

Morphologische Untersuchungen des vorderen Augenabschnitts der Ratte nach Langzeitbehandlung mit Timolol

E. Tamm, S. Jikihara und E. Lütjen-Drecoll

Anatomisches Institut, Lehrstuhl II der Universität Erlangen-Nürnberg (Direktor: Prof. Dr. E. Lütjen-Drecoll), Krankenhausstraße 9, D-8520 Erlangen

Morphological Investigation of the Anterior Segment of the Rat Eye After Long-Term Treatment with Timolol

Zusammenfassung. Um die morphologischen Grundlagen der Wirkung von β -Blockern auf das Kammerwasserzirkulationssystem zu untersuchen, wurde der zeitliche Verlauf der Veränderungen des vorderen Augenabschnitts von Ratten, nach 1–6wöchiger lokaler Behandlung eines Auges mit Timolol, untersucht und quantitativ histologisch ausgewertet. Zusätzlich wurde das Verhalten des Augendruckes in der Vorderkammer gemessen und Kunststoffausgüsse der Ziliarkörpergefäße hergestellt. Timolol in einer Dosierung von 50 μg führt zu einer signifikanten Senkung des intraokulären Drucks um 32,1% des Ausgangswerts. Morphologisch findet sich schon nach einwöchiger Behandlungsdauer eine deutliche Hyalinisierung des Stromas sowie eine Einengung der Kapillaren des Ziliarkörpers. Im Ziliarepithel kommt es nach längerer Behandlungsdauer zu einer Vakuolisierung beider Epithellagen. Im Abflußbereich können außer einer Vermehrung von Pigmentgranula, die mit einem Pigmentaustritt im Ziliarkörperbereich korreliert ist, keine Veränderungen nachgewiesen werden. Die Befunde weisen darauf hin, daß die im Rattenauge beobachtete intraokuläre Drucksenkung nach Gaben von Timolol auf Veränderungen im Bereich der Kammerwassersekretion beruht und dies möglicherweise durch eine primäre Beeinflussung des Gefäßsystems des Ziliarkörpers bedingt ist.

Summary. The purpose of this study was to investigate possible mechanisms responsible for the action of β -blockers on aqueous humor circulation. 5–6 months old rats were treated topically with timolol to one eye twice a day for 1–6 weeks and the morphological changes of the anterior segment were quantitatively evaluated by light microscopy. In addition intraocular pressure changes were documented and resin casts of the vessels of the ciliary body performed. Timolol in a dosage of 50 μg produced a statistically significant 32.1% decrease in IOP. The morphological findings observed after one week of treatment were a marked hyalinization of the stroma of the

ciliary processes and a narrowing of their capillaries. After 2 weeks a vacuolization of both epithelial cell layers was observed in the ciliary epithelium. With the exception of an increase in the amount of pigment granules, which was correlated with a loss of pigment granules within the ciliary body, no morphological changes were observed in the outflow pathways. Our results suggest that the observed decrease of IOP after treatment with Timolol is due to changes in the structures responsible for aqueous humor secretion. Since morphological changes in the ciliary process vessels precede those within the ciliary epithelium, we hypothesize that β -blockers may primarily be influencing ciliary vasculature in action to lower IOP.

Timolol, ein nicht selektiver β -adrenerger Antagonist ist heute eines der am häufigsten verwendeten antiglaukomatösen Pharmaka. Eine augeninnendrucksenkende Wirkung von Timolol konnte jedoch nicht nur bei Glaukompatienten, sondern auch bei gesunden Probanden sowie bei verschiedenen Versuchstieren nachgewiesen werden. Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, daß diese Wirkung hauptsächlich durch eine Senkung der Kammerwassersekretion hervorgerufen wird. Allerdings herrscht über den genaueren Wirkungsmechanismus immer noch Unklarheit. Um die morphologischen Grundlagen der Wirkung von Timolol auf das Kammerwasserzirkulationssystem zu untersuchen, wurde der zeitliche Verlauf der morphologischen Veränderungen im Bereich des vorderen Augenabschnitts von albinotischen und pigmentierten Ratten nach 1–6wöchiger lokaler Behandlung mit Timolol, in einer Dosierung von 50 μg , untersucht. Zusätzlich wurden erstmalig auch Druckmessungen in der Vorderkammer des Rattenauges nach Timololbehandlung durchgeführt.

Material und Methodik

Messung des intraokulären Drucks

Die Messungen erfolgten an 12 Sprague-Dawley-Albinoratten im Alter von 5–6 Monaten. Unter Narkose mit Trapanal® (Thiopental-Natrium 0,55 mg/100 g Körpergewicht, i.p.) wurde der intraokuläre

Druck mit Hilfe eines Statham Transducers (p23Db) in der Vorderkammer gemessen (Einzelheiten der Methode siehe [7]). Der Druckverlauf wurde über den Zeitraum von 1 h kontinuierlich registriert. Sechs der Versuchstiere blieben unbehandelt, während bei sechs Tieren ein Tropfen von 10 μ l einer 0,5%igen Timolollösung auf die Kornea des zu messenden Auges getropft wurde. Verwendet wurde Chibro-Timoptol[®] der Firma Chibret, München, mit 6,83 mg Timololhydrogenmaleat (entsprechend 5,0 mg Timolol) und 0,1 mg Benzalkoniumchlorid gelöst in 1000 g Pufferlösung. Es wurden jeweils die Mittelwerte des intraokulären Druckes der mit Timolol behandelten sowie der unbehandelten Versuchstiere ermittelt und miteinander verglichen (Student-*t*-Test, $p < 0,01$).

Histologische Untersuchung

Die linken Augen von 6 Sprague-Dawley-Albinoratten und von 8 Pigmentratten (BDE-HAN, Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover) wurden lokal zweimal täglich mit Timolol, entsprechend der in den Druckversuchen verwendeten Dosierung, behandelt. Die Zeitdauer der Behandlung betrug bei den Albinoratten eine, zwei und drei Wochen (jeweils $n = 2$), bei den Pigmentratten eine Woche ($n = 2$), vier Wochen und sechs Wochen (jeweils $n = 3$). Die morphologischen Strukturen der Versuchsaugen wurden mit den entsprechenden Strukturen unbehandelter Kontrolltiere ($n = 3$ bzw. 4) sowie derjenigen Tiere (jeweils $n = 2$), die mit der Trägersubstanz von Chibro-Timoptol[®] für 2 bzw. 6 Wochen behandelt worden waren, verglichen.

Die Augen der Versuchstiere wurden bei intaktem Kreislauf unter Narkose mit Trapanal[®] (s.o.) enukleiert, unter einem Stereomikroskop zerteilt und in der Fixationslösung nach Ito und Karnovsky [8] fixiert. Nach Nachfixierung in Osmiumlösung und Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe erfolgte die Einbettung in Epon. Mit Hilfe eines Ultramikrotoms der Firma Reichert wurden Semidünnschnitte des vorderen Augenabschnitts (jeweils zwei pro Quadrant) in sagittaler Richtung angefertigt. Die Schnitte wurden mit Methylenblau nach Richardson [13] sowie PAS angefärbt. Folgende Parameter wurden quantitativ ausgewertet:

- Die Verteilung und Intensität der Hyalinisierung des Stromas der Ziliarfortsätze. Die Größe und die Intensität der hyalinisierten Areale wurden semiquantitativ mit den Werten 0, +, ++ usw. bezeichnet und die gesamte Anzahl der Pluszeichen pro Schnitt für jedes Auge ermittelt (Mittelwert \pm SEM).
- Das Verhältnis der Fläche der angeschnittenen Kapillaren des Ziliarfortsatzes prozentual zu der Gesamtstromafläche. Es wurde mit einem Mop AMOI Morphometriegerät der Firma Kontron die Summe der Fläche der einzelnen Kapillarschnitte innerhalb des Stromas ermittelt und der prozentuale Anteil der Gefäßfläche zur Stromafläche für jedes Auge bestimmt (Mittelwert \pm SEM).

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Untersucht wurden 10 Sprague-Dawley-Albinoratten. Die linken Augen von fünf Tieren wurden 2 Wochen lang zweimal täglich mit Timolol behandelt. Unter einem konstanten Injektionsdruck von 120 mmHg erfolgte an den anästhesierten Tieren eine Kunststoffinjektion in die linke Arteria femoralis (Einzelheiten bei [4–6]).

Nach Aushärtung wurden die Augen enukleiert und in einer 33%igen KOH-Lösung mazeriert. Anschließend wurden die Präparate gründlich gespült, auf spezielle Halter befestigt, mit Gold bedampft und mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops Stereoscan der Firma Cambridge untersucht. Es wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM der Durchmesser der verschiedenen Gefäßabschnitte der Ziliarfortsätze [4] gemessen und die Werte der behandelten und unbehandelten Tiere untereinander verglichen (Student-*t*-Test, $p < 0,05$).

Ergebnisse

Messung des intraokulären Drucks

Der intraokuläre Druck aller Versuchstiere lag ohne Behand-

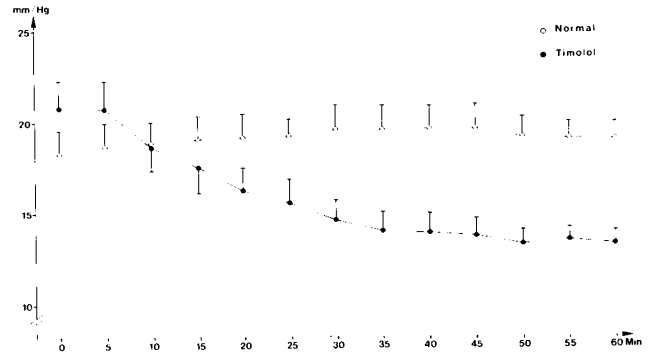


Abb. 1. Intraokulärer Druckverlauf bei unbehandelten Albinoratten (*offene Kreise*) sowie nach lokaler Gabe von 50 μ g Timolol (*gefüllte Kreise*). Die Kreise stellen Mittelwerte \pm SEM von jeweils sechs Versuchstieren dar. Nach Behandlung mit Timolol kommt es nach 20 min (*t*-Test, $p > 0,01$) zu einem statistisch signifikanten Abfall des intraokulären Drucks verglichen mit dem der normalen unbehandelten Tiere

lung im Durchschnitt bei $19,6 \pm 1,0$ mmHg ($M \pm SEM$). Schon nach 20 min war der intraokuläre Druck der mit Timolol behandelten Tiere signifikant niedriger im Vergleich mit den Werten der unbehandelten Kontrolltiere nach gleicher Meßdauer (*t*-Test, $p < 0,01$). Nach 50 min lag der intraokuläre Druck der behandelten Tiere im Durchschnitt bei $13,3 \pm 0,8$ mmHg ($M \pm SEM$). Dies entspricht einem Druckabfall von 32,1% (Abb. 1).

Histologische Untersuchung

Der vordere Augenabschnitt der Ratte ist in vieler Hinsicht dem des Primaten vergleichbar. Die Ziliarfortsätze bestehen ebenfalls nur aus einer pars plicata, die deutlich gegenüber der Iris abgegrenzt ist und einer im Gegensatz zum Primaten kurzen pars plana. Iridiale Fortsätze oder Ziliartaschen, wie sie z.B. beim Kaninchen vorkommen, fehlen. Im Kammerwinkel ist ein dem Schlemmschen Kanal vergleichbares Abflusssystem ausgebildet, dem ein lamelläres trabekelähnliches Bindegewebsgerüst vorgelagert ist [20]. Der Ziliarmuskel besteht nur aus einzelnen Fasern glatter Muskulatur (Abb. 2).

Schon nach einwöchiger Behandlung mit Timolol erkennt man deutliche morphologische Veränderungen im Ziliarkörper. Die an die Ziliarfortsätze angrenzende Stromalamelle ist hyalinisiert (PAS-positiv) und die Gefäße im Stroma sind eingeeengt.

Eine semiquantitative Auswertung zeigt, im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen, nach Behandlung eine Zunahme der Hyalinisierung um das nahezu Fünffache bei den Albinoratten und desgleichen, allerdings etwas schwächer ausgeprägt, bei den pigmentierten Ratten. Auch bei den über einen längeren Zeitraum behandelten Versuchstieren ist das Stroma der Ziliarfortsätze deutlich hyalinisiert (Abb. 3 und 4A).

Quantifiziert man die von den Gefäßen eingenommene Fläche, so ergibt sich bereits nach einwöchiger Timololbehandlung eine Verminderung der Gefäßfläche gegenüber den Werten beider Kontrollgruppen um Werte von etwa 50% bei beiden Spezies (Abb. 4B).

Das Ziliarepithel weist erst nach zweiwöchiger (Albino-

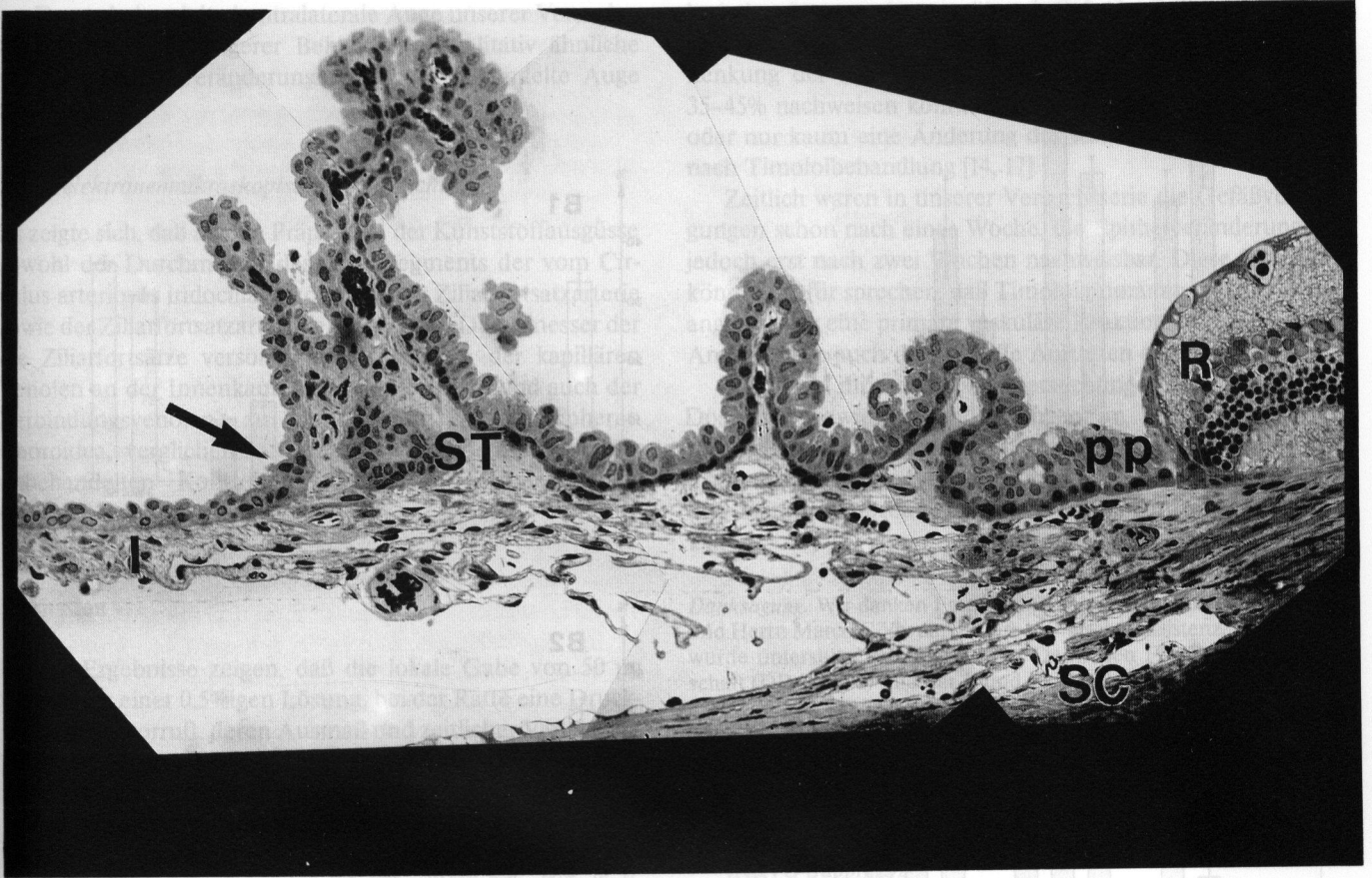


Abb. 2. Ziliarfortsatz einer normalen unbehandelten Albinoratte, Alter 24 Wochen. Der Übergang zwischen Iris (*I*) und der ausgedehnten pars plicata des Ziliarkörpers ist durch *Pfeil* markiert. Die pars plana (*pp*) ist sehr kurz. *R*, Retina; *SC*, Schlemmscher Kanal; *ST*, Stroma des Ziliarkörpers (Semidünnschnitt, Färbung nach Richardson, Vergr. 230fach)

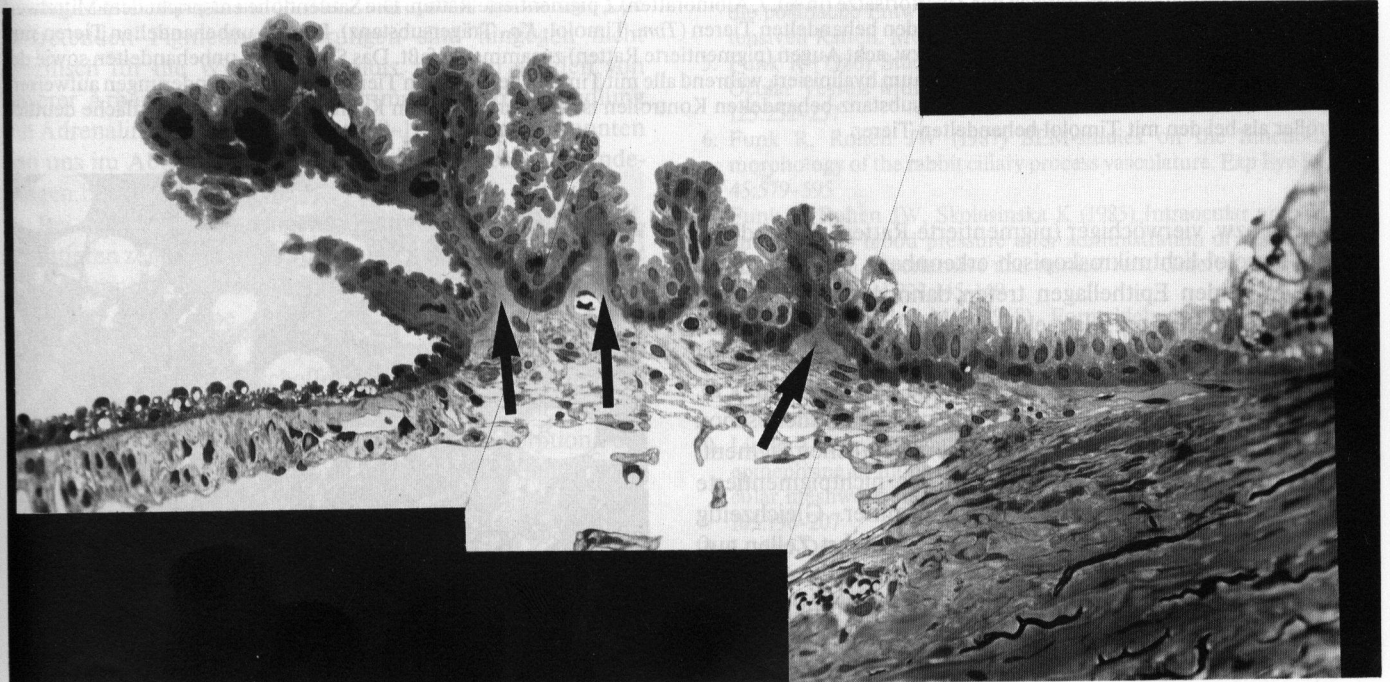


Abb. 3. Ziliarfortsatz einer Albinoratte nach 14tägiger lokaler Behandlung des Auges mit Timolol. Das Stroma des Ziliarkörpers ist besonders an der Basis der Fortsätze deutlich hyalinisiert (*Pfeile*). Das Ziliarepithel weist in diesem Teil der Zirkumferenz keine Vakuolisierung auf, während das Epithel der Iris deutlich verändert ist (Semidünnschnitt, Färbung nach Richardson, Vergr. 230fach)

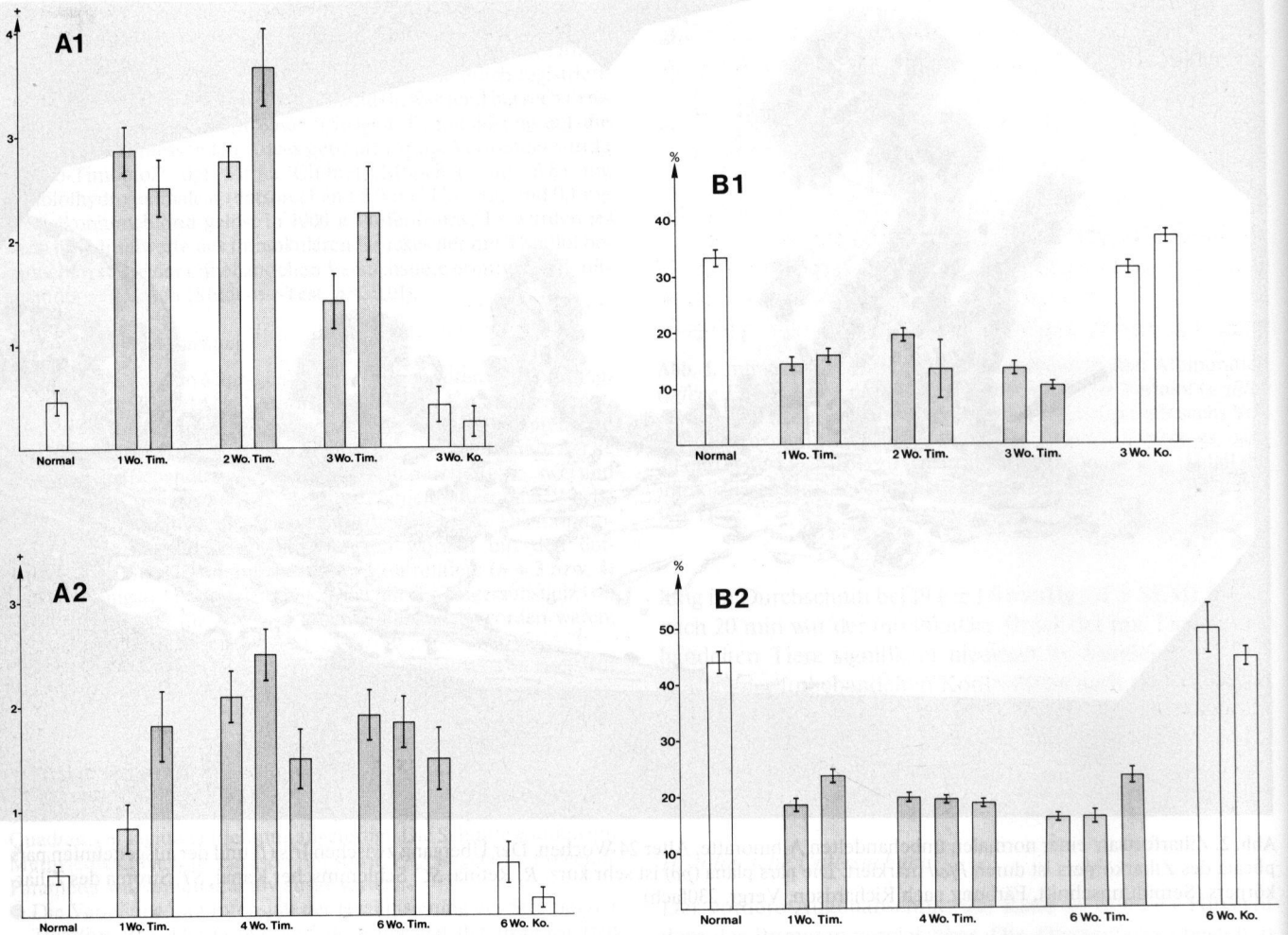


Abb. 4A, B. Semiquantitative Auswertung. **A** Hyalinisierung des Stromas der Ziliarfortsätze (Anzahl der + Wertungen); **B** Verhältnis der Kapillarfläche zur Stromafläche im Bereich der Ziliarfortsätze (in %). 1, Albinoratten, 2, pigmentierte Ratten. Die Säulenhöhe entspricht dem Mittelwert von 8 ausgewerteten Schnitten pro Auge bei den behandelten Tieren (Tim., Timolol; Ko., Trägersubstanz). Bei den unbehandelten Tieren sind die Werte von sechs Augen (Albinoratten) bzw. acht Augen (pigmentierte Ratten) zusammengefaßt. Das Stroma der unbehandelten sowie der mit Trägersubstanz behandelten Augen ist kaum hyalinisiert, während alle mit Timolol behandelten Tiere deutliche Veränderungen aufweisen. Bei den unbehandelten und den mit Trägersubstanz behandelten Kontrollen ist das Verhältnis von Kapillarfläche zur Stromafläche deutlich größer als bei den mit Timolol behandelten Tieren

ratten) bzw. vierwöchiger (pigmentierte Ratten) Behandlung mit Timolol lichtmikroskopisch erkennbare Veränderungen auf. In beiden Epithellagen treten dann deutlich sichtbare große Vakuolen auf. Im elektronenmikroskopischen Bild erkennt man, daß die Vakuolen von einer Membran umgeben sind und daher stark vergrößerte Vesikel darstellen (Abb. 5).

Bei den pigmentierten Ratten kommt es außerdem schon nach einer Woche Behandlung zu einem deutlichen Pigmentaustritt aus dem Pigmentepithel in das nichtpigmentierte Epithel sowie in die hintere Augenkammer. Gleichzeitig treten im Stroma und im Ziliarmuskel vermehrt Zellen auf, die den Klumpenzellen nach Koganei ähneln. Im Abflußbereich findet sich entsprechend eine Vermehrung von Pigmentgranula und zwar sowohl in den Trabekelzellen als auch in der Umgebung der Außenkanälchen. Ansonsten konnten wir, auch bei den über einen längeren Zeitraum behandelten Versuchstieren, im Abflußbereich histologisch keine Veränderungen nachweisen.

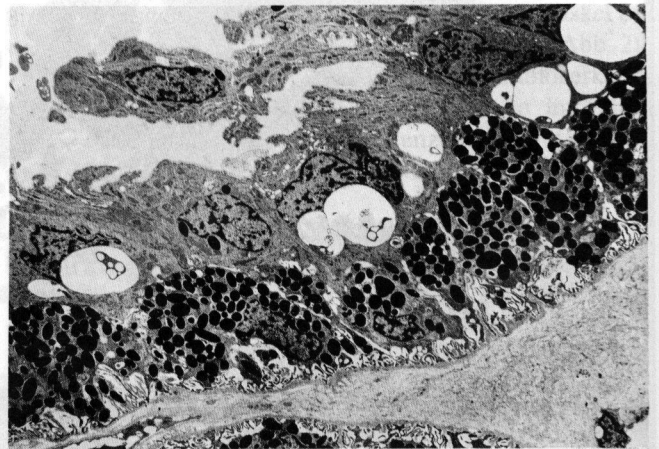


Abb. 5. Elektronenmikroskopische Aufnahme der beiden Ziliar-epithelschichten einer pigmentierten Ratte nach vierwöchiger Behandlung mit Timolol. Man sieht intrazellulär gelegene Vakuolen im nichtpigmentierten Ziliarepithel. Die Vakuolen sind von einer Membran umgeben und stellen stark vergrößerte Vesikel dar (Vergr. 3350fach)

Das unbehandelte kontralaterale Auge unserer Versuchstiere zeigte nach längerer Behandlung qualitativ ähnliche morphologische Veränderungen wie das behandelte Auge auf.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Es zeigte sich, daß an den Präparaten der Kunststoffausgüsse sowohl der Durchmesser des Mittelsegments der vom *Circulus arteriosus iridociliaris* kommenden Ziliarfortsatzarterie sowie der Ziliarfortsatzarteriole als auch die Durchmesser der die Ziliarfortsätze versorgenden Kapillaren, der kapillären Venolen an der Innenkante der Ziliarfortsätze und auch der Verbindungsvenolen zu den Venen der peripheren Choroidea, verglichen mit entsprechenden Präparaten der unbehandelten Kontrolltiere, signifikant eingeengt war ($p < 0,05$).

Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die lokale Gabe von 50 µg Timolol, in einer 0,5%igen Lösung, bei der Ratte eine Drucksenkung hervorruft, deren Ausmaß und zeitlicher Verlauf mit Versuchen an Primaten und anderen Versuchstieren, wie z.B. Hund und Katze, vergleichbar ist [3, 12, 15].

Die morphologisch nach einer Woche Behandlung mit Timolol am Ziliarkörper der Versuchstiere erkennbaren Veränderungen, wie die Einengung der Kapillaren der Ziliarfortsätze sowie die Hyalinisierung der sie umgebenden Stromalamelle, deuten auf eine Hyposekretion hin. Die nach längerer Behandlung beobachtbaren optisch leeren Vakuolen im Bereich des Ziliarepithels könnten zudem auf eine Störung des Flüssigkeitstransports durch das Ziliarepithel hinweisen. Die auftretenden Pigmentveränderungen sind hingegen nicht spezifisch für die Wirkung Timolols, sondern wurden von unserer Arbeitsgruppe auch bei Primaten nach Behandlung mit Adrenalin und Miotica gesehen [9–11]. Ansonsten konnten von uns im Abfließbereich keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden.

Bei den über einen längeren Zeitraum behandelten Versuchstieren zeigte auch das unbehandelte kontralaterale Auge gewisse morphologische Veränderungen auf. Dies könnte entweder durch eine systemische Absorption des Medikaments bedingt sein, das so auch das kontralaterale Auge erreicht, durch einen Wischeffekt oder durch einen zentralen Mechanismus, der ebenfalls durch eine systemische Absorption ausgelöst wird. Eine systemische Absorption des Timolols ist bei unserem Versuch auf Grund der Applikationsart des Medikaments, der Dosis und der Größe der Versuchstiere unvermeidbar. Selbst beim Menschen beeinflusst Timolol den intraokulären Druck bilateral nach unilateraler Behandlung [16, 18, 19].

Insgesamt weisen unsere Befunde somit darauf hin, daß Timolol in der von uns angewandten Dosierung bei der Ratte auf die Ziliarfortsätze und damit auf die Kammerwassersekretion, nicht hingegen auf den Kammerwasserabfluß wirkt. Diese Untersuchungen stimmen gut mit zahlreichen physio-

logischen Untersuchungen überein [1, 2, 12, 16], die als Ursache für die Senkung des intraokulären Drucks beim Primaten eine Senkung der Kammerwassersekretionsrate um Werte von 35–45% nachweisen konnten. Es zeigte sich hingegen keine oder nur kaum eine Änderung des Kammerwasserabflusses nach Timololbehandlung [14, 17].

Zeitlich waren in unserer Versuchsserie die Gefäßverengungen schon nach einer Woche, die Epithelveränderungen jedoch erst nach zwei Wochen nachweisbar. Diese Befunde könnten dafür sprechen, daß Timolol primär an den Gefäßen angreift. Für eine primäre vaskuläre Reaktion spricht unserer Ansicht nach auch das schnelle Auftreten des Druckabfalls.

Allerdings müssen noch Untersuchungen mit niedrigerer Dosierung sowie Quantifizierungen im elektronenmikroskopischen Bereich und außerdem Untersuchungen an Epithelzellen in der Gewebezucht durchgeführt werden, um den Wirkungsmechanismus von Timolol im einzelnen zu klären.

Danksagung. Wir danken Frau Karin Junge, Frau Christiane Wittek und Herrn Marco Gößwein für ihre technische Assistenz. Die Arbeit wurde unterstützt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DR 124/2-2) und der J. und F. Marohn-Stiftung.

Literatur

1. Bartels SP (1985) Effect of topical timolol on aqueous humor formation in conscious primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 (ARVO Suppl):232
2. Coakes RL, Brubaker RF (1978) The mechanism of timolol in lowering intraocular pressure. *Arch Ophthalmol* 96:2045–2048
3. Colasanti BK, Trotter RR (1981) Effects of selective beta 1- and beta 2-adrenoreceptor agonists and antagonists on intraocular pressure in the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20:69–76
4. Funk R (1985) Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die postnatale Entwicklung des Ziliarkörpers bei spontan hypertensiven Ratten. *Med Welt* 36:745–752
5. Funk R (1986) Studies on the Functional Morphology of Rat Ocular Vessels with Scanning Electron Microscopy. *Acta Anat* 125:252–257
6. Funk R, Rohen JW (1987) SEM-studies on the functional morphology of the rabbit ciliary process vasculature. *Exp Eye Res* 45:579–595
7. Funk R, Rohen JW, Skolasinska K (1985) Intraocular pressure and systemic blood pressure after administration of vasoactive substances in hypertensive and normal rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 223:145–149
8. Ito S, Karnovsky MJ (1968) Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. *J Cell Biol* 39:168A
9. Lütjen-Drecoll E, Kaufman PL, Eichhorn M (1986) Long-term timolol and epinephrine in monkeys. I. Functional morphology of the ciliary processes. *Trans Ophthalmol Soc UK* 105:180–195
10. Lütjen-Drecoll E, Kaufman PL (1986a) Long-term timolol and epinephrine in monkeys. II. Morphological alterations in trabecular meshwork and ciliary muscle. *Trans Ophthalmol Soc UK* 105:196–207
11. Lütjen-Drecoll E, Kaufman PL (1986b) Biomechanics of echothiophate-induced anatomic changes in monkey aqueous outflow system. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224:564–575
12. Miichi H, Nagataki S (1983) Effects of pilocarpine, salbutamol and timolol on aqueous humor formation in cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:1269–1275
13. Richardson KC, Jarett L, Finke EH (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 35:313

14. Sonntag JR, Brindley GO, Shields MB (1978) Effect of timolol therapy on outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17:293-296
15. Svec AL, Strosberg AM (1986) Therapeutic and systemic effects of ocular β -adrenergic antagonists in anesthetized dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:401-405
16. Yablonski ME, Zimmerman TJ, Waltman SR, Becker B (1978) A fluorophotometric study of the effect of topical timolol on aqueous humor dynamics. *Exp Eye Res* 27:135-142
17. Zimmerman TJ, Harbin R, Pett M, Kaufman HE (1977) Timolol and facility of outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16:623-624
18. Zimmerman TJ, Kaufman HE (1977a) Timolol, a β -adrenergic blocking agent for the treatment of glaucoma. *Arch Ophthalmol* 95:601-604
19. Zimmerman TJ, Kaufman HE (1977b) Timolol, dose response and duration of action. *Arch Ophthalmol* 95:605-607
20. Zypen E van der (1977) Experimental morphological study on structure and function of the filtration angle of the rat eye. *Ophthalmologica (Basel)* 174:285-298