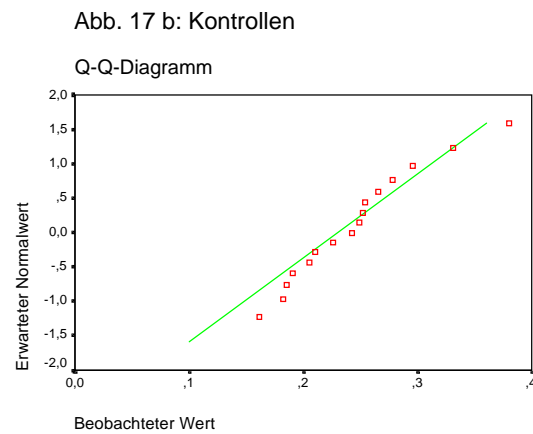
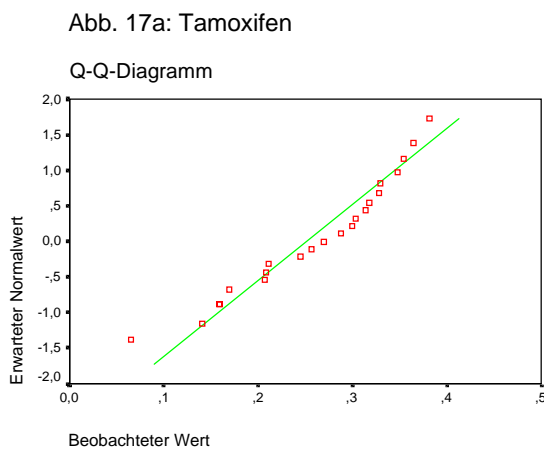


Abb. 16: Mittelwerte der Gipfelzeiten der b-Welle zu Versuchsbeginn bei ansteigender Reizintensität

Tabelle 2, S. 55 zeigt alle Mittelwerte der b-Wellenamplituden der Kontrollgruppe und der Tamoxifengruppe für alle Untersuchungsdaten und alle Reizintensitäten.

Die Ausgangswerte zeigten eine annähernde Normalverteilung, Abb. 17a-d zeigen die Q-Q-Diagramme und die trendbereinigten Q-Q-Diagramme der Amplituden der b-Welle bei 3000 mcDs/m<sup>2</sup> zum Ausgangszeitpunkt.

Abb. 17 a-d: Normalverteilungsdiagramme der b-Wellen-Amplitude zum Ausgangszeitpunkt



Der Kolmogorov-Smirnov-Test gab eine Signifikanz von 0,2 sowohl für Tamoxifen als auch für die Kontrollen an, was für eine Normalverteilung in beiden Gruppen spricht. Der Shapiro-Wilk-Test (für Stichproben mit weniger als 50 Fällen) ergab ebenso eine Normalverteilung mit einer Signifikanz von 0,21 für Tamoxifen und 0,139 für die Kontrollen.



Tabelle 3, S. 56 zeigt die Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov- sowie des Shapiro-Wilk-Tests für die b-Wellenamplitude bei 3000 mcDs/m<sup>2</sup> für alle Messzyklen. Nur die Tamoxifengruppe nach 16 Wochen Medikamentenapplikation zeigte keine Normalverteilung. Hier ist die geringe Fallzahl von 8 Tieren zu beachten. Von allen anderen Messdaten lag sowohl bei der Tamoxifen- als auch bei der Kontrollgruppe eine Normalverteilung vor.

### 3.2.2. ERG-Veränderungen bei behandelten Tieren

Für den Vergleich zwischen behandelten Tieren und den Kontrolltieren wurde die Reizintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup> herausgegriffen, da diese dem Standardblitz beim Menschen entspricht (Marmor und Zrenner 1995).

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen Original-Meßkurven eines Tamoxifen- und eines Kontrolltieres zu Beginn der Versuche und nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation bei einer Reizintensität von 3000 mcDs/m<sup>2</sup>. Deutlich ist die Amplitudenreduktion bei dem behandelten Tier zu erkennen. Auch das Kontrolltier zeigte eine Amplitudenreduktion, die jedoch geringer als bei dem Tamoxifentier ausgeprägt war.

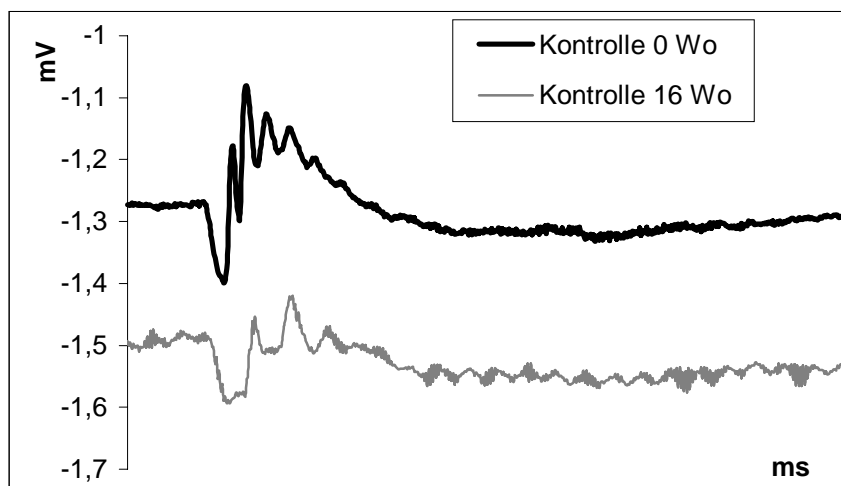


Abb. 18: Messkurve Kontrolltier nach 0 und 16 Wochen, 3000 mcDs/m<sup>2</sup>, skotopisch

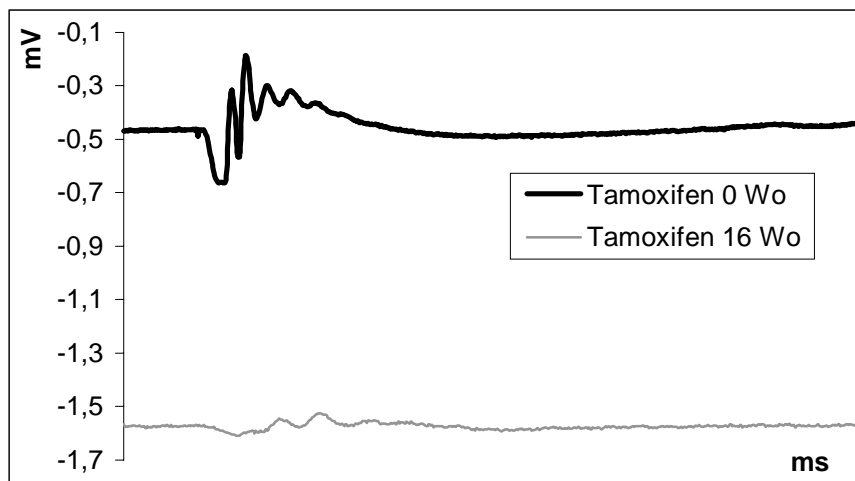


Abb.19: Messkurve Tamoxifen nach 0 und 16 Wochen, 3000 mcDs/m<sup>2</sup>, skotopisch

#### a) Intensitätsabhängigkeit von Amplituden und Gipfelzeiten

Das typische, reizintensitätsabhängige Verhalten der Amplitude ist auch unter Tamoxifeneinfluß nicht gestört, wie Abb. 20 und 21 zeigen. Nach 12 Wochen Fütterung waren die Amplituden deutlich reduziert, jedoch stieg mit zunehmender Lichtintensität die Amplitude der b-Welle an, erreichte ein Plateau und sank wieder leicht ab. Desgleichen verkürzte sich die Gipfelzeit mit steigender Reizintensität.

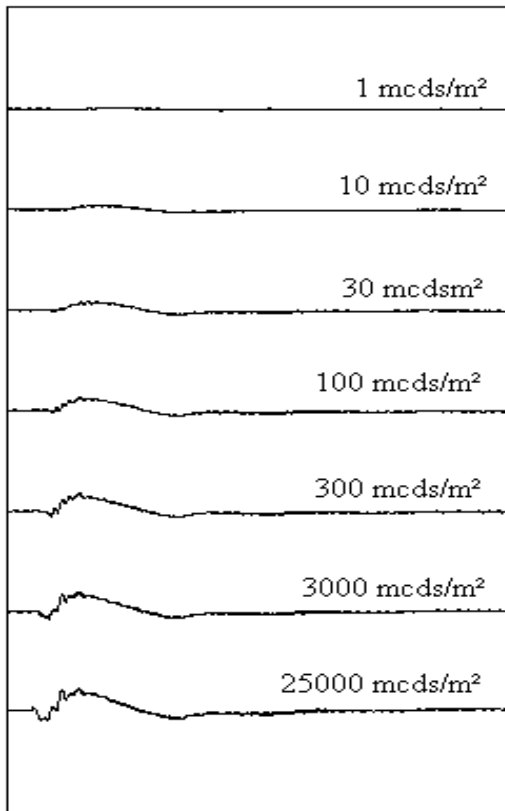


Abb. 20: b-Wellenamplitude nach 12 Wochen Tamoxifenapplikation unter steigender Reizintensität

Abb. 21 zeigt, dass auch nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation die reizintensitätsabhängige Zunahme der b-Wellenamplitude erhalten war, jedoch auf einem deutlich niedrigeren Niveau.

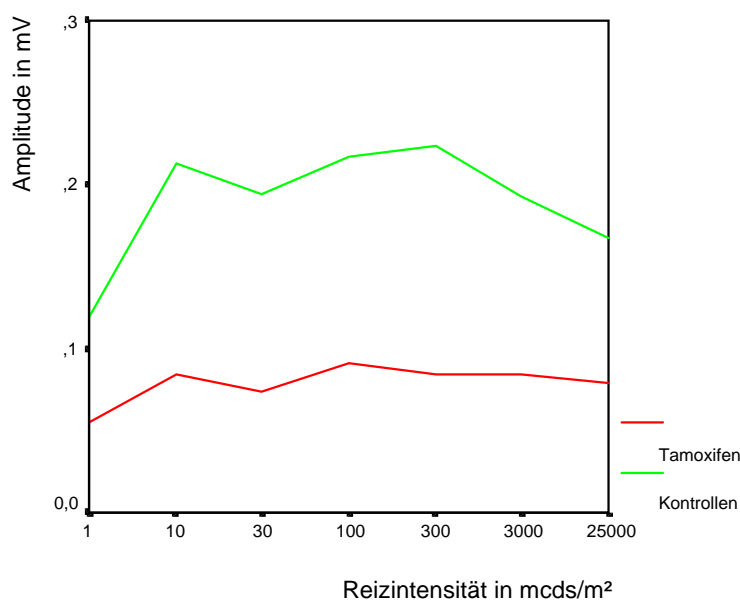


Abb. 21: Mittelwerte der b-Wellenamplituden nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation

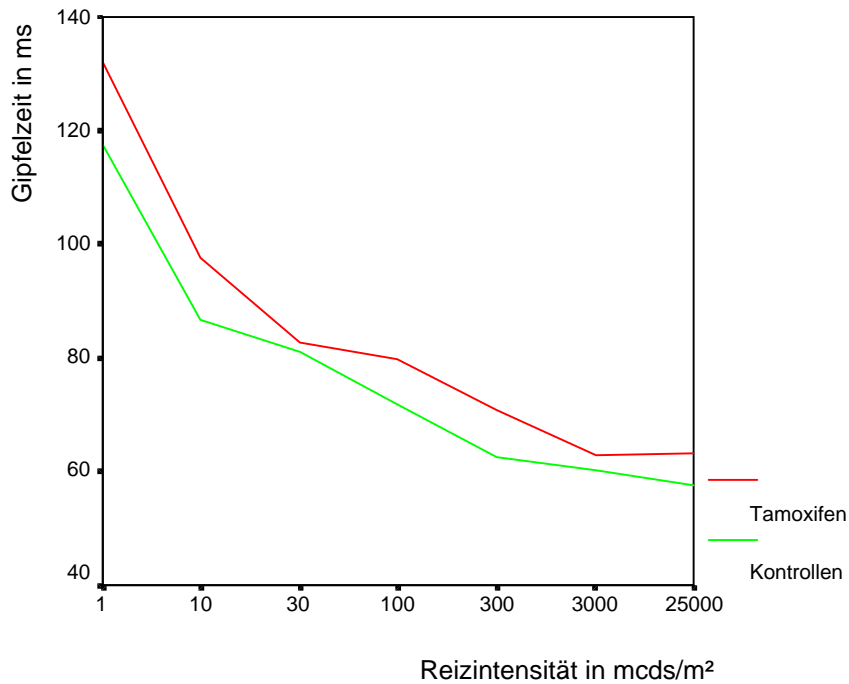


Abb. 22: Mittelwerte der Gipfelzeit der b-Welle nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation

Abb. 22 verdeutlicht das Verhalten der Gipfelzeit der b-Welle nach 16 Wochen Tamoxifengabe. Auch hier war das typische Muster der Verkürzung der Gipfelzeit mit zunehmender Reizintensität erhalten.

## b) Amplituden von a- und b-Welle

### a-Wellenamplitude

Tabelle 4, S. 57 sowie Abb. 23 zeigen die Entwicklung der a-Wellenamplituden im Verlauf der 16wöchigen Tamoxifenzufuhr und bis 29 Wochen nach Absetzen des Tamoxifens.

Nach 16 Wochen waren die Amplituden der tamoxifenbehandelten Tiere deutlich abgesunken, es bestand ein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren ( $p=0,003$ ).

29 Wochen nach Absetzen des Medikamentes haben sich die Amplituden wieder erholt und angeglichen ( $p=0,419$ ).

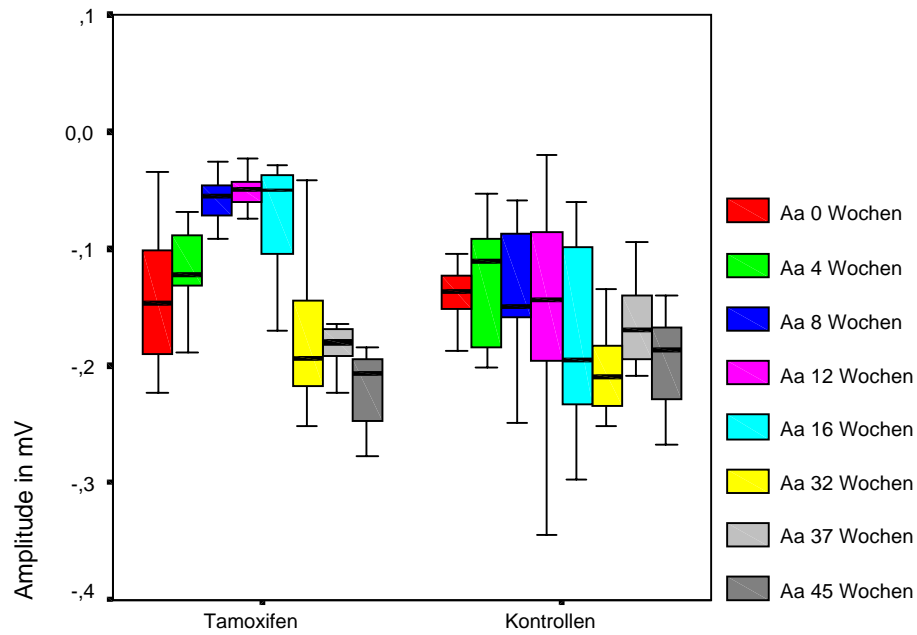


Abb. 23: Amplituden der a-Welle (Aa) über den gesamten Versuchsverlauf mit der Darstellung von Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum

### **b-Wellenamplitude**

Tabelle 5, S. 57 und Abb. 24 zeigen die Mittelwerte der b-Wellenamplituden über den gesamten Behandlungsverlauf. Ebenso wie bei der a-Welle war die Amplitude der b-Welle nach 16 Wochen Tamoxifenzufuhr signifikant reduziert ( $p=0,01$ ) und hat sich zum Ende der Nachbeobachtungszeit, 29 Wochen nach Absetzen des Tamoxifens, wieder regeneriert ( $p=0,125$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

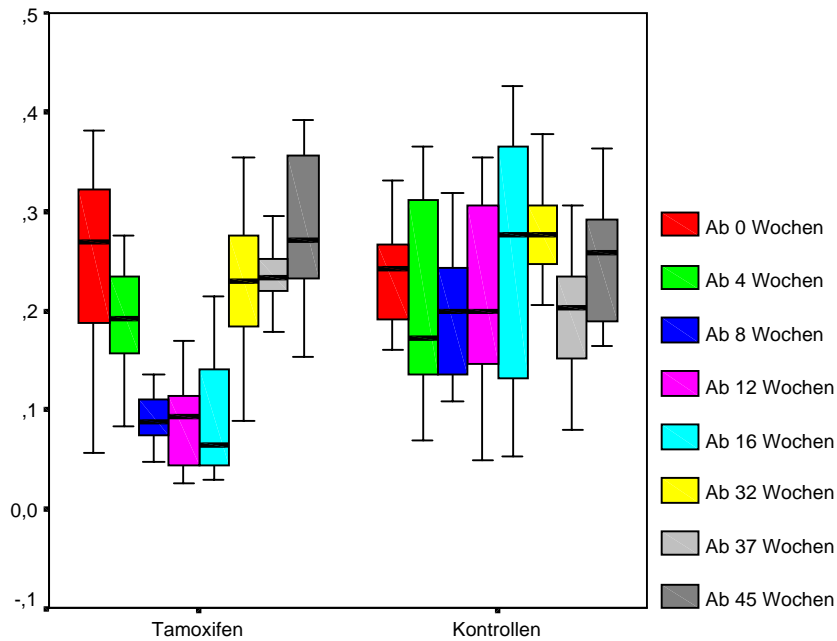


Abb. 24: Amplituden der b-Welle (Ab) über den gesamten Versuchsverlauf mit der Darstellung von Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum

### c) Gipfelzeiten der a- und b-Welle

#### Gipfelzeiten a-Welle

Die Gipfelzeiten der a-Welle verlängerten sich während der Fütterung mit Tamoxifen in den ersten 16 Wochen ohne signifikanten Unterschied zu den Kontrollen nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation. Nach Absetzen des Medikamentes verringerten sich die Gipfelzeiten wieder (siehe Tab. 6, S. 58 und Abb. 25).

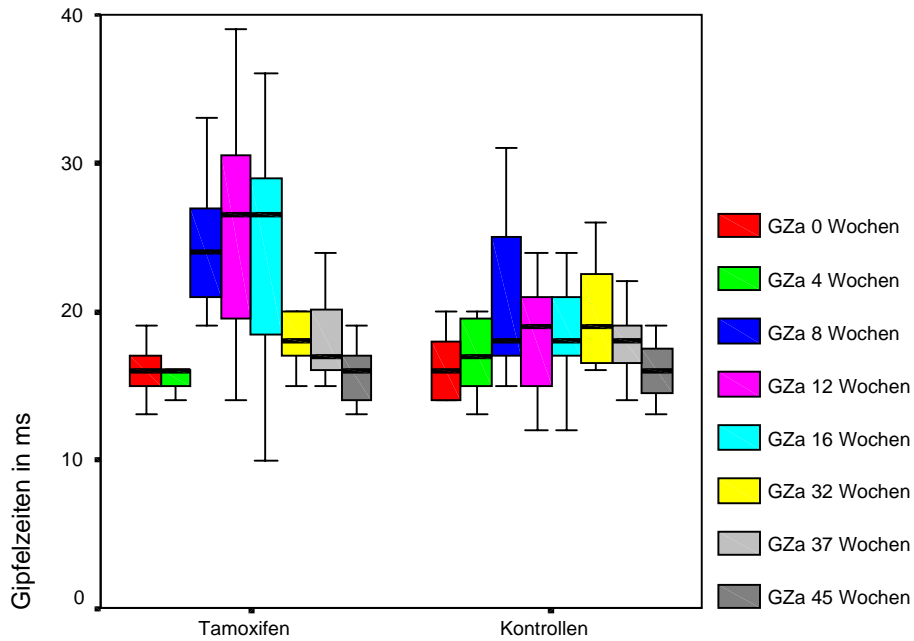


Abb. 25: Gipfelzeiten der a-Wellen (Gza) über den gesamten Versuchsverlauf mit der Darstellung von Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum

### Gipfelzeiten b-Welle

Die Gipfelzeiten der b-Welle verlängerten sich ebenso im Verlauf der 16wöchigen Tamoxifenapplikation ohne signifikanten Unterschied und verkürzten sich wieder nach Absetzen des Tamoxifens ( $p=0,06$ ), siehe Tabelle 7, S. 58 und Abb. 26.

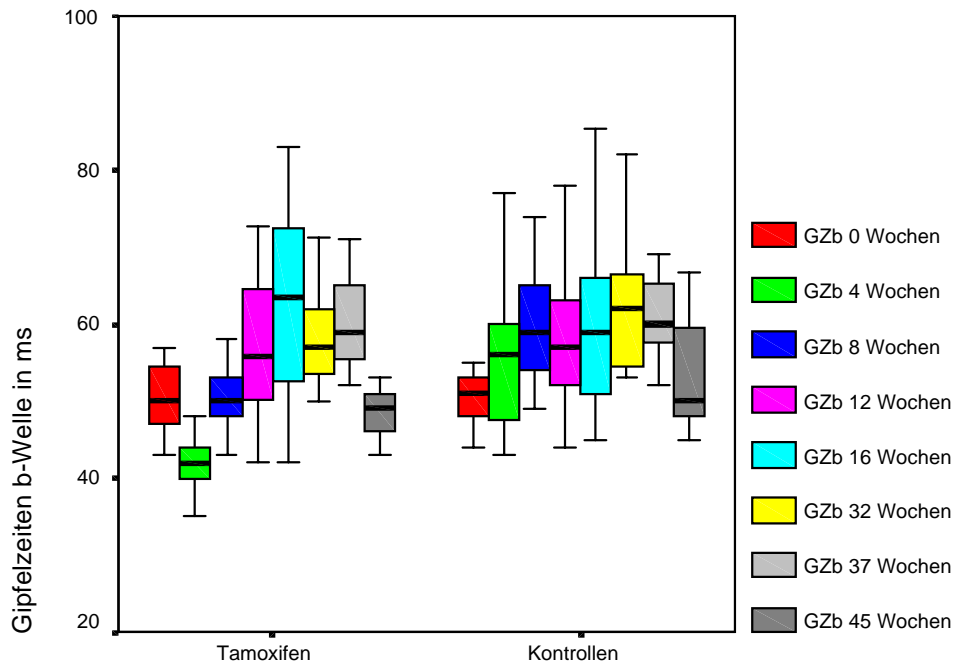


Abb.26: Gipfelzeiten der b-Wellen (Gzb) über den gesamten Versuchsverlauf mit der Darstellung von Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum

#### d) b/a-Quotient

Der b/a-Quotient zeigt postrezeptorale (d.h. innere) Netzhautschäden an. Er wird aus den Amplituden des Standardblitzes (3000 mcDs/m<sup>2</sup>) gebildet. Bei isolierter Schädigung der Rezeptoren vermindert sich primär die a-Welle, aber auch nachfolgend die b-Welle, da die inneren Netzhautschichten vermindert angesteuert werden. Hierbei bleibt der b/a-Quotient gleich. Bei Schäden der inneren Netzhaut sinkt nur die Amplitude der b-Welle, womit der b/a-Quotient sinkt. Beim Menschen beträgt der normale b/a-Quotient ca. 2 (Jacobi 1993). Für die Maus ist dieser Wert nicht bekannt.

Zwischen den Tamoxifen- und Kontrolltieren bestand kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf. Der b/a-Quotient nahm gleichmäßig in beiden Gruppen im Versuchsverlauf ab (siehe Tab. 8, S. 59 und Abb. 27).



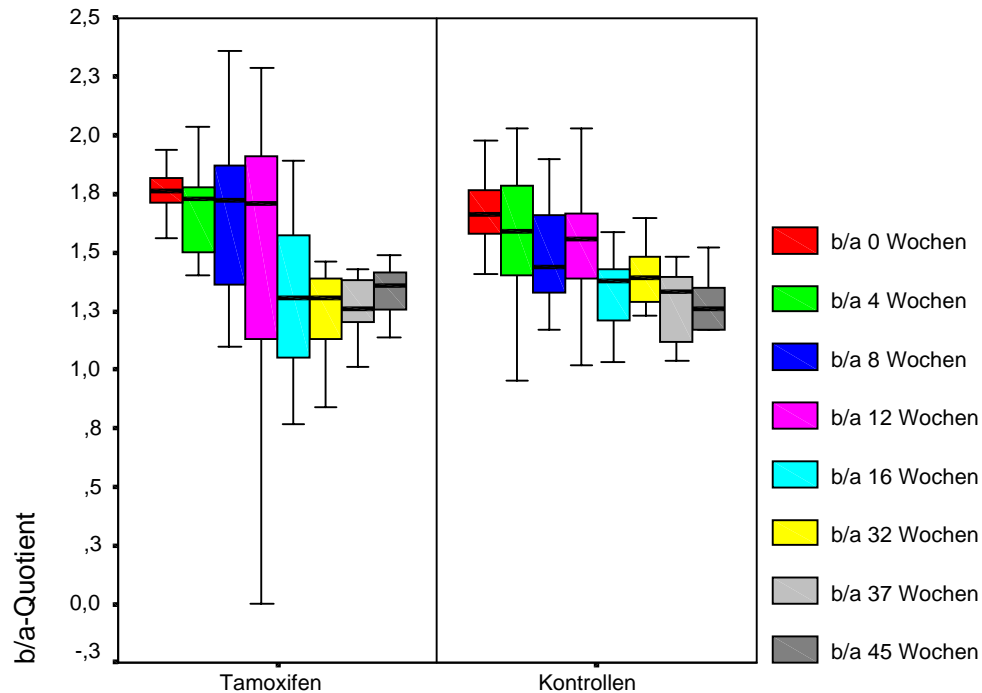


Abb. 27: b/a-Quotient im zeitlichen Verlauf mit der Darstellung von Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum

### 3.3. Lichtmikroskopische Befunde

#### 3.3.1. Kontrolltiere

Die Netzhaut der Kontrolltiere zeigte am Versuchsende lichtmikroskopisch einen normalen Aufbau. Die typische horizontale Ausrichtung der einzelnen Netzhautschichten war gut erhalten. Ebenso wenig waren die Schichten in ihrer Stärke verringert. Das Pigmentepithel und die Ganglienzellschicht wiesen einige kleine Vakuolen auf.

#### 3.3.2. Behandelte Tiere

Tamoxifen hinterließ nach 16wöchiger Applikation keine lichtmikroskopisch nachweisbaren Ablagerungen (siehe Abb. 28). Die Ganglienzellschicht und auch das Pigmentepithel zeigte eine leichte Vakuolisierung, welche auch bei den Kontrolltieren nachweisbar war. Die äußere Schicht der Photorezeptoren war aufgelockert, ohne dass ein Unterschied zu den Kontrollen

zu beobachten war. Insgesamt waren alle Schichten der Retina nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation sehr gut erhalten und in ihrer Dicke kaum verändert.

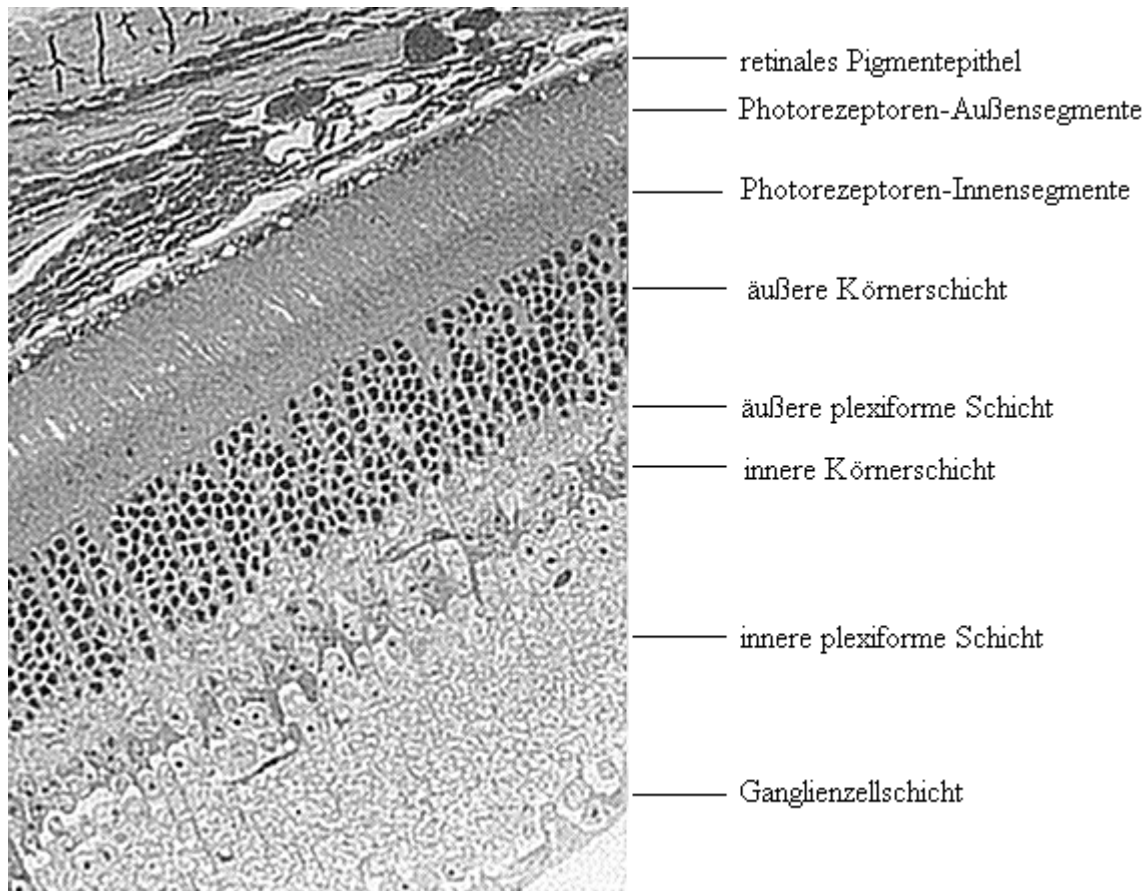


Abb. 28: Lichtmikroskopie der Retina nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation, 200fach, Semidünnschnitt, Toluidinblaufärbung

### 3.4. Ophthalmoskopische Befunde

Bei allen mit Tamoxifen behandelten Tieren war nach 14-16 Behandlungswochen eine leichte Verengung der Lidspalten auffällig. Auch in Narkose konnten die Lider nicht so weit wie bei den Kontrolltieren retrahiert werden, was teilweise die Qualität der ERG-Messungen beeinträchtigte (vermehrte Störungen durch Kontakt der Elektroden mit Wimpern und Lidern).

Nach Absetzen des Tamoxifens war dieses Phänomen rückläufig, so dass auch die ERG-Messungen wieder zuverlässiger wurden.

### Spaltlampenbefund:

Bei einem Tier war eine zentrale Trübung der Hornhaut ähnlich einem Ulcus corneae zu beobachten (siehe Abb. 29). Ein anderes Tier zeigte eine irreversible Vaskularisation der gesamten Hornhautoberfläche (siehe Abb. 30). Der Beginn der Hornhautveränderungen war nach 12-14 Wochen erkennbar.



Abb. 29 a

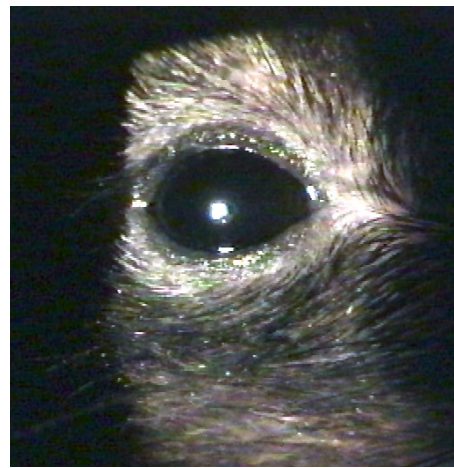


Abb. 29 b

Abb. 29 a und b: zentrale Hornauttrübungen (a) im Vergleich zu einer klaren Hornhaut (b)

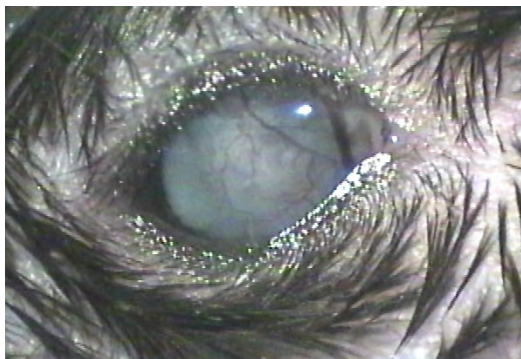


Abb. 30: vaskularisierte Hornhaut

## Funduskopie

Die Funduskopie wurde mittels eines Operationsmikroskopes und einer 78 dpt Ophthalmoskopierlupe durchgeführt. Die Untersuchung wurde auf ein Videoband aufgezeichnet, einzelne Sequenzen digitalisiert und als Foto ausgedruckt.

Vor Versuchsbeginn wurden alle Mäuse ophthalmoskopisch untersucht, um vorbestehende Fundusveränderungen auszuschließen. Dabei wurden keine Auffälligkeiten gesehen.

Eindeutige, Tamoxifen-bedingte retinale Ablagerungen konnten nicht gefunden werden. Nach 16 Wochen Behandlungsdauer wiesen einige retinale Gefäße bei Kontrolltieren weiße plaqueartige Ablagerungen auf, ähnlich einer Gefässklerose (siehe Pfeil, Abb. 31). Derartige retinale Gefäßveränderungen konnten jedoch auch bei einigen Kontrolltieren festgestellt werden.

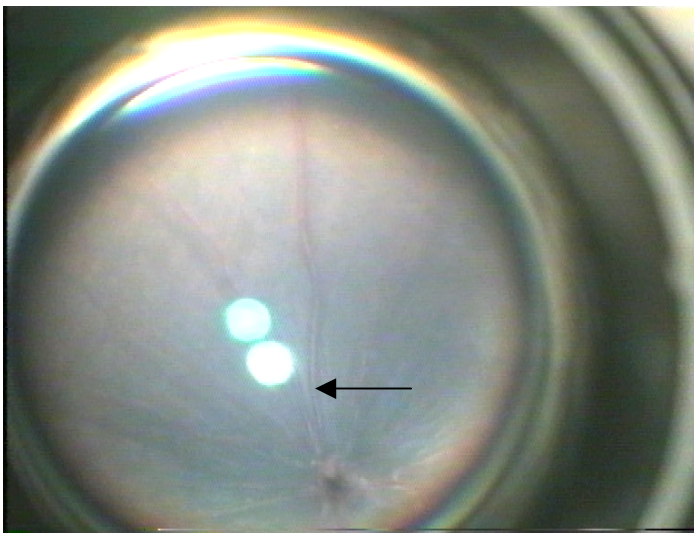


Abb. 31: funduskopisches Bild nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation

## 4. Diskussion

Ziel unserer Untersuchungen war es, funktionelle Veränderungen der Mäuseretina, darstellbar durch das Elektretinogramm, zu ermitteln und mit histologischen Veränderungen zu vergleichen.

Im Folgenden möchte ich auf die unter 1.2. aufgeworfenen Fragestellungen eingehen.

### Zu 1) ERG-Meßplatz:

Der Aufbau unseres ERG-Meßplatzes ermöglicht experimentelle Untersuchungen unterschiedlicher kleinerer Spezies wie Maus und Ratte im narkotisierten Zustand. Die flexiblen Halterungen für die Ableitelektroden ermöglichen eine genaue Anpassung an die Größe der Tiere. Wahlweise ist eine mon- oder binokulare Ableitung möglich.

Die Reizparameter können je nach Fragestellung hinsichtlich Reizintensität und Frequenz, Einzel- und Serienblitz sowie skotopisch und photopisch modifiziert werden und bieten somit eine große Variabilität an elektrophysiologischen Untersuchungsmöglichkeiten im Rahmen der Ganzfeldstimulation. Bei Bedarf kann auch eine Erweiterung hinsichtlich Farbstimulation erfolgen.

Dieser Messplatz ist somit auch für zukünftige Untersuchungen unterschiedlicher Fragestellungen geeignet.

### Zu 2) Stimulationsprogramme

Bei unseren Untersuchungen wurden Stimuli im skotopischen Bereich von 1 mcds/m<sup>2</sup> bis 25000 mcds/m<sup>2</sup> verwendet. Mit der skotopischen Reizung sind vor allem die Stäbchen und die mittleren Retinaschichten (Bipolarzellen und Querneurone) sowie die Müllerzellen erfasst. Durch die Änderung der a- und b-Wellen mit steigender Reizintensität lassen sich die Photorezeptoren (a-Welle) und Mittelschichten der Retina (b-Welle) untersuchen.

### Zu 3) Auswertungsparameter

Beim menschlichen ERG ist das Maximum der b-Welle relativ einfach zu bestimmen, da die oszillatorischen Potentiale die Form der Kurve nicht stark verändern.

Das ERG der Maus weist sehr ausgeprägte oszillatorische Potentiale auf, welche die b-Welle stark überlagern und den „reinen“ Kurvenverlauf der b-Welle nicht mehr erkennen lassen. Das Maximum dieser „Mischkurve“ zu benutzen, würde bedeuten, dass man eigentlich das Maximum des OP-b-Wellen-Komplexes bestimmt und nicht nur der b-Welle.

In Voruntersuchungen suchten wir nach einer Möglichkeit, die b-Welle zu extrahieren und die Amplituden und Gipfelzeiten der a- und b-Wellen möglichst automatisch durch ein Computerprogramm bestimmen zu lassen, um hohe Objektivität und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. In der „intelligenten“ Methode (Bach 1996), bei der die b-Welle-Amplitude auf einer gedachten, geglätteten Kurve gesetzt wird sowie als a-Wellen-Amplitude das erste negative Tal angenommen wird, sehen wir das Problem der schlechten Reproduzierbarkeit und eher subjektiven Auswertung. Die klinische ERG-Auswertung beim Menschen wird auf

diese Art von erfahrenen Elektrophysiologen gehandhabt und ist aufgrund der sehr kleinen und wenig beeinflussenden Oszillatorischen Potentiale kein Problem.

In unserem Fall verwendeten wir Softwarefilter verschiedener Frequenzen (siehe Methodenbeschreibung), um die Kurve reproduzierbar zu glätten und die Amplitude der b-Welle nachvollziehbar zu bestimmen. Gleichzeitig stehen die Oszillatorischen Potentiale für weitere Untersuchungen, von der b-Welle gereinigt, zur Verfügung.

Andere Arbeitsgruppen (Heckenlively et al. 1989) verwenden einen Hardwarefilter, der von vornherein die Kurven glättet und von Störungen befreit, z.B. 0,2-Hz-Low-Pass-Filter und 250-Hz-Hochpassfilter für die Oszillatorischen Potentiale und 40-Hz-Filter für a- und b-Wellen. Darin sehen wir jedoch das Problem, dass die originale Messkurve verloren geht und schon vor jeder Auswertung verfälscht ist. Deshalb nutzten wir die Softwarefilter, welche uns die Originalkurven auf nachvollziehbare Weise unserer Auswertung zugänglich machen.

Dass in dieser Arbeit für die a- und b-Welle zwei verschiedene Software Filter verwendet wurden, sehen wir nicht als problematisch an, da hierdurch die Genauigkeit der automatischen Amplituden- und Gipfelzeitbestimmung bei unverfälschten Kurvenverläufen erhöht wird. Die Vergleichbarkeit der Werte ist für uns gegeben, da alle Kurvenauswertungen auf die gleiche Art und Weise und vom selben Untersucher vorgenommen wurden.

#### Zu 4) Verlaufsmessungen

Unsere ERG-Messungen erfolgten in 4wöchigen Abständen nach einer Erstuntersuchung vor Fütterungsbeginn. Damit ist eine gute Dokumentation des Einflusses von Tamoxifen im zeitlichen Verlauf möglich. Schon nach 4 Wochen Tamoxifenapplikation war eine deutliche Amplitudenreduktion erkennbar, welche im weiteren Verlauf auf signifikante Weise zunahm.

#### Zu 5) Reversibilität

Die letzte ERG-Messung erfolgte 29 Wochen nach Absetzen des Tamoxifens. Die Amplituden der a- und b-Welle hatten sich zu diesem Zeitpunkt deutlich erholt und waren wieder auf das Niveau der Kontrolltiere angestiegen. Damit konnte die Reversibilität der Amplitudenveränderungen gezeigt werden.

#### Zu 6) Ophthalmologische Befunde

Die Verengung der Lidspalten beeinträchtigte zwar teilweise die Qualität der ERG-Messungen dahingehend, dass durch Lidkontakt der Elektroden die Messkurven vermehrt Störungen zeigten, jedoch war die signifikante Amplitudenreduktion bei der

Tamoxifengruppe schon nach 8 Wochen aufgetreten und war damit keinesfalls durch die Verengung der Lidspalten verursacht.

Ophthalmoskopisch waren in beiden Gruppen skleroseähnliche Ablagerungen an den Gefäßwänden zu beobachten, die nicht als tamoxifenbedingt einzuordnen sind. Möglicherweise handelt es sich um einen alterungsbedingten Effekt.

#### Zu 7) Histologie

Lichtmikroskopisch konnten keine eindeutig tamoxifenbedingten Ablagerungen gefunden werden. Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen, die hier nicht dargestellt wurden, haben keinen Hinweis für tamoxifenbedingte Einschlüsse gefunden.

Es könnte ein speziesabhängiger Stoffwechselweg des Tamoxifens für die fehlende Lipidosis und ausbleibende Akkumulation des Tamoxifens in den Liposomen bei Mäusen im Gegensatz zu Ratten verantwortlich sein. Bisher sind keine Untersuchungen bei Mäusen nach Tamoxifen-Applikation aus der Literatur bekannt.

#### Zu 8) Literaturvergleich

Die allgemeinen Nebenwirkungen des Tamoxifens wie z.B. der Gewichtsverlust korrelieren mit Berichten anderer Autoren (Ioannidis 1998). Auch Lüllmann und Lüllmann-Rauch (1981) berichten über einen 10-20%igen Gewichtsverlust bei Ratten nach Gabe von 100-130 mg/kg KG Tamoxifen.

Ebenso berichteten letztgenannte Autoren über eine areoläre Alopezie, wie sie auch bei unseren Versuchstieren auftrat.

Die Reversibilität der funktionellen Veränderungen korreliert mit den Fallberichten und Studien anderer Autoren (Pavlidis und Petris 1992, Nayfield and Gorin 1996).

Ioannidis (1998) und Lüllmann und Lüllmann-Rauch (1981) beschrieben eine deutliche generalisierte Lipidose bei Ratten nach einer Dosierung von 100 mg Tamoxifen/kg KG. Somit wäre eine Lipidose bei unserer Dosierung von 180 mg/kg KG trotz der anderen Spezies durchaus zu erwarten gewesen.

#### Theorie zur Entstehung der Tamoxifenretinopathie

Flaxel et al. (2000) zeigten in ihrer perioperativen Untersuchungen am Menschen, dass Tamoxifen aus der Blutbahn ins Kammerwasser und in den Glaskörper penetrieren kann.

Ebenso wurde über die Nachweisbarkeit von Tamoxifen und Metaboliten im Liquor und in Hirnmetastasen berichtet. Tamoxifen überwindet also die Blut-Hirn-Schranke.

Durch den katamphiphilen Charakter des Tamoxifens mit einem hydrophoben aromatischen Ring und einer hydrophilen Seitenkette ist die Substanz in der Lage, mit dem normalen Katabolismus von Lipiden zu interferieren, was zur Ablagerung von Lipid-Pharmakon-Komplexen führt (Lüllmann und Lüllmann-Rauch 1981). Damit verbunden ist eine axonale Degeneration in der Netzhaut (Kaiser-Kupfer et al. 1981).

Es wurde in In-Vitro-Untersuchungen gezeigt, dass Tamoxifen einen Einfluß auf den Stoffwechsel humaner Pigmentepithelzellen hat. Die Aktivität von lysosomalen Enzymen wie N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase und Catepsin D wird reduziert (Parkkari et al. 2003).

Desweiteren wird die Phagozytose der äußeren Stäbchensegmente behindert.

Die Rezeptorenverteilung bei der Maus unterscheidet sich zu der des Menschen durch eine fehlende Fovea centralis und einen geringeren Gradienten, mit dem die Zapfen über die gesamte Netzhaut verteilt sind. Deshalb ist bei der Maus eine Veränderung im ERG schon bei einer geringen Schädigung eher zu erwarten als beim Menschen, bei dem sich die Tamoxifenretinopathie auf die Makula konzentriert und eher im Multifokal-ERG als im Ganzfeld-ERG Veränderungen zu erwarten lässt ( Bach und Kellner 2000, Kretschmann et al. 1996).

Wichtige Ergebnisse unserer Untersuchungen sind eine signifikante Amplitudenreduktion der a- und b-Wellen nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation sowie die Reversibilität dieser Reduktion nach Absetzen des Tamoxifens.

Dass a- und b-Wellen reduziert waren, weist auf Schädigungen in mehreren Schichten der Netzhaut hin, sowohl im Bereich der Photorezeptoren als auch in weiter innen liegenden Schichten der Bipolar- und Müllerzellen.

Die Abnahme der Amplituden mit zunehmender Applikationsdauer von Tamoxifen könnte durch direkte Tamoxifenwirkung ohne Induktion einer Lipidose verursacht sein. Obwohl die intraokuläre Penetration von Tamoxifen aufgrund der Untersuchungen von Flaxel et al. (2000) wahrscheinlich ist, liegen Erkenntnisse über die Anreicherung in den unterschiedlichen okulären Kompartimenten der Maus nach oraler Medikamentenzufuhr bisher nicht vor.

Die Amplitudenreduktion bei den Kontrolltieren sowie die Zunahme der Gipfelzeiten in beiden Tiergruppen ist wahrscheinlich auf einen altersbedingten Effekt zurückzuführen. Auch



beim Menschen ist eine altersbedingte ERG-Veränderung bekannt (Jacobi et al. 1993, Peterson 1968). Ebenso ist der in beiden Gruppen reduzierte b/a-Quotient am ehesten auf altersbedingte Veränderungen der inneren Netzhaut zurückzuführen.

Lichtmikroskopisch war keine eindeutige Lipidose nachweisbar.

Bei der von uns gewählten hohen Dosierung des Tamoxifens von 180 mg/kg KG im Vergleich zur Dosis von ca. 40 mg/d beim Menschen bezogen wir uns einerseits auf Versuche von Lüllmann und Lüllmann-Rauch (1981), die Ratten mit 100-130 mg/kg KG Tamoxifen behandelt hatten. In eigenen Vorversuchen (Bredehorn et al. 1999) behandelten wir Mäuse mit einer Dosis von 100 mg/kg KG Tamoxifen, ohne dabei funktionelle oder histologische Veränderungen zu beobachten, weshalb wir uns zu einer Dosiserhöhung entschieden haben.

Die erhöhte Letalität in der Tamoxifengruppe ist sicherlich auf die hohe Tamoxifendosis zurückzuführen, weshalb wir die Dosierung in den ersten Wochen von anfänglich über 190 mg/kg KG Tamoxifen reduzierten, bis keine Tiere mehr an den Nebenwirkungen des Tamoxifens verstarben. Die beobachteten Nebenwirkungen des Tamoxifens wie Apathie, Gewichtsabnahme und Alopezie entsprechen den Berichten anderer Autoren (Lazzaroni et al. 1998, Lüllmann und Lüllmann-Rauch 1981).

Die in unseren Untersuchungen gefundene funktionelle Beeinträchtigung bei fehlender morphologischer Nachweisbarkeit könnte für einen Frühschaden durch Tamoxifeneinnahme sprechen. Die Applikationsdauer betrug in unserem Versuch nur 16 Wochen im Gegensatz zur jahrelangen Tamoxifentherapie beim Menschen.

Aufgrund der fehlenden histologischen Nachweisbarkeit ist ein Schaden auf zellulärer Ebene weniger wahrscheinlich, möglicherweise aber in der Interzellulärmatrix. Weitere Untersuchungen sollten dies überprüfen.

Denkbar wäre auch eine funktionelle Beeinflussung auf biochemischer Ebene, die morphologisch nicht nachweisbar ist oder eine rein toxische Wirkung des Tamoxifens.

Direkte Rückschlüsse aus unseren Ergebnissen auf den Menschen zu übertragen, ist nur begrenzt möglich. Die Rückbildung der funktionellen Veränderungen, sogar bei einer sehr hohen Dosis in unseren Versuchen, bestätigt die auch beim Menschen beobachtete

Reversibilität okulärer Nebenwirkungen, welche von einigen Autoren beschrieben (Chern und Danis 1993, Vinding und Nielson 1983), von anderen jedoch bezweifelt wurde (Lazzaroni et al. 1998).

Für die Tamoxifentherapie bei Mammakarzinompatientinnen kann die Reversibilität der Veränderungen bei unserer hohen Dosierung dahingehend gewertet werden, dass bei ersten Anzeichen einer Tamoxifenretinopathie oder visuellen Beschwerden der Patientinnen aus ophthalmologischer Sicht unter Berücksichtigung differentialdiagnostischer Aspekte ein Therapieabbruch nicht zwingen erforderlich ist. Da die vitale Gefährdung der Patientinnen im Vordergrund steht, könnte die im allgemeinen sehr effektive Therapie mit Tamoxifen unter sorgfältiger Beobachtung und Abwägung der Risiken und Vorteile kontrolliert fortgeführt werden.

Eine direkte Übertragbarkeit auf den Menschen ist jedoch aufgrund des differierenden Aufbaus der Netzhaut hinsichtlich der Verteilung von Zapfen und Stäbchen bei Maus und Mensch nur eingeschränkt möglich. In anderen Studien war es auch nicht möglich, elektrophysiologische Veränderungen bei Patientinnen mit Tamoxifenretinopathie darzustellen (Kuchenbecker et al. 2001). Allerdings wurde auch dort die erweiterte Diagnostik mit multifokalem ERG empfohlen.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass eine Methode allein nicht ausreicht, medikamentenbedingte Störungen nachzuweisen. Es sollten immer mehrere Techniken verwendet werden, da funduskopische Veränderungen nicht immer mit Funktionseinbußen korrelieren bzw. frühe funktionelle Einschränkungen noch nicht unbedingt funduskopisch oder histologisch nachweisbar sein müssen.

Patienten unter Tamoxifenmedikation sollten sorgfältig ophthalmologisch betreut werden. Eine ERG-Untersuchung (wenn möglich Multifokal-ERG) und ein ophthalmologischer Status vor Therapiebeginn wären wünschenswert, um eventuell auftretende okuläre Nebenwirkungen des Tamoxifens unter Berücksichtigung anderer Allgemeinleiden und Medikationen quantifizieren zu können und die Verlaufsbeobachtung zu erleichtern. Differentialdiagnostisch sind ganz besonders eine Alterskorrelierte Makuladegeneration mit harten und weichen Drusen, Exsudationen bei diabetischer Retinopathie und retinalen Gefäßerkrankungen, epiretinale Membranen, Canthaxanthinretinopathie und metabolische

Störungen wie Oxalose, Sjögren-Syndrom und Alport-Syndrom zu erwägen (Nayfield and Gorin 1996). Visuelle Beschwerden der Patientinnen während einer Tamoxifentherapie sollten sorgfältig evaluiert werden. Andererseits besteht bei symptomlosen retinalen Ablagerungen noch nicht die Notwendigkeit, die Tamoxifentherapie umgehend zu unterbrechen. Vielmehr sind dann engmaschige Kontrollen indiziert. Da sich die menschliche Tamoxifenretinopathie hauptsächlich auf die Makula konzentriert, sind speziell die Makulafunktion prüfende Tests nötig, wie Prüfung der zentralen Sehschärfe, statische Perimetrie des zentralen Gesichtsfeldes, Amslernetz, Farbsinnprüfung und Multifokal-ERG.

Eine enge Zusammenarbeit zwischen Onkologe, Gynäkologe und Ophthalmologe ist für die optimale Betreuung der Patientinnen vor, während und nach einer Therapie des Mammakarzinoms mit Tamoxifen wünschenswert.

Zur genauen Aufklärung des Pathomechanismus der tamoxifen-induzierten ERG-Alterationen sind weitere Untersuchungen nötig.

## **5. Zusammenfassung**

Aufgrund der epidemiologischen Bedeutung des Mammakarzinoms für Frauen im erwerbsfähigen Alter ist die Kenntnis über mögliche Nebenwirkungen des in der adjuvanten Therapie eingesetzten Antiöstrogens Tamoxifens wichtig.

Ziel unserer Untersuchungen war es, funktionelle Schäden der Mäuseretina nach Langzeitapplikation von Tamoxifen zu ermitteln. Dafür wurden 40 pigmentierte Mäuse in eine Kontrollgruppe und eine Tamoxifengruppe unterteilt und letzteren 16 Wochen lang 180 mg Tamoxifen pro kg KG oral appliziert. Die Nachbeobachtungszeit nach Absetzen des Tamoxifens betrug 29 Wochen. Die funktionellen Veränderungen wurden über die gesamte Versuchszeit von 45 Wochen elektroretinografisch untersucht.

Die Elektroretinografie ist eine nicht-invasive Methode, um retinale Summenpotentiale über der Cornea abzuleiten. Durch Analyse der Amplituden und Gipfelzeiten der resultierenden a- und b-Wellen lassen sich Rückschlüsse auf die Retinaschicht ziehen, die hauptsächlich von der Schädigung betroffen ist. Ein weiteres Augenmerk lag auf der Reversibilität der Veränderungen nach Absetzen des Tamoxifens.

Bereits nach 4-8 Wochen Tamoxifenapplikation waren die a- und b-Welle in ihrer Amplitude signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert, was sich nach 12-16 Wochen noch akzentuierte.

Auch die Amplituden der Kontrolltiere reduzierten sich im Versuchsverlauf, jedoch deutlich geringer, was auf einen altersbedingten Effekt zurückzuführen ist.

Nach Absetzen des Tamoxifens war die Amplitudenreduktion in der Tamoxifengruppe reversibel. Am Ende des Versuches unterschieden sich die Amplituden der Kontroll- und Tamoxifengruppe nicht mehr.

Die Entwicklung der Gipfelzeiten unterschied sich nicht signifikant zwischen Kontroll- und Tamoxifentieren.

Lichtmikroskopisch waren keine typischen Merkmale einer Lipidose (lamelläre und kristalline Einschlusskörperchen) zu finden.

Aufgrund des fehlenden histologischen Korrelats zur funktionellen Beeinträchtigung gehen wir von einem Frühschaden aus, zumal die Tamoxifenapplikation nur 16 Wochen betrug.

Direkte Vergleiche und Übernahme der Ergebnisse für den Menschen sind nur eingeschränkt möglich.

Wichtig ist eine engmaschige interdisziplinäre Betreuung von Mammakarzinompatientinnen vor, während und nach einer Tamoxifentherapie, um medikamentös verursachte Schädigungen rechtzeitig zu erkennen, sie von Veränderungen anderer Genese zu differenzieren und der Patientinnen eine möglichst effektive Therapie ihrer Grunderkrankung mit möglichst wenig irreversiblen Nebenwirkungen zukommen zu lassen.

## 6. Literatur

1. Adler, F H: Physiology of the Eye.  
The C.V. Mosby Company, St Louis,1959, S. 551-561
2. Algvere P, Wachtmeister L, Westbeck S: On the oscillatory potentials of the human electroretinogram in light and dark adaption.  
Acta Ophthalmol. (Copenhagen) 50 (1972) 737-759
3. Bach M: Ophthalmologische Elektrodiagnostik.  
Orthoptik Pleoptik 20 (1996) 5-22
4. Bach M, Kellner U: Elektrophysiologische Diagnostik in der Ophthalmologie.  
Ophthalmologie 97 (2000) 898-920
5. Bellhorn R W: Laboratory Animal Ophthaomskopy. In: Gelatt K N (Hrsg): Textbook of Veterinary Ophthalmology: Lea & Febiger, Philadelphia, 1981 S. 649-671
6. Berson: Electrical Phenomena in the Retina.  
Adler's Physiology of the Eye, Mosby Year Book, 1991 S. 641-707
7. Bredehorn T, Duncker G, Kuper H, Papst N: A new system for recording electroretinographical potentials in animals.  
Ophthalmologica 208 (1994) 98-104
8. Bredehorn T, Clausen M, Duncker G, et al.: Morphological and functional changes due to drug-induced lysosomal storage of sulphated glycosaminoglycans in the rat retina.  
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 239 (10) (2001) 788-93
9. Bredehorn T, Duncker G I W: Tilorone-induced functional changes in the rat retina.  
Klin Monatsbl Augenheilkd 216 (4) (2000) 219-22
10. Bredehorn T, Lehnich H, Klaua J, Jakscha J, Kaltenborn G,: Funktionelle Veränderungen der Mäuseretina nach chronischer Gabe von Tamoxifen.

- In Krause A, Cichy W, Zierz S (Hrsg): Neonatologie und Onkologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1999), S. 198-201
- 11 Bredehorn T, Duncker G I W: Chloroquin und Chlorphentermin induzierte Lipidose der Rattenretina.  
Klin Monatsbl Augenheilkd 214 (1999) 178-182
  - 12 Carter-Dawson L, LaVail M: Rods and Cones in Mouse Retina, I. Structural analysis using light and electron microscopy.  
J Comp Neur (1979) 188:245-262
  - 13 Chern S, Danis P: Retinopathy associated with low-dose Tamoxifen.  
American Journal of Ophthalmology 116/3 (1993) 372-373
  - 14 Dowling J E: Organization of the vertebrate retinas.  
Investigative Ophthalmology (1970) 655-680
  15. uncker G I W, Bredehorn T: Chorphentermine-induced lipidoses in the rat retina: a functional and morphological study.  
Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 232 (1994) 368-372
  16. uncker G I W, Bredehorn T: Chloroquine induced lipidoses in the rat retina: a functional and morphological study after withdrawal of the drug.  
Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 234 (1996) 378-381
  17. Engelke M, Tykhonova S, Zorn-Kruppa M, Diehl H: Tamoxifen induces changes in the lipid composition of the retinal pigment epithelium cell line D 407.  
Pharmacol Toxicol (2002) 91(1) 13-21
  18. Flaxel C J, Mulholland B, Haynes B, Gregor, Z J: Intraocular Penetration of Tamoxifen. Ophthalmology (2000)107(11) 2006-9
  19. ritsch M, Jordan V C: Long-term Tamoxifen Therapy for the Treatment of Breast Cancer  
Cancer Control (1994) 1(4) 356-366

20. Gorin M, Day R, Constantino J: Long-Term Tamoxifen Citrate Use and Potential Ocular Toxicity.  
Am J Ophthalmol 125/4 (1998) 493-501
21. Griffin JD, Garnick MB: Eye toxicity of cancer chemotherapy: a review of the literature. Cancer 48 (1981) 539-1549
22. Griffiths M.: Tamoxifen Retinopathy at low dosage.  
American Journal of Ophthalmology (1987) 185-186
23. Hanitzsch R: Vergleichende Untersuchungen an isolierten umströmten Warmblüternetzhäuten über das Verhalten intraretinaler langsamer Beleuchtungspotentiale und des Elektretinogramms-I. Einfluß der Reizparameter an der dunkeladaptierten Netzhaut.  
Vision Research 10 (1970 a) 993-1009
24. Hanitzsch R: Vergleichende Untersuchungen an isolierten umströmten Warmblüternetzhäuten über das Verhalten intraretinaler langsamer Beleuchtungspotentiale und des Elektretinogramms-II. Einfluß der Reizparameter an der helladaptierten Netzhaut.  
Vision Research 10 (1970 b) 1011-1023
25. Heckenlively J R, Winston J V, Roderick T H: Screening for mouse retinal degenerations, I. Correlation of indirect ophthalmoscopy, electroretinograms, and histology.  
Doc. Ophthalmologica 71 (1989) 229-239
26. Heier J S, Dragoo R A, Enzenauer R W: Screening for ocular toxicity in asymptomatic patients treated with tamoxifen.  
American Journal of Ophthalmology 117 (1994) 772-775

27. Hoffmann M-L, Zrenner E, Langhof H-J: Die Wirkung der Pupille als Apertur- und Bildfeldblende auf die verschiedenen Komponenten des menschlichen Elektretinogramms.  
Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 206 (1978) 237-245
28. Ioannidis N: Lipidosis induced in rat uteri by high doses of tamoxifen.  
Aa Anat 180 (1998) 315-319
29. Jacobi P H , Rütther K, Miliczek K-D, Völker M, Zrenner E:  
Klinische Elektretinographie: Standardprotokoll und Normwerte.  
Klin. Monatsbl. Augenheilkunde 202 (1993) 27-42
30. Jaißle G B: Diagnostik von Funktion und Morphologie der Retina am Beispiel des Mausmodells für die Chorioideremie.  
Aachen, Shaker, 2000, Berichte aus der Medizin
31. Jordan V C, Chern C: Metabolites of tamoxifen in animals and man: identifikation, pharmacology, and significance  
Breast Cancer Research and Treatment 2 (1982) 123-138
32. Kaiser-Kupfer M I, Kupfer C, Rodrigues M M: Tamoxifen retinopathy - A clinicopathologic report.  
Ophthalmology 88 (1981) 89-93
33. Kretschmann U, Rütther K, Usui T, Zrenner E: ERG Campimetry Using a Multi-Input Stimulation Technique for Mapping of Retinal Funktion in the Central Visual Field.  
Ophthalmic Research 28 (1996) 303-311
34. Kuchenbecker J, Pump-Schmidt C, Olbricht S, Weise W, Behrens-Baumann W: Elektrophysiologische Untersuchungen bei Mammakarzinompatientinnen mit Tamoxifen-Retinopathie.  
Ophthalmologie 98 (2001) 81-85



35. Kueng-Hitz N, Rol P, Niemeyer G: Das Elektroretinogramm der Maus: normative Werte, optimierte Stimulation und Ableitung.  
Klin Monatsbl Augenheilkd 214 (1999) 288-290
36. Lazzaroni F, Scorolli L, Pizzoleo C: Tamoxifen retinopathy: does it really exist?  
Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmology 236 (1998) 669-673
37. Lehnich H, Bredehorn T, Kaltenborn G, Duncker G, Pauer H: Elektroretinografische tierexperimentelle Untersuchungen unter variablen Reizbedingungen nach Medikamentengabe.  
In Krause A, Cichy W, Zierz S (Hrsg): Neonatologie und Onkologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1999) S. 213-216
38. Lehnich H, Kaltenborn G, Bredehorn T, Duncker G I W, Pauer H D: Grafische Programmierung der Stimulationsabläufe für die Elektroretinographie (ERG).  
In: Virtuelle Instrumente in der Praxis, Jamal R., Jaschinski H. (Hrsg.) (2000) S. 290-294
39. Lonning P E, Lien E A: Mechanisms of action of endocrine treatment in breast cancer.  
Critical reviews in oncology/ haematology 21 (1995) 158-193
40. Longstaff S, Sigurdsson H, O'Keeffe M, Ogston S, Preece P: A controlled study of the ocular side effects of tamoxifen in conventional dosage in the treatment of breast carcinoma.  
Eur J Cancer Clin Oncol 25 (1989) 1805-1808
41. Lüllmann H, Lüllmann-Rauch R: Tamoxifen-induced generalized lipidosis in rats subchronically treated with high doses.  
Toxicology and applied Pharmacology 61 (1981) 138-146
42. Marmor M F, Zrenner E: Standard for clinical electroretinography (1994 update).  
Doc Ophthalmol (1995) 89(3) 199-210

43. Mertens S: Mammakarzinom: Selektivere Modulation der Östrogenrezeptoren wird angestrebt.  
Deutsches Ärzteblatt 96, Heft 50 (1999) 2348
44. Mieckley W: Über den Einfluß intravenös verabreichten Vincristinsulfats auf das Elektretinogramm des wachen Kaninchens.  
Med. Diss. Erlangen 1975
45. Müller-Limmroth W: Elektrophysiologie des Gesichtssinns.  
Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1959 S. 3-109
46. Nayfield S G, Gorin M: Tamoxifen-Associated Eye Disease.  
J Clin Oncol 14/3 (1996) 1018-1026
47. Niemeyer G: Information von der Netzhaut durch Elektretinografie.  
Abrecht v Graefes Arch klin exp Ophthal 211 (1979) 129-137
48. Niemeyer: Vom Symptom zur Elektretinographie-Diagnose.  
Klin Monatsbl Augenheilkd 214 (1999) 328-331
49. Ogden T E: Clinical Electrophysiology.  
The C.V. Mosby Company St. Luis, Baltimore, Toronto Retina, 1989 S. 285-292
50. Parkkari M, Paakkala A-M, Salminen L, Holli K: Ocular side-effects in breast cancer patients treated with tamoxifen and toremifene: a randomized follow-up study  
Acta Ophthalmol. Scand. 81 (2003) 495-499
51. Pavlidis N, Petris C: Clear Evidence That Long-Term, Low-Dose Tamoxifen Treatment Can Induce Ocular Toxicity.  
Cancer 69 (1992) 2961-2964
52. Peterson H: The normal b-Potential in the single-flash clinical electroretinogram.  
Acta Ophthalmologica Suppl. 99 (1968) 7-60

53. Rager, G: The Cellular Origin of the b-Wave in the Electroretinogram - A developmental Approach  
J. comp. Neurol. 188 (1979) 225-244
54. Rütther K, Zrenner E: Entwicklungen in der ophthalmologischen Elektrophysiologie.  
Klin Monatsbl Augenheilkd 202 (1993) 140-145
55. Rutqvist L E, Cedermark B, Glas U, Johansson H, Rotstein S, Skoog L, Somell A, Theve T, Wilking N, Askergrén J, Hjalmar M\_1, Ringborg U: Randomized trial of adjuvant tamoxifen in node negative postmenopausal breast cancer.  
Acta Oncologica 31/2 (1992) 265-270
56. Saphner T, Tormey D C, Gray R: Venous and arterial thrombosis in patients who received adjuvant therapy for breast cancer.  
J Clin Oncol 9 (2) (1991) 286-94
57. Szel A, Röhlich P, Caffè A, Juliusson B Aguirre G, Van Veen T: Unique Topographic Separation of Two Spectral Classes of Cones in the Mouse Retina.  
The Journal of Comparative Neurology 325 (1992) 327-342
58. Vinding T, Nielson N: Retinopathy caused by treatment with tamoxifen in low dosage  
Acta ophthalmologica 61 (1983) 45-50
59. Vogel V G: Reducing risk of breast cancer with tamoxifen in woman at increased risk.  
Journal of clinical oncology 19 (18 Suppl) (2001) 87-92
60. Wachtmeister L: Luminosity functions of the oscillatory potentials of the human electroretinogram.  
Acta ophthalmologica 52 (1974) 353-365
61. Wachtmeister L: Oscillatory Potentials in the Retina: what do they Reveal.  
Progress in Retinal and Eye Research 17/4 (1998) 485-521
62. Walsh T J: Neuroophthalmology: Clinical signs and symptoms.  
Lea&Febiger, Philadelphia, 1992 S. 354-361

## 7. Anlagen

Tabelle 2: Mittelwerte der b-Wellen-Amplituden Tamoxifen und Kontrollen für den gesamten Untersuchungszeitraum in mV

Tamoxifen					Kontrollen				
	Reizintensität	N	Mittelwert	SD		Reizintensität	N	Mittelwert	SD
<b>0 Wochen</b>	1mcDs/m <sup>2</sup>	23	0,103	0,049		1mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,106	0,044
	10mcDs/m <sup>2</sup>	23	0,204	0,080		10mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,196	0,054
	30mcDs/m <sup>2</sup>	23	0,213	0,076		30mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,199	0,067
	100mcDs/m <sup>2</sup>	23	0,231	0,077		100mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,211	0,071
	300mcDs/m <sup>2</sup>	23	0,256	0,096		300mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,229	0,079
	3000mcDs/m <sup>2</sup>	23	0,251	0,093		3000mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,230	0,082
	25000mcDs/m <sup>2</sup>	22	0,238	0,080		25000mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,223	0,080
<b>4 Wochen</b>	1mcDs/m <sup>2</sup>	22	0,054	0,021		1mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,095	0,043
	10mcDs/m <sup>2</sup>	22	0,117	0,035		10mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,189	0,072
	30mcDs/m <sup>2</sup>	22	0,144	0,040		30mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,189	0,088
	100mcDs/m <sup>2</sup>	22	0,166	0,046		100mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,202	0,090
	300mcDs/m <sup>2</sup>	22	0,188	0,052		300mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,220	0,099
	3000mcDs/m <sup>2</sup>	22	0,195	0,050		3000mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,209	0,102
	25000mcDs/m <sup>2</sup>	22	0,192	0,043		25000mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,192	0,096
<b>8 Wochen</b>	1mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,019	0,009		1mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,136	0,066
	10mcDs/m <sup>2</sup>	21	0,048	0,019		10mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,237	0,112
	30mcDs/m <sup>2</sup>	20	0,059	0,022		30mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,225	0,095
	100mcDs/m <sup>2</sup>	19	0,074	0,026		100mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,247	0,099
	300mcDs/m <sup>2</sup>	20	0,082	0,030		300mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,239	0,095
	3000mcDs/m <sup>2</sup>	21	0,091	0,025		3000mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,199	0,073
	25000mcDs/m <sup>2</sup>	21	0,091	0,023		25000mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,171	0,070
<b>12 Wochen</b>	1mcDs/m <sup>2</sup>	10	0,027	0,023		1mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,125	0,091
	10mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,053	0,036		10mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,221	0,115
	30mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,058	0,035		30mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,216	0,114
	100mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,070	0,045		100mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,254	0,125
	300mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,078	0,046		300mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,257	0,136
	3000mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,089	0,043		3000mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,229	0,126
	25000mcDs/m <sup>2</sup>	16	0,089	0,042		25000mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,203	0,097
<b>16 Wochen</b>	1mcDs/m <sup>2</sup>	4	0,045	0,061		1mcDs/m <sup>2</sup>	14	0,153	0,069
	10mcDs/m <sup>2</sup>	6	0,093	0,100		10mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,256	0,117
	30mcDs/m <sup>2</sup>	8	0,087	0,097		30mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,239	0,131
	100mcDs/m <sup>2</sup>	9	0,096	0,106		100mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,263	0,145
	300mcDs/m <sup>2</sup>	9	0,094	0,092		300mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,280	0,152
	3000mcDs/m <sup>2</sup>	8	0,102	0,095		3000mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,245	0,131
	25000mcDs/m <sup>2</sup>	7	0,091	0,082		25000mcDs/m <sup>2</sup>	17	0,212	0,116

Tamoxifen					Kontrollen				
	Reizintensität	N	Mittelwert	SD		Reizintensität	N	Mittelwert	SD
<b>32 Wochen</b>	1mcDs/m <sup>2</sup>	10	0,122	0,035		1mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,124	0,041
	10mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,240	0,090		10mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,266	0,068
	30mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,240	0,099		30mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,279	0,071
	100mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,263	0,112		100mcDs/m <sup>2</sup>	14	0,312	0,079
	300mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,265	0,110		300mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,329	0,068
	3000mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,219	0,094		3000mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,276	0,062
	25000mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,195	0,077		25000mcDs/m <sup>2</sup>	14	0,245	0,044
<b>37 Wochen</b>	1mcDs/m <sup>2</sup>	10	0,109	0,029		1mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,108	0,050
	10mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,227	0,071		10mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,225	0,088
	30mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,237	0,064		30mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,220	0,098
	100mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,274	0,066		100mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,242	0,105
	300mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,282	0,055		300mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,239	0,093
	3000mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,229	0,043		3000mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,194	0,065
	25000mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,194	0,040		25000mcDs/m <sup>2</sup>	15	0,183	0,057
<b>45 Wochen</b>	1mcDs/m <sup>2</sup>	10	0,143	0,039		1mcDs/m <sup>2</sup>	10	0,123	0,054
	10mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,267	0,103		10mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,228	0,119
	30mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,273	0,092		30mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,230	0,113
	100mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,282	0,097		100mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,240	0,107
	300mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,294	0,098		300mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,244	0,122
	3000mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,279	0,084		3000mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,247	0,064
	25000mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,282	0,060		25000mcDs/m <sup>2</sup>	11	0,231	0,057

Tabelle 3: Normalverteilungstest Amplitude b-Welle (ab) nach 0-45 Wochen

	Medikament	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
<b>ab.0</b>	Tamoxifen	0,135	23	0,200	0,937	23	0,210
	Kontrollen	0,161	17	0,200	0,914	17	0,139
<b>ab.4</b>	Tamoxifen	0,124	22	0,200	0,967	22	0,635
	Kontrollen	0,202	16	0,079	0,892	16	0,062
<b>ab.8</b>	Tamoxifen	0,094	21	0,200	0,974	21	0,770
	Kontrollen	0,183	17	0,133	0,908	17	0,095
<b>ab.12</b>	Tamoxifen	0,157	16	0,200	0,956	16	0,562
	Kontrollen	0,123	17	0,200	0,924	17	0,230
<b>ab.16</b>	Tamoxifen	0,391	8	0,001	0,733	8	0,010
	Kontrollen	0,124	17	0,200	0,923	17	0,220
<b>ab.32</b>	Tamoxifen	0,144	11	0,200	0,963	11	0,775
	Kontrollen	0,110	15	0,200	0,966	15	0,748
<b>ab.37</b>	Tamoxifen	0,187	11	0,200	0,947	11	0,587
	Kontrollen	0,108	15	0,200	0,977	15	0,923
<b>ab.45</b>	Tamoxifen	0,171	11	0,200	0,933	11	0,457
	Kontrollen	0,154	11	0,200	0,943	11	0,541

Tab. 4: Deskriptive Statistik der a-Wellen-Amplituden, Reizintensität 3000 mcDs/m<sup>2</sup>, in mV

	Amplitude a-Welle 0 Wochen	Amplitude a-Welle 4 Wochen	Amplitude a-Welle 8 Wochen	Amplitude a-Welle 12 Wochen	Amplitude a-Welle 16 Wochen	Amplitude a-Welle 32 Wochen	Amplitude a-Welle 37 Wochen	Amplitude a-Welle 45 Wochen
<b>Tamoxifen Mittelwert</b>	-0,144	-0,116	-0,058	-0,055	-0,073	-0,174	-0,177	-0,213
<b>SD</b>	0,054	0,028	0,021	0,022	0,054	0,068	0,031	0,045
<b>Median</b>	-0,147	-0,122	-0,055	-0,050	-0,050	-0,193	-0,180	-0,207
<b>Minimum</b>	-0,223	-0,189	-0,092	-0,106	-0,17	-0,251	-0,223	-0,277
<b>Maximum</b>	-0,035	-0,068	-0,025	-0,023	-0,028	-0,041	-0,122	-0,113
<b>N</b>	23	22	21	16	8	11	11	11
<b>Kontrollen Mittelwert</b>	-0,139	-0,129	-0,137	-0,150	-0,176	-0,205	-0,166	-0,197
<b>SD</b>	0,052	0,049	0,054	0,078	0,080	0,035	0,037	0,041
<b>Median</b>	-0,136	-0,1105	-0,149	-0,143	-0,195	-0,209	-0,17	-0,187
<b>Minimum</b>	-0,269	-0,202	-0,249	-0,344	-0,297	-0,251	-0,209	-0,267
<b>Maximum</b>	0	-0,053	-0,058	-0,02	-0,06	-0,135	-0,094	-0,14
<b>N</b>	17	16	17	17	17	15	15	11
<b>p</b>	0,796	0,329	0	0	0,003	0,134	0,432	0,419

Tab. 5: Deskriptive Statistik der b-Wellenamplituden, Reizintensität 3000 mcDs/m<sup>2</sup>, in mV

	Amplitude b-Welle 0 Wochen	Amplitude b-Welle 4 Wochen	Amplitude b-Welle 8 Wochen	Amplitude b-Welle 12 Wochen	Amplitude b-Welle 16 Wochen	Amplitude b-Welle 32 Wochen	Amplitude b-Welle 37 Wochen	Amplitude b-Welle 45 Wochen
<b>Tamoxifen Mittelwert</b>	0,251	0,195	0,091	0,089	0,102	0,219	0,229	0,279
<b>SD</b>	0,093	0,050	0,025	0,043	0,095	0,094	0,043	0,084
<b>Median</b>	0,270	0,192	0,087	0,093	0,065	0,230	0,234	0,271
<b>Minimum</b>	0,057	0,084	0,048	0,026	0,03	0,044	0,137	0,154
<b>Maximum</b>	0,381	0,275	0,135	0,17	0,288	0,355	0,296	0,393
<b>N</b>	23	22	21	16	8	11	11	11
<b>Kontrollen Mittelwert</b>	0,230	0,209	0,199	0,229	0,245	0,276	0,194	0,247
<b>SD</b>	0,082	0,102	0,073	0,126	0,131	0,062	0,065	0,064
<b>Median</b>	0,243	0,173	0,199	0,199	0,276	0,277	0,203	0,259
<b>Minimum</b>	0	0,069	0,108	0,049	0,053	0,135	0,079	0,164
<b>Maximum</b>	0,38	0,365	0,319	0,572	0,427	0,378	0,306	0,363
<b>N</b>	17	16	17	17	17	15	15	11
<b>p</b>	0,458	0,562	0	0	0,011	0,078	0,136	0,125

Tab. 6: Deskriptive Statistik der Gipfelzeiten der a-Wellen in ms bei 3000 mcDs/m<sup>2</sup>

		Gipfelzeit a-Welle 0 Wochen	Gipfelzeit a-Welle 4 Wochen	Gipfelzeit a-Welle 8 Wochen	Gipfelzeit a-Welle 12 Wochen	Gipfelzeit a-Welle 16 Wochen	Gipfelzeit a-Welle 32 Wochen	Gipfelzeit a-Welle 37 Wochen	Gipfelzeit a-Welle 45 Wochen
<b>Tamoxifen</b>	<b>Mittelwert</b>	16,26	15,77	24,59	26,24	24,25	19,82	19,30	15,73
	<b>SD</b>	1,98	1,57	4,54	7,28	8,41	5,15	5,24	1,95
	<b>Median</b>	16	16	24	26,5	26,5	18	17	16
	<b>Minimum</b>	13	13	19	14	10	15	15	13
	<b>Maximum</b>	21	20	37	39	36	32	33	19
	<b>N</b>	23	22	21	16	8	11	11	11
<b>Kontrollen</b>	<b>Mittelwert</b>	15,59	17,80	20,53	17,94	20,35	19,81	18,27	16,27
	<b>SD</b>	4,62	4,84	4,91	3,61	7,15	3,46	2,96	2,69
	<b>Median</b>	16	17	18	19	18	19	18	16
	<b>Minimum</b>	0	13	15	12	12	16	14	13
	<b>Maximum</b>	20	29	31	24	39	26	26	22
	<b>N</b>	17	16	17	17	17	15	15	11
	<b>p</b>	0,535	0,074	0,013	0	0,24	0,997	0,529	0,592

Tab. 7: Deskriptive Statistik der Gipfelzeiten der b-Wellen in ms bei 3000 mcDs/m<sup>2</sup>

		Gipfelzeit b-Welle 0 Wochen	Gipfelzeit b-Welle 4 Wochen	Gipfelzeit b-Welle 8 Wochen	Gipfelzeit b-Welle 12 Wochen	Gipfelzeit b-Welle 16 Wochen	Gipfelzeit b-Welle 32 Wochen	Gipfelzeit b-Welle 37 Wochen	Gipfelzeit b-Welle 45 Wochen
<b>Tamoxifen</b>	<b>Mittelwert</b>	50,57	42,45	52,80	56,63	62,74	58,47	63,05	48,72
	<b>SD</b>	4,44	4,95	9,30	8,84	13,64	6,52	12,45	3,22
	<b>Median</b>	50	42	50	55,6995	63,4535	57	59	49
	<b>Minimum</b>	43	34	43	42	42	50	52	43
	<b>Maximum</b>	57	58	80,803	72,668	83	71,367	96	53
	<b>N</b>	23	22	21	16	8	11	11	11
<b>Kontrollen</b>	<b>Mittelwert</b>	48,06	55,88	61,41	58,63	60,09	62,82	60,15	53,44
	<b>SD</b>	13,12	9,72	9,68	9,12	10,88	9,72	6,98	7,35
	<b>Median</b>	51	56	59	57	59	62	60	50
	<b>Minimum</b>	0	43	49	44	45	53	43	45
	<b>Maximum</b>	62	77	85	78	85,358	82	69	66,811
	<b>N</b>	17	16	17	17	17	15	15	11
	<b>p</b>	0,398	0	0,008	0,528	0,605	0,211	0,457	0,065

Tab. 8: b/a-Quotient

		b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a
		0 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen	16 Wochen	32 Wochen	37 Wochen	45 Wochen
<b>Tamoxifen</b>	<b>N</b>	23	22	21	17	8	11	11	11
	<b>Mittelwert</b>	1,74	1,68	1,64	1,49	1,32	1,26	1,31	1,3
	<b>SD</b>	0,17	0,24	0,32	0,61	0,37	0,2	0,21	0,19
	<b>SF</b>	0,04	0,05	0,07	0,15	0,13	0,06	0,06	0,06
	<b>Min.</b>	1,12	0,99	1,1	0	0,77	0,84	1,01	0,83
	<b>Max.</b>	1,99	2,04	2,36	2,29	1,89	1,46	1,8	1,49
<b>Kontrollen</b>	<b>N</b>	16	16	17	17	17	15	15	11
	<b>Mittelwert</b>	1,66	1,57	1,49	1,59	1,32	1,35	1,19	1,25
	<b>SD</b>	0,18	0,27	0,23	0,37	0,21	0,24	0,32	0,18
	<b>SF</b>	0,04	0,07	0,05	0,09	0,05	0,06	0,08	0,05
	<b>Min.</b>	1,24	0,95	1,17	1,02	0,88	0,61	0,41	0,83
	<b>Max.</b>	1,98	2,03	1,9	2,45	1,59	1,65	1,48	1,52
	<b>p</b>	0,163	0,191	0,109	0,554	0,963	0,284	0,307	0,517



## Thesen

1. Tamoxifen wird in der postchirurgischen adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms als Antiöstrogen eingesetzt. Brustkrebs ist die häufigste Krebsform bei Frauen und in den Industrieländern die häufigste Todesursache bei Frauen im Alter von 35-54 Jahren.
2. Nach chronischer Einnahme kationisch-amphiphiler Pharmaka, zu welchen auch Tamoxifen gehört, kommt es zu einer Lipidspeicherung in zahlreichen Organen, die auch als Lipidose bezeichnet wird.
3. Über okuläre Toxizität des Tamoxifens wird erstmals ausführlich von Kaiser-Kupfer (1981) berichtet. Bei Patienten, die hohe Dosierungen (120-150 mg, 2x/d) erhalten hatten, fanden sie ein Makulaödem, weiße kristalline Einlagerungen in der Makula und paramakulär, Störungen des retinalen Pigmentepithels, sowie weiße, wirbelartige Korneatrübungen und Visusverschlechterungen.
4. Lazzaroni (1998) konnte in seiner Studie bei niedriger Dosierung jedoch in keinem Fall ein Makulaödem bzw. Visusverschlechterungen bemerken. Auch weist er auf die schwierige Differentialdiagnose der kristallinen Ablagerungen zur idiopathischen juxtafovealen retinalen Teleangiektasie und zu Frühformen der alterskorrelierten Makuladegeneration hin.
5. Ziel unseres Vorhabens war es, unter Verwendung von elektrophysiologischen Methoden wie der Elektroretinografie im Vergleich zu histologischen Untersuchungen und der Ophthalmoskopie, durch Tamoxifen verursachte funktionelle und morphologische Schädigungen der Netzhaut der Maus zu lokalisieren und zugrundeliegende Wirkungsmechanismen weiter aufzuklären.
6. Die Elektroretinografie als nicht-invasive Untersuchungsmethode spiegelt die Funktion der Sehbahn auf der Ebene der Netzhaut wider. Durch einen Lichtreiz werden in der Retina Einzelzellsignale ausgelöst, die in ihrer Gesamtheit (Summenpotential) das Elektroretinogramm ergeben.

7. Es wurden weibliche pigmentierte Mäuse vom Stamm C57Bl eingesetzt. 24 Tiere wurden 16 Wochen lang mit Tamoxifen (150-180mg/kg KG) gefüttert, die Kontrollgruppe bestand aus 19 Tieren. Nach jedem Messzyklus im Abstand von 4 Wochen wurden die Retinae einiger Tiere für die histologische Untersuchung histologisch aufgearbeitet.  
Nach Absetzen des Tamoxifens wurden die Tiere 29 Wochen nachbeobachtet bzw. elektrophysiologisch untersucht.
8. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA).
9. Nach 16 Wochen Tamoxifenapplikation waren die a- und b-Welle in ihrer Amplitude signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert. Auch die Amplituden der Kontrolltiere reduzierte sich geringgradig im Versuchsverlauf, was am ehesten auf einen altersbedingten Effekt zurückzuführen ist.  
Nach Absetzen des Tamoxifens war die Amplitudenreduktion reversibel.
10. Die Gipfelzeiten der a- und b-Welle verlängerten sich im Versuchsverlauf, zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen.
11. Lichtmikroskopisch waren keine Ablagerungen nachweisbar.  
Die fehlende morphologische Nachweisbarkeit schließt eine biochemische oder im Bereich der Interzellulärmatrix gelegene Beeinflussung jedoch nicht aus.
12. Die Reduktion von a- und b-Wellenamplitude spricht für einen komplexen Netzhautschaden in mehreren Netzhautschichten.
13. Möglich ist auch eine direkte Einwirkung des Tamoxifens. Die intraokuläre Penetration ist in der Literatur auch ohne Induktion einer Lipidose beschrieben.
14. Da die Applikationsdauer in unserem Versuch nur 16 Wochen, im Gegensatz zur jahrelangen Therapie beim Menschen, betrug, sprechen die gefundenen Veränderungen für einen durch Tamoxifen verursachten Frühschaden.

15. Direkte Rückschlüsse auf den Menschen sind wegen des unterschiedlichen Aufbaus der Retina (Mäuse haben keine Fovea centralis) nur eingeschränkt möglich. Die in unseren Versuchen beobachtete Reversibilität der funktionellen Veränderungen bestätigen die Ergebnisse anderer Autoren und erlauben es unserer Ansicht nach, bei beginnenden funktionellen oder morphologischen Veränderungen während einer Tamoxifentherapie, diese, unter Beachtung des Risiko-Nutzen-Verhältnisses, ohne bleibende Funktionsschäden fortführen zu können.
16. Engmaschige, interdisziplinäre Kontrollen von Patientinnen unter Tamoxifentherapie unter Beachtung von angegebenen Beschwerden und vorbestehenden Begleiterkrankungen sind empfehlenswert und tragen zur Reduktion unerwünschter Arzneimittelnebenwirkungen bei.

## LEBENS LAUF

30.7.1972 geboren in Halle / Saale

Familienstand ledig

Staatsangehörigkeit BRD

Familie Vater: Dr. rer. nat. Manfred Klaua, Physiker im Ruhestand  
Mutter: Dr. med. sc. Monika Klaua, FÄ für Nuklearmedizin im Ruhestand  
Bruder: Robert Klaua, Strahlenphysiker

### **schulischer Werdegang**

1979-1989 Polytechnische Oberschule „Otto Grotewohl“, Halle

1989-1991 Erweiterte Oberschule „Thomas Müntzer“, Halle

8/1991 Abitur

### **Studium**

1991-1998 Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/1998 3. Staatsexamen

### Famulaturen

7/1994 Innere Medizin, Abteilung für Infektionskrankheiten und Pneumologie, King's Cross Hospital Dundee, Great Britain

2/1995 Ophthalmologie  
Augenklinik des städtischen Krankenhauses Neukölln

3/1996 Gynäkologie und Geburtshilfe  
Universitätsklinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin der MLU Halle-Wittenberg

3/1997 Dermatologie  
Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der MLU Halle-Wittenberg

1993/1994

2 Urlaubssemester:  
Arbeit im Heim für körperlich behinderte Menschen  
Arnold House Cheshire Home, London, Great Britain

Course of General English at Stevenson College, Edinburgh  
Certificate in Advanced English

### Praktisches Jahr 1997/98

- Teil 1: Chirurgie: Kalafong Hospital, University of Pretoria,  
South Africa
- Teil 2: Innere Medizin: Diakoniekrankenhaus Halle
- Teil 3: Augenheilkunde: Universitätsklinik und Poliklinik für Augen-  
heilkunde der MLU Halle-Wittenberg

### **berufliche Tätigkeit**

- 1/1999– 7/2001 Ärztin im Praktikum  
Universitätsklinik und Poliklinik für Augenheilkunde der MLU  
Halle-Wittenberg
- 8/1999 –7/2000 Postgraduiertenstipendium, Forschung über funktionelle  
Veränderungen der Mäuseretina nach chronischer Gabe  
lipidoseinduzierender Medikamente
- seit 8/2001 Ärztin in Weiterbildung an der Universitätsklinik und Poliklinik  
für Augenheilkunde der MLU Halle-Wittenberg

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit

„Funktionelle und morphologische Veränderungen der Retina von Mäusen nach chronischer Gabe von Tamoxifen“

ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Des Weiteren erkläre ich, dass dies mein erster Promotionsversuch ist.

Halle, den 8.1.2004

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. G. I. W. Duncker möchte ich für die Überlassung des Themas danken. Ich erfuhr eine große Unterstützung bei der Beantragung des Graduiertenstipendiums, welches mir die effektive Durchführung der Experimente ermöglichte. Für eine Diskussion der Ergebnisse und den Gedankenaustausch zum Fortgang der Untersuchungen stand er jederzeit zur Verfügung. Für seine kritischen und konstruktiven Hinweise möchte ich ihm sehr danken.

Herrn Dr. med. T. Bredehorn danke ich für die intensive Zusammenarbeit und für Rat und Hilfe bei der Planung der Untersuchungen und für seine vielen Hinweise bei der Auswertung der Ergebnisse.

Den Mitarbeitern des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung Herrn Prof. Dr. rer. nat. Pauer, Herrn Dr. med. Kaltenborn und Herrn Lehnich möchte ich für die Hilfe bei allen Fragen zur Bewältigung der anstehenden technischen Probleme beim Aufbau des ERG-Meßplatzes sowie Planung der einzusetzenden Software zur Auswertung der ERG-Kurven danken.

Herrn Professor Dr. med. H.-J. Holzhausen im Institut für Pathologie an der MLU Halle-Wittenberg möchte ich für seine Hilfe und Unterstützung bei der Erstellung und Auswertung der histologische Präparate danken.

Sehr hilfsbereit waren auch die Tierpflegerinnen vom Tierstall, welche uns bei der Pflege und Handhabung der Mäuse unterstützten.

Den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe Frau Pallas, Frau Harm, Frau Buchholz, Frau Simon und Herrn Schöne möchte ich für die Zusammenarbeit danken.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Unterstützung auf meinem bisherigen Weg und ihre Hilfe beim Korrekturlesen sowie meinem Lebensgefährten für seine Geduld und Hilfe.