

Protektive Wirkung Blaulicht absorbierender IOLs auf das menschliche retinale Pigmentepithel

Hintergrund

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) stellt eine der Hauptursachen für den Verlust von Sehkraft in Deutschland und in den westlichen Industrienationen dar [5, 10, 18, 28]. Sie verursacht 8,7% aller Erblindungen im Sinne des Gesetzes und ist neben grauem Star und Glaukom die dritthäufigste Ursache für Sehbehinderung weltweit [28]. Etwa 10% der Patienten mit AMD entwickeln die neovaskuläre Form, die häufig innerhalb kurzer Zeit zu einem deutlichen Verlust an zentraler Sehschärfe führt [10]. Bei der überwiegenden Anzahl der Patienten liegen „trockene“ Formen wie die geographische Atrophie (GA) vor [5, 10, 18, 28]. Bei der GA kommt es zum Untergang retinaler Pigmentepithelzellen (PRE) und als Folge davon zu einer Schädigung der Photorezeptoren [19]. Trotz jüngster Erfolge bei der Behandlung der exsudativen AMD [30] und intensiver wissenschaftlicher Anstrengungen gibt es bisher keinen ursächlichen Therapieansatz.

Neben Umweltfaktoren, Ernährung und genetischen Einflüssen [18] wird zunehmend auch die Wirkung des Sonnenlichts für die Entstehung der AMD mitverantwortlich gemacht [7, 18]. Daten aus großen epidemiologischen Studien legen einen Zusammenhang zwischen der Entstehung der AMD und der lebenslangen Sonnenlichtexposition nahe [7, 18]. Hierbei scheinen insbesondere pseudophake und aphake Augen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung und das Fortschreiten der AMD zu haben [7, 18]. Ein Grund hierfür kann die Tatsache sein, dass die Hornhaut und die menschliche Linse auf natür-

liche Weise durch Absorption von UV-Strahlung einen wirkungsvollen Schutz der Netzhaut vor schädlichen Lichteinflüssen bieten [26, 33]. Außerdem verfärbt sich beim älteren Menschen, dessen Netzhaut möglicherweise bereits vorgeschädigt ist, die Linse mit zunehmendem Alter gelblich und filtert so mehr potenziell schädliche Anteile im blauen Spektrum des Lichts [34]. Diese zusätzliche Filterwirkung der alternden Linse erscheint besonders wichtig, da insbesondere die Blauanteile des Lichtspektrums zu photochemischer Zellschädigung im RPE führen können [12].

Die schützende Wirkung der natürlichen Linse fehlt nach Kataraktextraktion und die Netzhaut wird dann vermehrt Strahlung ausgesetzt [20, 23].

Zum Schutz der Netzhaut vor den schädlichen Einflüssen des Lichts werden seit geraumer Zeit von verschiedenen Herstellern UV-Licht und Blaulicht absorbierende (gelb getönte) Intraokularlinsen (IOLs) angeboten [4]. Zwar scheint der Einsatz dieser IOLs keine schädlichen Auswirkungen für den Patienten zu haben, der klinische Nachweis für die Wirksamkeit dieser IOLs steht aber noch aus [2].

Um zu untersuchen, ob diese UV-Licht bzw. Blaulicht absorbierenden IOLs die Netzhaut und das menschliche RPE potenziell vor dem schädlichen Einfluss erhöhter Lichteinstrahlung schützen können, haben wir in vitro die mögliche zytoprotektive Wirkung dieser gelben IOLs und deren Einfluss auf die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) durch vermehrte Lichteinstrahlung im Zellkulturmodell untersucht. Außer-

dem haben wir untersucht, ob die Filterwirkung dieser IOLs die Expression des Wachstumsfaktors VEGF-A („vascular endothelial growth factor-A“), einem der Hauptstimuli für pathologische Gefäßneubildungen bei der neovaskulären AMD [36], und des antiapoptotisch wirkenden XIAP-Proteins, das bei der Regulation der Apoptose in der Netzhaut mitbeteiligt ist [21, 27], günstig beeinflussen kann.

Methoden

Kultivierung und Bestrahlung primärer RPE-Zellen in Anwesenheit einer UV-Licht oder Blaulicht absorbierenden IOL

Um die Wirkung erhöhter Lichteinstrahlung auf das menschliche retinale Pigmentepithel (RPE) hinsichtlich Zelltod, Apoptose und Vitalität zu untersuchen und zu prüfen, ob eine Lichtfilterung mit einer UV-Licht absorbierenden Standard-IOL (SA6oAT, Alcon) oder einer blaugleichen UV-Licht und Blaulicht absorbierenden, gelbgetönten IOL (SN6oAT, Alcon) schützende Effekte vor möglichen phototoxischen Schäden haben, wurden frühe Passagen (2 und 3) von primären, humanen RPE-Zellen für 15–60 min mit rein weißem Licht sowie mit entsprechend gefiltertem Licht bestrahlt. Hierzu wurde eine Hochleistungsxenonlichtquelle mit homogenem Lichtspektrum (400–700 nm) verwendet. An die Lichtquelle wurde ein Lichtleiter angeschlossen, an dessen Ausgang die jeweilige IOL angebracht wurde und über den die Bestrahlung der

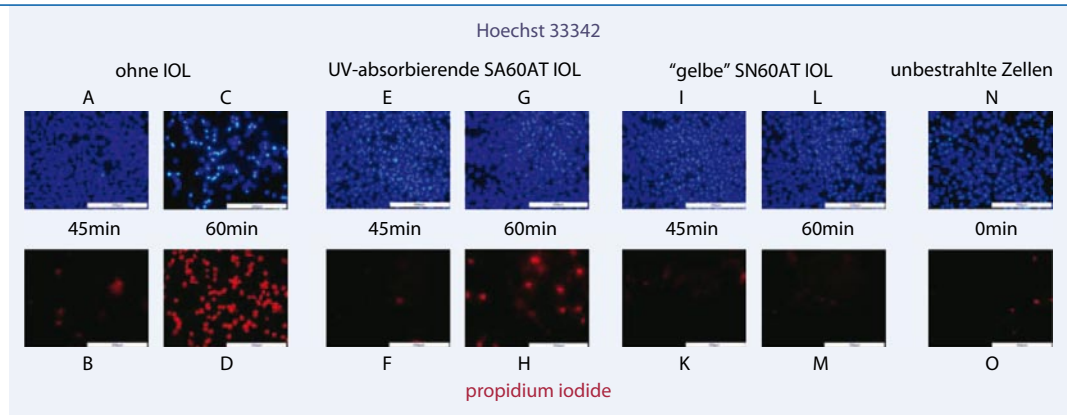


Abb. 1 ▲ Live-Dead-Assay: Induktion von Zelltod nach Bestrahlung der primären humanen RPE-Zellen mit ungefiltertem Licht (**a, b, c, d**) und nach Filterung des Lichts mit einer „UV-Licht absorbierenden IOL (**e, f, g, h**) oder einer UV-Licht und Blaulicht absorbierenden IOL (**i, j, k, l, m**). Die Gesamtzahl der Zellen ist blau dargestellt, die Anzahl toter Zellen rot. Nach 60 min ungefilterter Bestrahlung kommt es zu einer deutlichen Induktion von Zelltod bei den primären RPE-Zellen. Diese nimmt in Anwesenheit der UV-absorbierenden IOL deutlich ab, bleibt jedoch nachweisbar. In Anwesenheit der „gelben“ IOL kommt es bei keiner der untersuchten Bestrahlungszeiten zu vermehrter Induktion von Zelltod

Zellen erfolgte. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurde das Zellkulturmedium gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) getauscht. Die Zellen wurden von oben für 15–60 min mit einer Intensität von 350 mW/cm^2 unter Kontrolle des Lichtspektrums und der Strahlungsintensität mittels Spektralphotometer bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde die PBS-Lösung gegen serumfreies Zellkulturmedium ausgetauscht und die Zellen für 24 h in Dunkelheit gehalten. Dann wurden 3 etablierte Testverfahren zur Beurteilung der Vitalität, der Induktion von Zelltod und der Induktion von Apoptose durchgeführt: MTT-Assay, Live-Dead-Assay und „cell-death enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA). Außerdem wurde mittels Real-Time-PCR (RT-PCR) eine quantitative Analyse der mRNA-Expression des Wachstumsfaktors VEGF-A und des antiapoptotisch wirksamen XIAP-Proteins sowie die Umsetzung der entsprechenden mRNA-Transkripte in die entsprechenden Proteine durch Western-Blot-Analyse untersucht.

RPE-Zellen wurden von 5 Spenderaugen an der Hornhautbank der Augenklinik der LMU gewonnen und wie andernorts beschrieben kultiviert [17]. Dabei wurden nur die 2. und 3. Passage für die Versuche verwendet. Frühe Passagen von primären RPE-Zellen weisen noch zelleigenes Lipofuscin auf, das als Photosensitizer wirkt und bei der Entstehung der exsudativen AMD eine wichtige Rol-

le spielt [15, 31]. Dieser natürliche Lipofuscingehalt geht mit zunehmender Kultivierungsdauer der Zellen verloren [3, 11, 25].

Die Untersuchungen erfolgten an stationären Zellkulturen. Stationäre Zellkulturen erleichtern, besonders im MTT-Assay, die Abgrenzung von zytotoxischen gegenüber antiproliferativen Effekten. Hierzu wurden ca. 3×10^5 Zellen pro Well auf 35 mm Petrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen unter serumfreien Kulturbedingungen mit rein weißem Licht bestrahlt und entweder die rein UV-Licht absorbierende IOL (SA60AT, Alcon) oder die UV-Licht und Blaulicht absorbierende, gelbgetönte IOL (SN60AT, Alcon) in den Strahlengang eingefügt.

Zellvitalitätsassay (MTT-Assay)

Der Tetrazolium-Farb-Reduktions-Assay (MTT; 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und ist eine Standarduntersuchungstechnik von Substanzen in Zellkultur. Details des Untersuchungsgangs sind in den Referenzen [17] und [24] beschrieben. Prinzipiell werden die Zellen mit dem initial gelben MTT-Farbstoff inkubiert. Der Farbstoff wird dem Vitalitätsgrad der Zellen entsprechend verstoffwechselt und schlägt ins violette über. Diese Farbänderung wird photometrisch erfasst und erlaubt Rückschlüsse auf die

Vitalität und Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen.

Live-Dead-Assay

Im Live-Dead-Assay wird die Induktion von Zelltod unter dem Einfluss bestimmter Bedingungen untersucht. Die Zellkerne nicht lebensfähiger Zellen werden durch den roten, membranundurchlässigen Farbstoff Propidiumjodid angefärbt. Gleichzeitig werden die Kerne aller Zellen durch den blauen, membranundurchlässigen Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Eine Zweifarbenfluoreszenzuntersuchung ermöglicht die Differenzierung beider Färbungen, und die Anzahl der lebenden und der toten Zellen lässt sich bestimmen. Der Test wurde entsprechend vorangehender Beschreibung [17] und den Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich) durchgeführt.

Nachweis von Apoptose im RPE

Die Apoptose ist durch Kondensation des Zytoplasmas und die Aktivierung endogener Endonukleasen charakterisiert. Dies führt zu internukleosomaler Spaltung von DNA mit Entstehung von Mono- und Oligonukleosomen, die eng mit Histonen vernetzt sind. Zum quantitativen Nachweis von Apoptose im RPE wurden histonassoziierte DNA-Fragmente in Mono- und Oligonukleosomen, als Marker für Apoptose, durch einen ELISA-Test entsprechend den Anweisungen des Herstel-

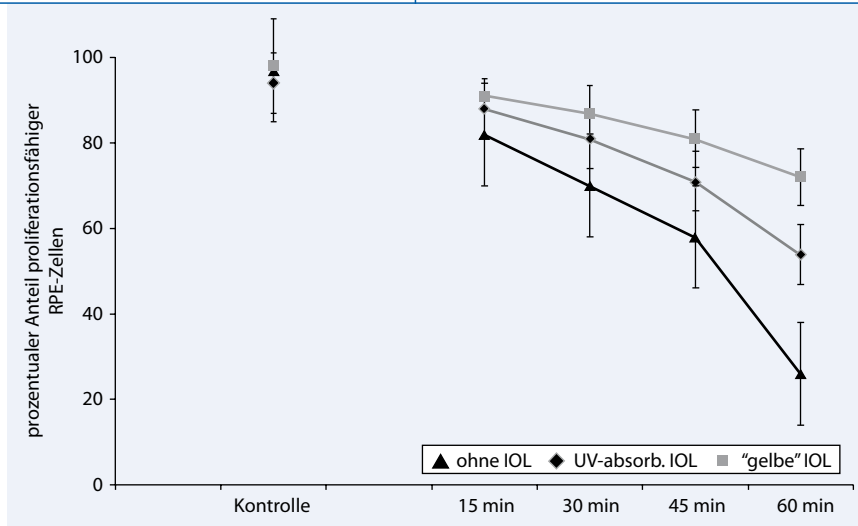


Abb. 2 ▲ Im Zellvitalitätsassay (MTT-Assay) kam es bei den primären RPE-Zellen unter der Bestrahlung mit ungefiltertem, weißem Licht zu einer bestrahlungszeitabhängigen Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität. Beide untersuchte IOLs konnten diese toxische Wirkung des Lichts mildern. Bei den längeren Bestrahlungszeiten (45 min und 60 min) war dieser Effekt nach Filterung des Lichts mit der gelbgetönten IOL dem der ungetönten IOL signifikant überlegen

lers (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) untersucht.

RNA-Isolation und quantitative RT-PCR

Die Gesamt-RNA zur Untersuchung der VEGF-A- und XIAP-Expression wurde aus 35-mm-Petrischalen nach der Guanidium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) isoliert. Die quantitative Real-Time-PCR ermöglicht die Erfassung von sehr kleinen Mengen mRNA. Nach der üblichen Isolierung der mRNA wird diese in cDNA durch Reverse Transkriptase umgeschrieben. Diese cDNA wird dann für die spezifische PCR verwendet.

Um Unterschiede in der Höhe der VEGF-A- und XIAP-RNA-Expression in jeder untersuchten Probe zu bestimmen, wird die Expression von 18S-rRNA gleichzeitig in ein und derselben Probe als interne Kontrolle mitgeführt und die entsprechende VEGF-A- und XIAP-RNA ins Verhältnis dazu gesetzt.

Proteinextraktion, Fluoreszenzimmunhistochemie und Westernblotanalyse

Um zu überprüfen, ob die lichtinduzierte Abnahme der XIAP-mRNA-Transkription und deren Abmilderung durch die Fil-

terwirkung der beiden getesteten IOLs in verminderte Proteinsynthese umgesetzt wird, wurde ein Gesamtproteinextrakt aus den Zellen gewonnen und mit einem Maus Anti-XIAP-Antikörper entsprechend vorangehender Beschreibungen [35] durch Westernblotting analysiert. Außerdem wurden Expressionen von XIAP bei den bestrahlten Zellen mit einer Fluoreszenzfärbung entsprechend vorangegangenen Protokollen immunhistochemisch untersucht [35].

VEGF-A-ELISA

Für den ELISA-Test zum Nachweis von VEGF-A in den Zellkulturüberständen wurde das Medium der entsprechenden Zellkulturen gesammelt und zentrifugiert. Aus diesen Proben wurde dann die Konzentration von VEGF mit einem ELISA-Assay-Kit (R & D Systems) analysiert. Die Extinktion wurde bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Reader (Bio-Rad) gemessen. Zur Analyse der Ergebnisse wurden die Mittelwerte \pm SD aus 6 unterschiedlichen Proben ausgewertet und zu einem Konzentrationsstandard korreliert.

Statistische Auswertung

Die Analyse der Versuchsergebnisse erfolgte mit SPSS 13.0 für Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Für die Ergebnisse aus

dem MTT-Assay und der RT-PCR wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Bei allen statistischen Tests wurde $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Alle Versuche wurden mindestens dreimal und mit RPE-Zellen von je 3 verschiedenen Spendern durchgeführt.

Ergebnisse

UV-Licht und Blaulicht absorbierende IOLs schützen das RPE vor phototoxischen Einflüssen

Die Bestrahlung primärer, humaner RPE-Zellen mit rein weißem Licht (400–700 nm, 350 mW/cm²) führte zu einer bestrahlungszeitabhängigen Induktion von Zelltod und Apoptose. Auch die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität, die Rückschlüsse auf die Vitalität und Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen erlaubt, nahm im MTT-Assay mit der Bestrahlungszeit stetig ab (■ **Abb. 1, 2, 3**).

Sowohl die Filterwirkung der konventionellen, UV-Licht absorbierenden Standard-IOL als auch die Filterwirkung der gelbgefärbten, UV-Licht- und Blaulicht absorbierenden IOL führte zu einer signifikanten Abnahme der phototoxischen Effekte.

Nach einer Bestrahlungszeit von 60 min ließ sich unter Filterwirkung der konventionellen, UV-Licht absorbierenden IOL eine deutliche Induktion von Zelltod nachweisen. Im Gegensatz dazu war bei Verwendung der gelbgefärbten, UV-Licht und Blaulicht absorbierenden IOL keine vermehrte Induktion von Zelltod nachweisbar (■ **Abb. 1**). Außerdem war hier der lichtinduzierte Vitalitätsverlust und der Anstieg von Apoptose nach 45 min und 60 min signifikant geringer als unter Verwendung der konventionellen IOL (■ **Abb. 2, 3**).

Überexpression von VEGF-A durch erhöhte Lichtexposition des RPE wird durch Blaufilterung des Lichts signifikant vermindert

Die Ergebnisse dieser Studie konnten zudem zeigen, dass es mit zunehmender Dauer der Bestrahlung mit ungefiltertem Licht zu einer ausgeprägten Induktion

des Wachstumsfaktors VEGF kam. Hierbei war die VEGF-A-Konzentration in den Zellkulturüberständen nach 60 min Bestrahlungszeit um das 2,5-fache höher als bei den unbestrahlten Kontrollzellkulturen. Auch hier konnten beide untersuchte IOLs sowohl die mRNA-Expression als auch die Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF-A signifikant reduzieren. Nach 45 min und 60 min war dieser Effekt bei den Zellen, die in Anwesenheit der gelbgetönten IOL bestrahlt wurden, signifikant ausgeprägter als bei den Zellen, die in Anwesenheit der konventionellen IOL bestrahlt wurden (■ Abb. 4, 5).

Gelbgetönte IOLs mildern im RPE die durch erhöhte Bestrahlung induzierte Abnahme des antiapoptotischen XIAP-Proteins

Im Verlauf der Bestrahlung mit ungefiltertem Licht kam es bei den RPE-Zellen zu einer bestrahlungszeitabhängigen Abnahme der mRNA-Expression des antiapoptotischen XIAP-Proteins. Sowohl die Filterungswirkung der konventionellen IOL als auch die der gelbgetönten IOL führte zu einer signifikanten Abnahme dieses Effekts. Nach 45 min und 60 min war dieser Effekt nach Filterung mit der gelbgetönten IOL aber signifikant ausgeprägter als unter Verwendung der konventionellen IOL (■ Abb. 6). Auch in Bezug auf die Umsetzung der entsprechenden mRNA-Transkripte in Proteinsynthese ließ sich zeigen, dass bei den Zellen, die unter Verwendung der gelbgetönten IOL bestrahlt wurden, sowohl in der Fluoreszenzfärbung als auch im Westernblot die Expression des XIAP-Proteins nach 60 min Bestrahlungszeit deutlich weniger abgenommen hat als bei den Zellen, die mit der konventionellen IOL bestrahlt wurden (■ Abb. 7).

Diskussion

Die Kataraktoperation ist einer der häufigsten operativen Eingriffe überhaupt, und Millionen von Menschen können durch sie vor Erblindung bewahrt werden [6]. Dank moderner, minimal-invasiver Techniken gilt die Kataraktoperation als sicher und die Komplikationsraten sind äußerst gering [6]. Mit der Entfernung der

Ophthalmologie 2010 · 107:150–157 DOI 10.1007/s00347-009-1945-x
© Springer Medizin Verlag 2009

M. Kernt · C. Hirneiss · A.S. Neubauer · C.A. Lackerbauer · K.H. Eibl · A. Wolf · MW. Ulbig · A. Kampik

Protective Wirkung Blaulicht absorbierender IOLs auf das menschliche retinale Pigmentepithel

Zusammenfassung

Hintergrund. Kumulative Lichtexposition wird für die Entstehung der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) mitverantwortlich gemacht. Um die Netzhaut vor den schädlichen Einflüssen des blauen Lichts zu schützen, werden seit geraumer Zeit Blaulicht absorbierende Intraokularlinsen (IOLs) eingesetzt. Diese Studie vergleicht mögliche zytoprotektive Effekte der Blaulicht absorbierenden SN60AT IOL (ALCON) mit der ungefärbten, UV-Licht absorbierenden SA60AT IOL (ALCON) auf das humane retinale Pigmentepithel (RPE).

Methoden. Kulturen primärer humaner RPE Zellen wurden mit weißem Licht bestrahlt, das entweder durch eine SN60AT IOL oder eine SA60AT IOL gefiltert wurde. Nach einer Bestrahlungszeit von 15–60 min wurden Vitalität, Induktion von Apoptose und die Expression des „vascular endothelial growth factor A“ (VEGF-A) sowie des antiapoptotisch wirksamen Proteins XIAP auf zellulärer Ebene bestimmt (RT-PCR/Western Blot/ELISA)

Ergebnisse. Die ungefilterte Bestrahlung der RPE-Zellen mit weißem Licht führte zu ei-

ner bestrahlungszeitabhängigen Abnahme der Vitalität und der Expression von XIAP sowie zu einer Induktion von Apoptose und Bildung von VEGF-A. Diese phototoxische Zellschädigung wurde durch beide untersuchten IOLs signifikant reduziert. Die Zellschädigung durch Bestrahlung mit Licht nach Blaulichtfilterung mit der SN60AT IOL war signifikant geringer als mit der SA60AT IOL.

Schlussfolgerung. Sowohl UV-filternde als auch Blaulicht absorbierende IOLs reduzieren phototoxische RPE-Schädigung. Die Blaulicht absorbierende SN60AT IOL führte in unseren Versuchen zu einer zusätzlichen Reduktion der Zellschädigung. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Blaulicht absorbierende IOLs auch im klinischen Gebrauch eine photoprotektive Wirksamkeit auf Netzhautebene besitzen

Schlüsselwörter

Kataraktchirurgie · Gelbe Intraokularlinse · Altersabhängige Makuladegeneration · „Vascular endothelial growth factor“ · Apoptose

Protective effect of blue light-absorbing IOLs on the human retinal pigment epithelium

Abstract

Methods. Primary human RPE cells were exposed to white light and either a SN60AT or SA60AT IOL was placed in the light beam. After 15–60 min of irradiation, viability, induction of apoptosis and cell death were determined in primary human RPE cells. Expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and the anti-apoptotic XIAP protein and their mRNA were determined by RT-PCR, Western blot analysis and ELISA.

Results. Light exposure decreased cell viability depending on the duration of irradiation. Light-induced cell death and apoptosis as well as decrease of XIAP expression and cellular viability were significantly reduced by both the SN60AT and SA60AT IOL. In addition,

these protective effects regarding light-induced cell damage were significantly stronger in the presence of the blue light-filtering SN60AT IOL compared to the SA60AT IOL.

Conclusion. Both UV-filtering and blue light-absorbing IOLs reduce light-induced RPE damage. The blue light-absorbing IOL further reduced damage compared to the conventional IOL, which supports the hypothesis of possibly also preventing retinal damage in clinical use.

Keywords

Cataract surgery · Yellow intraocular lens · Age-related macular degeneration · Vascular endothelial growth factor · Apoptosis

Apoptose-ELISA (quantitative Detektion von Histone-Assoziierter DNA-Fragmentaion)

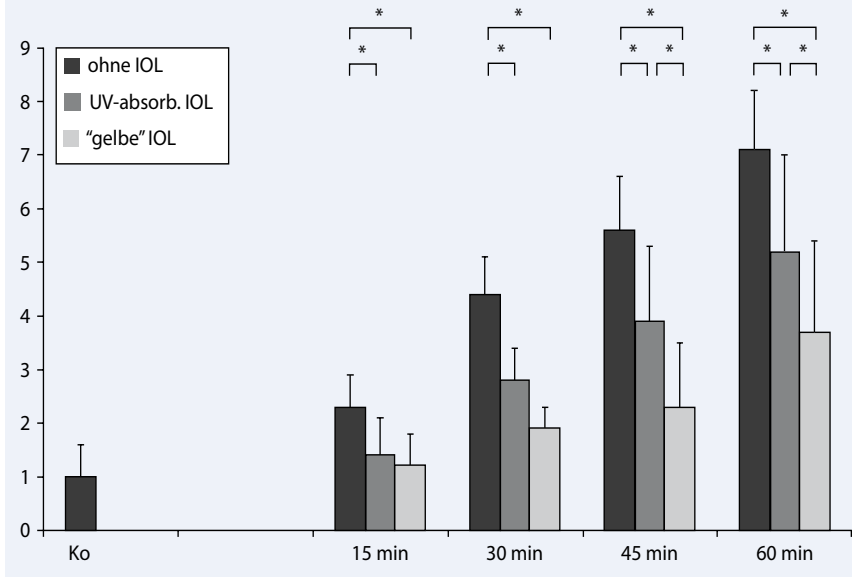


Abb. 3 ▲ Quantitativer Nachweis von histonassoziierten DNA-Fragmenten in Mono- und Oligonucleosomen als Marker für Apoptose mittels ELISA: nach Bestrahlung der RPE Zellen mit ungefiltertem Licht („ohne IOL“) und nach Filterung des Lichts mit einer „nur“ UV-Licht absorbierenden IOL („UV-absorb. IOL“) oder einer UV- und Blaulicht absorbierenden IOL („gelbe IOL“). Statistisch signifikante Unterschiede sind durch „*“ gekennzeichnet

VEGF-A mRNA

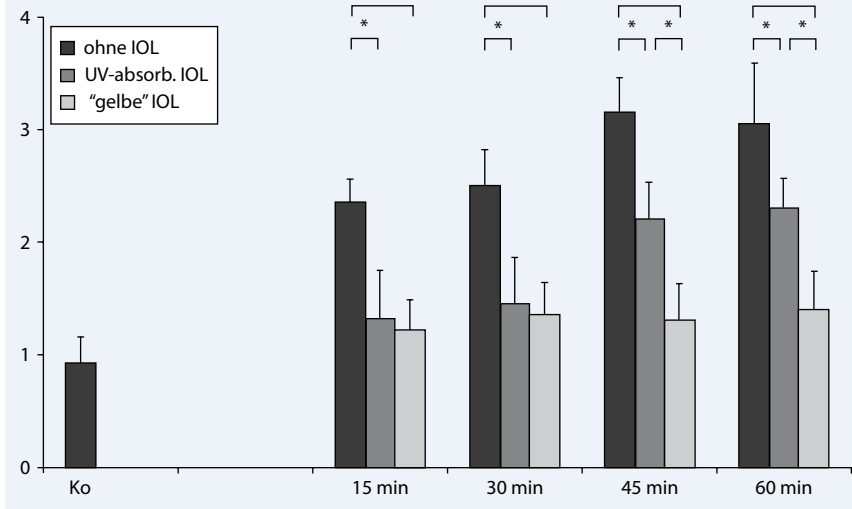


Abb. 4 ▲ Expression von VEGF-A-mRNA (RT-PCR) nach Bestrahlung der RPE-Zellen mit ungefiltertem Licht („ohne IOL“) und nach Filterung des Lichts mit einer „nur“ UV-Licht absorbierenden IOL („UV-absorb. IOL“) oder einer UV-Licht und Blaulicht absorbierenden IOL („gelbe IOL“) im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle (Ko). Statistisch signifikante Unterschiede in der VEGF-A Expression sind durch „*“ gekennzeichnet

natürlichen Linse und durch die Implantation einer IOL wird aber ein natürliches Schutzschild des Auges vor Lichtschädigung durchbrochen und die Netzhaut potenziell vermehrter Strahlung ausgesetzt [20, 23]. Besonders kurzwelliges Licht kann zu phototoxischer Zellschädigung

des Auges führen [12]. Neben der Hornhaut schützt die natürliche Linse die Netzhaut durch Absorption einer wesentlichen Menge dieses besonders schädlichen Anteil des Sonnenlichts [26, 33]. Im Gegensatz dazu deuten zahlreiche epidemiologische Studien darauf hin, dass die kumu-

lative, lebenslange Lichtexposition insbesondere bei aphaken und pseudophaken Augen zur Schädigung der Netzhaut und des RPE führen kann und dass diese Augen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung und das Fortschreiten einer AMD haben [7, 13, 18, 32].

Photochemische Zellschädigung und lichtinduzierte Apoptose werden als Mechanismen für die atrophische Degeneration von RPE-Zellen beschrieben [1]. Lichtinduzierter apoptotischer RPE-Zellverlust ist besonders schwerwiegend, da beim Menschen das RPE aus postmitotischen Zellen besteht und sich diese somit unter Normalbedingungen lebenslang nicht mehr teilen [16].

In dieser Studie haben wir in vitro untersucht, ob UV-Licht absorbierende und UV-Licht und Blaulicht absorbierende IOLs vor lichtinduzierter Zellschädigung schützen können. Hierbei ließ sich zeigen, dass beide untersuchten IOLs in unserem Zellkulturmodell zu einer signifikanten Reduktion der phototoxischen Effekte des Lichts im Hinblick auf Vitalität und Induktion von Zelltod, aber auch zu einer signifikanten Abnahme von Apoptose im RPE führten.

Das Spektrum des für unsere Untersuchungen verwendeten rein weißen Lichts beinhaltet keinen UV-Anteil. Die Tatsache, dass in unseren Versuchen beide untersuchten IOLs, sowohl die „gelbe“ UV-Licht und Blaulicht absorbierende als auch die „nur“ UV-Licht absorbierende IOL, zu einer gewissen Abnahme der beschriebenen phototoxischen Effekte führten, muss also auf die lichtabschwächenden Materialeigenschaften des für beide Linsen verwendeten Acryls, die eine Abnahme der Transmission auf 90% über das gesamte Spektrum (400–700 nm) hervorrufen, zurückgeführt werden [9]. Hinzu kommt, dass der UV-Filter, der in beiden IOLs angewendet wird, auch im unteren Wellenlängenbereich des Blauspektrums (bis ca. 430 nm) eine gewisse Filterwirkung zeigt [9]. Es ist aber hervorzuheben, dass insbesondere bei längeren Bestrahlungszeiten (45 und 60 min) diese protektiven Effekte auf das RPE bei Filterung des Lichts mit einer gelben IOL, die zusätzlich mit einem Lichtfilter im Bereich von 400–500 nm ausgestattet ist, signifikant stärker ausgeprägt waren

als bei Filterung mit einer lediglich UV-Licht absorbierenden IOL.

Die neovaskuläre AMD kann innerhalb kurzer Zeit zum drastischen Verlust der zentralen Sehschärfe führen. VEGF-A gilt hierbei als einer der Hauptstimuli für die Entstehung der neugebildeten Gefäße [36]. Zudem gibt es Hinweise, dass kumulative Lichtexposition zur Induktion angiogenetischer Faktoren im RPE führen kann und so die Entstehung einer neovaskulären AMD begünstigt wird [36]. In unserem Versuchsaufbau kam es – im Einklang mit den Ergebnissen aus vorangegangenen Studien [37] – mit zunehmender Dauer der Bestrahlungszeit zu einer ausgeprägten Induktion des Wachstumsfaktors VEGF. Hierbei wurden in den Zellkulturüberständen VEGF-A-Konzentrationen erreicht, die um das 2,5-fache höher als das Normalmaß waren. Dieser lichtinduzierte Anstieg der VEGF-Expression konnte zwar durch die Filterwirkung der beiden untersuchten IOLs deutlich gemildert werden, bei längeren Expositionszeiten war diese schützende Filterwirkung in Anwesenheit der gelben IOL signifikant stärker ausgeprägt als bei der konventionellen IOL. Dies ist insofern von Bedeutung, da VEGF-A bei der Entstehung der neovaskulären AMD eine entscheidende Rolle spielt und die Reduktion von VEGF-A im Glaskörper und der Netzhaut auch therapeutisches Ziel bei Patienten mit dieser Form der AMD ist [30].

Die Apoptose ist ein zellulärer, genetisch kontrollierter Mechanismus zur gezielten Selbsttötung [22]. Bei der Apoptose werden Tumorsuppressorproteine (TSP) und Apoptose initialisierende Caspasen aktiviert [22]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte in vitro gezeigt werden, dass die UV-Licht und Blaulicht absorbierenden Eigenschaften einer gelben Linse die Induktion von Apoptose im RPE vermindern konnte [29]. Außerdem reduzieren bestimmte antiapoptotisch wirksame Proteine, die durch kurzwelliges Licht verursachte Apoptose [31]. So konnte unsere Arbeitsgruppe in diesem Zusammenhang nachweisen, dass so auch das Gleichgewicht bestimmter Regulatoren der Apoptose durch die UV-Licht und Blaulicht absorbierenden Eigenschaften solcher IOLs stabilisiert werden kann [17].

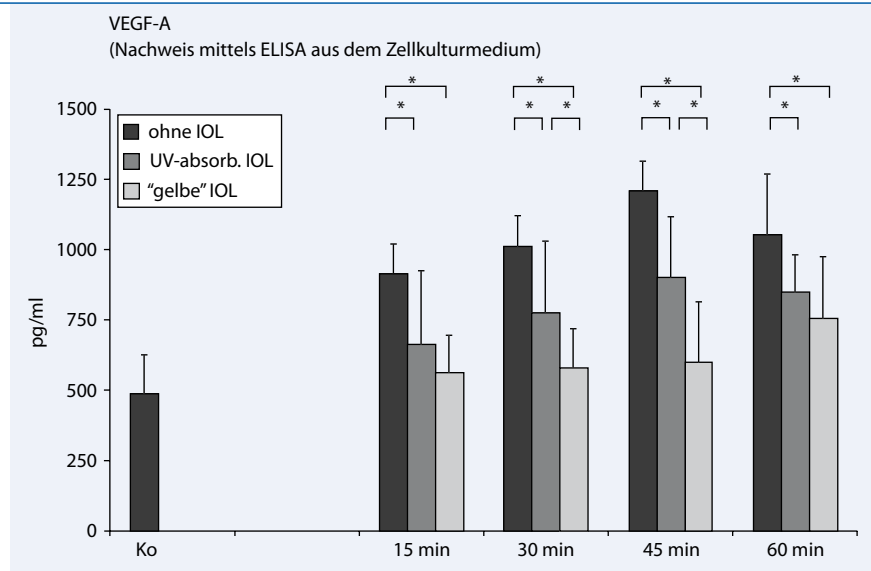


Abb. 5 ▲ Quantitativer Nachweis der VEGF-A-Sekretion der RPE-Zellen nach Bestrahlung (ELISA): ungefiltertes Licht („ohne IOL“), nach Filterung des Lichts mit einer UV-Licht absorbierenden IOL („UV-absorb. IOL“) oder einer UV- und Blaulicht absorbierenden IOL („gelbe“ IOL“) im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle (Ko). Statistisch signifikante Unterschiede in der VEGF-A-Sekretion sind durch „*“ gekennzeichnet

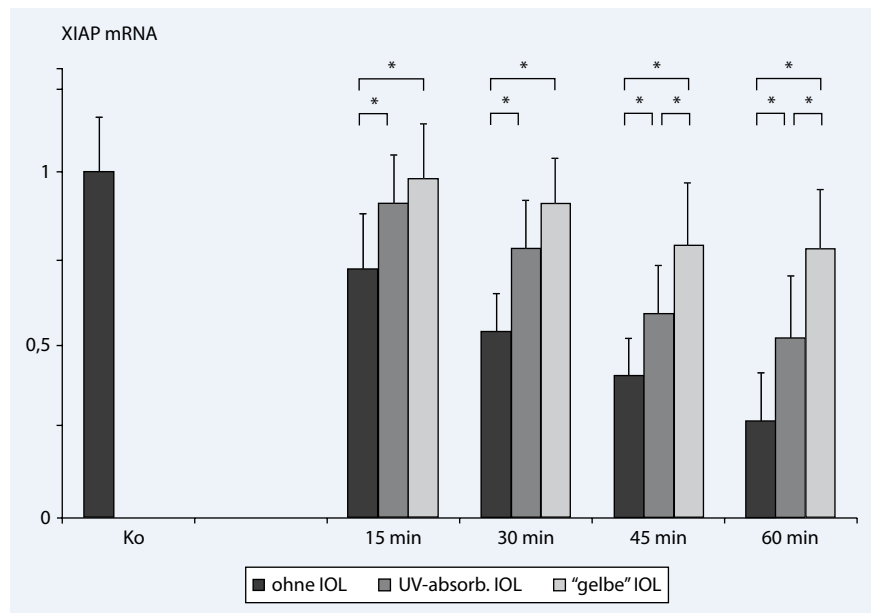


Abb. 6 ▲ Expression von XIAP-mRNA (RT-PCR) nach Bestrahlung der RPE-Zellen mit ungefiltertem Licht („ohne IOL“) und nach Filterung des Lichts mit einer „nur“ UV-Licht absorbierenden IOL („UV-absorb. IOL“) oder einer UV- und Blaulicht absorbierenden IOL („gelbe“ IOL“) im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle (Ko). Statistisch signifikante Unterschiede in der Expression sind durch „*“ gekennzeichnet

Eines dieser Proteine, durch deren Expression sich die Zelle wirkungsvoll vor apoptotischen Reizen schützen kann, ist das XIAP-Protein. XIAP gehört zur einer Gruppe von Proteinen, die als „inhibitors of apoptosis“ (IAPs) bezeichnet werden [8, 14]. IAPs inhibieren die Apoptose durch direkte Aktivitätshemmung der

Caspasen 3, 7 und 9, die auch als terminale Effektorproteasen des Zelltods bezeichnet werden. So konnte in vivo gezeigt werden, dass eine Überexpression von XIAP verletzte neuronale Zellen und Photorezeptorzellen vor zusätzlicher Zellschädigung bewahrt [27] und bei degenerativen Netzhauterkrankungen potenziell vor dem

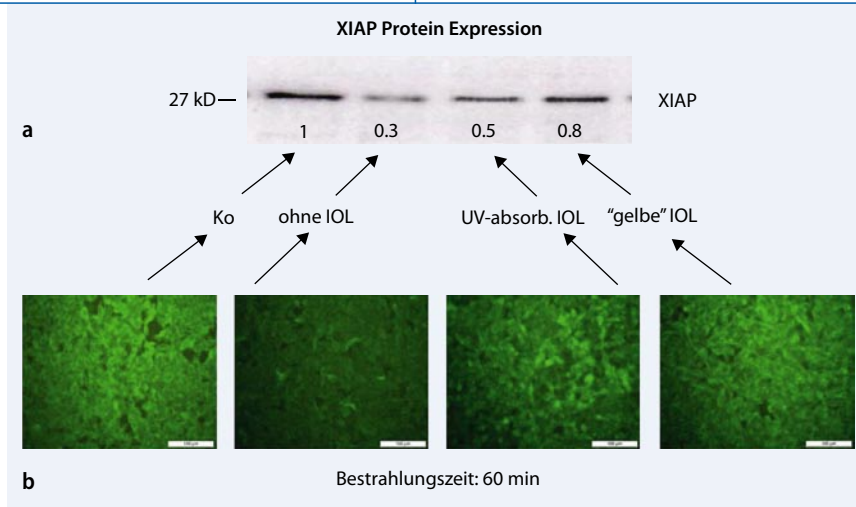


Abb. 7 ▲ XIAP-Protein-Expression in primären RPE-Zellen: **a** repräsentativer Westernblot und **b** immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von unbestrahlte Zellen (Ko), nach 60 min ungefilterter Lichtexposition (ohne IOL), in Gegenwart der UV-Licht absorbierenden IOL (UV-absorb. IOL) oder in Gegenwart der „gelben“, UV-Licht und Blaulicht absorbierenden IOL („gelbe IOL“)

Verlust von Photorezeptorzellen schützen kann [21, 27].

In unserer Studie führte die Bestrahlung zum einen zu einer signifikanten Induktion von Apoptose im RPE, zum anderen zu einer signifikanten Abnahme der Expression von XIAP. Die Zellen verlieren somit durch die vermehrte Bestrahlung einen wichtigen Schutzschild vor proapoptischen Reizen. Zwar konnte in unserem Versuchsaufbau die Abnahme von antiapoptotisch wirksamem XIAP durch die Filterwirkung beider untersuchter IOLs deutlich gemildert werden, aber bei längeren Expositionszeiten war dieser Effekt in Anwesenheit der UV-Licht und Blaulicht absorbierenden IOL signifikant stärker ausgeprägt als bei der konventionellen IOL.

Vermehrte Lichteinwirkung kann also potenziell Apoptose induzieren und Abwehrmechanismen der Zellen gegen diese Reize abgeschwächen. Im Gegensatz dazu ließen sich diese Zelltod induzierenden Mechanismen in unseren Versuchen durch die Filterwirkung der getesteten IOLs deutlich reduzieren.

Fazit für die Praxis

Die erhöhte Lichtexposition der Netzhaut nach Kataraktoperation ist ein Risikofaktor für die Entstehung und das Fortschreiten der AMD [7, 18]. In unserer Studie führte die Lichtexposition in vitro zur Induktion des an der Entstehung der neovaskularisationsbedingten AMD betei-

ligten Wachstumsfaktors VEGF. Außerdem kam es zu einer Abnahme des antiapoptotisch wirksamen XIAP-Proteins im RPE. Sowohl die Verwendung einer konventionellen IOL als auch die gelbe, zusätzlich blaues Licht filternde IOL führten zu einer Reduktion der phototoxischen Schädigung des RPE. Bemerkenswert ist, dass es insbesondere nach längeren Bestrahlungszeiten zur signifikanten Reduktion des Expressionsanstiegs von VEGF sowie zur Abnahme von XIAP kam, wenn das Licht mit einer gelben IOL anstelle einer konventionellen IOL gefiltert wurde. Diese Ergebnisse zeigen einen besseren Schutz der Netzhaut vor phototoxischer Zellschädigung mit gelben IOLs im Vergleich zu konventionellen IOLs im Zellkulturmodell. Nach heutigem Kenntnisstand ist die Implantation dieser Linsen v. a. bei Hochrisikopatienten mit AMD sinnvoll.

Korrespondenzadresse

Dr. M. Kernt

Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität

Mathildenstraße 8,
80336 München
Marcus.Kernt@
med.uni-muenchen.de



Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Algvere PV, Marshall J, Seregard S (2006) Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmol Scand* 84:4–15
2. Augustin AJ (2008) The physiology of scotopic vision, contrast vision, color vision, and circadian rhythmicity: Can These Parameters be Influenced by Blue-Light-Filter Lenses? *Retina*
3. Barishak YR (1960) In vitro behaviour of the pigmented cells of the retina and uvea of the adult human eye. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 38:339–346
4. Braunstein RE, Sparrow JR (2005) A blue-blocking intraocular lens should be used in cataract surgery. *Arch Ophthalmol* 123:547–549
5. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC et al (2004) Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 122:477–485
6. Congdon N, Vingerling JR, Klein BE et al (2004) Prevalence of cataract and pseudophakia/aphakia among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 122:487–494
7. Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE, Nondahl DM (2001) Sunlight and the 5-year incidence of early age-related maculopathy: the beaver dam eye study. *Arch Ophthalmol* 119:246–250
8. Devereaux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300–304
9. Ernest PH (2004) Light-transmission-spectrum comparison of foldable intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 30:1755–1758
10. Ferris FL 3rd, Fine SL, Hyman L (1984) Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch Ophthalmol* 102:1640–1642
11. Flood MT, Gouras P, Kjeldbye H (1980) Growth characteristics and ultrastructure of human retinal pigment epithelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19:1309–1320
12. Ham WT Jr, Mueller HA, Ruffolo JJ Jr et al (1984) Basic mechanisms underlying the production of photochemical lesions in the mammalian retina. *Curr Eye Res* 3:165–174
13. Hawkins BS, Bird A, Klein R, West SK (1999) Epidemiology of age-related macular degeneration. *Mol Vis* 5:26
14. Holcik M, Gibson H, Korneluk RG (2001) XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 6:253–261
15. Holz FG, Pauleikhoff D, Klein R, Bird AC (2004) Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am J Ophthalmol* 137:504–510
16. Katz ML (2002) Potential role of retinal pigment epithelial lipofuscin accumulation in age-related macular degeneration. *Arch Gerontol Geriatr* 34:359–370
17. Kernt M, Neubauer AS, Liegl R et al (2009) Cytoprotective effects of a blue light-filtering intraocular lens on human retinal pigment epithelium by reducing phototoxic effects on vascular endothelial growth factor-alpha, Bax and Bcl-2 expression. *J Cataract Refract Surg* 35:354–362
18. Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR (2004) The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 137:486–495
19. Knudtson MD, Klein R, Klein BE et al (2004) Location of lesions associated with age-related maculopathy over a 10-year period: the Beaver Dam Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2135–2142

20. Lawrence HM, Reynolds TR (1989) Erythrospiral phototoxicity associated with nonultraviolet-filtering intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 15:569–572
21. Leonard KC, Petrin D, Coupland SG et al (2007) XI-AP protection of photoreceptors in animal models of retinitis pigmentosa. *PLoS ONE* 2:e314
22. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323–331
23. Mainster MA, Sparrow JR (2003) How much blue light should an IOL transmit? *Br J Ophthalmol* 87:1523–1529
24. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
25. Nilsson SE, Sundelin SP, Wihlmark U, Brunk UT (2003) Aging of cultured retinal pigment epithelial cells: oxidative reactions, lipofuscin formation and blue light damage. *Doc Ophthalmol* 106:13–16
26. Norren DV, Vos JJ (1974) Spectral transmission of the human ocular media. *Vision Res* 14:1237–1244
27. Petrin D, Baker A, Coupland SG et al (2003) Structural and functional protection of photoreceptors from MNU-induced retinal degeneration by the X-linked inhibitor of apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2757–2763
28. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D et al (2004) Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 82:844–851
29. Rezaei KA, Gasyne E, Seagle BL et al (2008) AcrySof Natural filter decreases blue light-induced apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246:671–676
30. Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA (2005) Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 36:336–339
31. Sparrow JR, Cai B (2001) Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1356–1362
32. Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R et al (2004) Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 122:750–757
33. van den Berg TJ, Spekrijse H (1997) Near infrared light absorption in the human eye media. *Vision Res* 37:249–253
34. Weale RA (1988) Age and the transmittance of the human crystalline lens. *J Physiol* 395:577–587
35. Welge-Lüssen U, May CA, Eichhorn M et al (1999) AlphaB-crystallin in the trabecular meshwork is inducible by transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2235–2241
36. Witmer AN, Vreensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO (2003) Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 22:1–29
37. Yanagi Y, Inoue Y, Iriyama A, Jang WD (2006) Effects of yellow intraocular lenses on light-induced up-regulation of vascular endothelial growth factor. *J Cataract Refract Surg* 32:1540–1544

Eter, Nicole (Hrsg.)

Die altersabhängige Makuladegeneration

Bremen: UNI-MED Science 2009, 2., neubearb. Auflage, 128 S., (ISBN 978-3837411188), 19.00 EUR

Wenige Gebiete in der Ophthalmologie haben in den letzten Jahren und Monaten – sehr zur Freude unserer Patienten – einen ähnlich starken Wandel erlebt, wie die Behandlung der exudativen altersbedingten Makuladegeneration (AMD). Pharmakologische Therapieansätze, wie die intravitrealen Injektionen der VEGF-Hemmer Ranibizumab, Pegaptanib und Bevacizumab, bieten unseren Patientinnen und Patienten mit dieser quoad visum oft so dramatisch verlaufenden Erkrankung nicht nur die Option des Visuserhalts, sondern erstmals eine Aussicht auf tatsächliche Visusverbesserung. Mit dem Einzug der Pharmakologie in die Behandlung der AMD stehen wir in der Tat vor einem Paradigmenwechsel. Für alle die einen aktuellen Überblick über die Entstehung der AMD, ihr klinisches Bild und die Konzepte der Behandlung gewinnen wollen, kann das von Frau Prof. Eter aus Bonn herausgegebene und nun in der 2. Auflage erschienene Buch, sehr empfohlen werden. In übersichtlich gestalteten Kapiteln werden die gegenwärtig relevanten Aspekte zur AMD klar strukturiert dargestellt. Einen guten Einstieg in die Thematik bietet schon Kapitel 1 zur Ätiologie und Pathogenese. Hier erfährt der Leser und die Leserin in kurz gehaltenen Darstellungen alles Wesentliche zum Thema Genetik und relevante Aspekte der CNV Entstehung, die für das Verständnis neuer Therapieoptionen als Grundlage dienen können. Der überwiegende Teil dieses Buches beschäftigt sich jedoch mit der Therapie der AMD. Gerade in diesem Bereich sind in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte erzielt worden. Fast schon historisch wirken in diesem Kontext die Kapitel zur photodynamischen Therapie (PDT) und transpupillaren Thermotherapie (TTT), die in der Ära der pharmakologischen Therapiekonzepte bei AMD kaum noch klinisch-praktische Relevanz haben. Mit Blick auf mögliche Kombinationen von z.B. PDT und VEGF-Hemmern sollten diese Therapien vielleicht nicht in Vergessenheit geraten und haben so im Sinne der Vollständigkeit durchaus ihren Platz in einem solchen Buch. Ähnliche Gedanken hatte ich beim Lesen des Kapitels zur chirurgischen Therapie. Obwohl die Chirurgie bei der AMD Therapie fast vollständig von der Pharmakologie verdrängt wurde, empfand ich diesen Überblick dennoch sehr lesenswert. Vor allem da er nicht nur die Grenzen chirurgischer Verfahren bei der Therapie der AMD aufzeigt,

sondern auch mit dem abschließenden Verweis auf neue Ansätze im Bereich der Stammzellforschung die Notwendigkeit weiterführender Forschung unterstreicht. Ein eigenes Kapitel widmet sich ausschließlich der medikamentösen Therapie der AMD. Hier erhält der Leser und die Leserin in überschaubaren und gut verständlichen Texten einen substantiellen Überblick über Wirkmechanismen verschiedener Substanzen und kann sich über den aktuellen Stand der klinischen und experimentellen Forschung informieren. Abgerundet wird dieses gelungene Buch durch einen Beitrag zur ophthalmologischen Rehabilitation bei AMD, der aufzeigt, wie wir die Lesefähigkeit in manchen Fällen wiederherstellen und damit unseren Patienten einen Weg aufzeigen können, mit Ihrer Sehbehinderung im tägliche Leben besser umzugehen.

Zusammenfassend kann ich das Buch von Frau Prof. Eter und Mitautoren/innen allen sehr ans Herz legen, die sich in einem sehr gut überschaubaren Rahmen zu aktuellen Fragestellungen im Bereich AMD informieren wollen. Wer nicht lange schmökern will, kann mit Hilfe des sorgfältig erstellten Indexes punktuell sein Wissen vertiefen. Viel Spaß beim Lesen!

C. Haritoglou, München