

Originalarbeiten / Original Investigations

Über die Furacin-Retinopathie beim Kaninchen

I. Mitteilung

H. WEISS und BEATRIX KOSMATH

I. Universitäts-Augenklinik Wien (Abt. für exp. Ophthalmologie)
(Vorstand: Prof. Dr. K. Hruby)

Eingegangen am 12. Oktober 1970

On the Furacin-Retinopathy in Rabbits

I. Communication

Summary. A new substance for provocation of an experimental retinopathy in rabbits could be found. The changes of the pigment layer and the anomalies of the ERG are described in detail. The advantage of the method are the easy application, and a constant reproductivness, within a relatively short time.

Zusammenfassung. Eine neue Substanz zur Erzeugung einer experimentellen Retinopathie beim Kaninchen konnte gefunden werden. Die Veränderungen der Pigmentschicht sowie die im ERG beobachteten Anomalien werden näher beschrieben. Der Vorteil der Methode liegt in ihrer leichten Handhabung, verbunden mit einer konstanten Reproduzierbarkeit innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes.

Einleitung

Die experimentelle Retinopathie hat in den letzten Jahrzehnten als Modell zur Erprobung neuer Medikamente und zum Studium der Ätiologie bekannter Fundusveränderungen im Gefolge einer Langzeit-Therapie in der Humanmedizin (Potts, 1966) immer mehr an Bedeutung gewonnen. Im Tierversuch sind zur Erzeugung einer Retinopathie verschiedene Substanzen verwendet worden, die sich nach ihrem Angriffspunkt — Pigmentschicht oder Sinnesepithel — in zwei Gruppen trennen lassen. Zur ersten Gruppe ist das Chlorochin (Jess, 1921; Hobbs, 1959; François, 1967) zu rechnen, welches an Melanin gebunden primär zu Pigmentschädigungen und später zum Verlust der Melaningranula führt. Ähnlich bewirkt das Dithiozin aus der Reihe der Komplexbildner (Sorsby und Harding, 1962a) primär eine Degeneration des Tapetums. Zu den experimentell gebräuchlichsten retinotoxischen Substanzen gehören die Jodverbindungen. Natriumjodat, dessen Angriffspunkt ebenfalls das Pigmentepithel darstellt, bewirkt durch Enzymhemmung eine Nekrose des Sinnesepithels (Grignolo u. Mitarb., 1966; Orzalesi u. Mitarb., 1967; Sorsby und Harding, 1962b). Im Gegensatz zu den oben genannten Substanzen

schädigt das Natriumjodacetat zuerst die Stäbchen und Zapfen, vermutlich durch Zerstörung der Lipoproteine und Sehpigmente (Riehm, 1926; Sallmann, 1933; Noell, 1951, 1958; Matsusaka, 1956). Dabei dürfte die Hemmung der Atmung und Glykolyse im Vordergrund stehen (Bernardinis, 1963).

In den letzten Jahren wurde der Phenothiazin-Retinopathie (Meier-Ruge, 1967) besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Die Schädigung dürfte auch hier zunächst die Ellipsoide der Stäbchen und Zapfen betreffen und erst im weiteren Verlauf auf das Pigment übergreifen. Chloramphenicol (Wallenstein und Snyder, 1952) nimmt eine Sonderstellung ein, da hier nur Retinopathien aus der Humanmedizin bekannt sind. Tierexperimentell ist es nicht gelungen, ähnliche Veränderungen zu erzeugen, wenn man von einer Minderung der Milchsäuredehydrogenase absieht.

Ausgehend von der bekannten Abhängigkeit der Netzhaut vom Glucosestoffwechsel (Reading, 1963) haben wir uns die Aufgabe gestellt, eine Substanz mit folgenden pharmakologischen Wirkungen zu finden:

1. Blockierung des Glucosestoffwechsels.
2. Einfluß auf das nervöse Substrat.
3. Geringe allgemein-toxische Nebenerscheinungen bei längerer Verabreichung.

Nach Voruntersuchungen *in vitro* schien das *Furacin* die gewünschten Charakteristika zu besitzen. Furacin (5-Nitro-2-furfurolesemicarbazon, Fa. Fluka) ist ein gelblichweißes Pulver mit geringer Wasserlöslichkeit und einem Schmelzpunkt zwischen 227 und 241° C. Die LD 50 bei Mäusen nach einer einzelnen oralen Dosis beträgt im Mittel 550 mg/kg. Das Hauptsymptom bei der Bestimmung der LD 50 ist sowohl bei Ratten wie Mäusen eine starke Übererregbarkeit.

Pharmakologische Untersuchungen haben gezeigt, daß Furacin in einer Dosis, wie sie für einen bakteriostatischen Effekt (Dodd, 1946) *in vivo* erforderlich ist, von Tieren verschiedener Arten gut und ohne Nebensymptome toleriert wird. Bei Experimenten "in vitro" fand sich darüber hinaus eine durch Furacin bedingte Verminderung der Aktivität der Gewebsdehydrogenasen (Krantz u. Mitarb., 1945) sowie eine Hemmung des aeroben Glucosestoffwechsels (H. E. Paul u. Mitarb., 1952) verschiedener Gewebe des Säugetierorganismus. Veränderungen im Glucosestoffwechsel durch das Semicarbazon wurden besonders an Testes von Ratten nachgewiesen (H. E. Paul u. Mitarb., 1953). Hier stand neben einer verminderten Glucoseverwertbarkeit die Hemmung der Pyruvatatmung im Vordergrund (Featherstone, 1955). Die anaerobe Glykolyse konnte durch Furacin nicht beeinflußt werden.

Die folgenden Experimente wurden in Versuche "*in vitro*" und Versuche "*in vivo*" unterteilt.

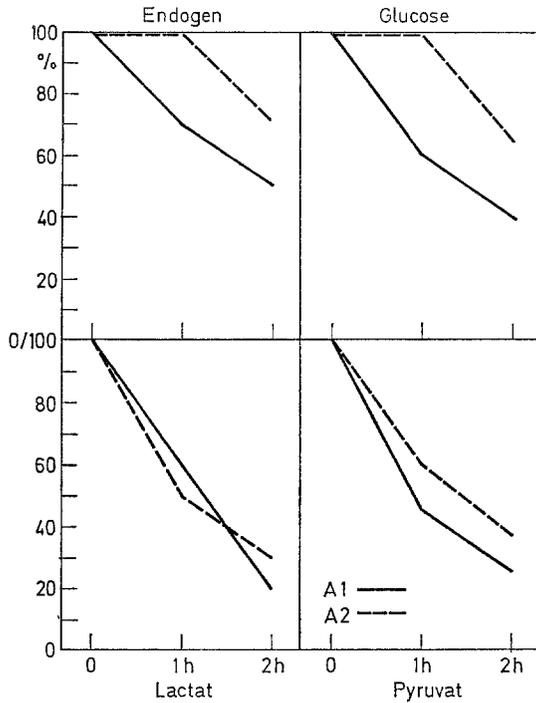


Abb. 1. Wirkung des Furacins auf den O_2 -Verbrauch verschiedener Netzhautareale des Schweineauges. Furacin-Konzentration: 140 mg/l (7×10^{-4} mol); $Q O_2$ in Prozent des Kontrollwertes angegeben

1. Versuche *in vitro*

Material und Methodik

Die Untersuchungen wurden an Schweine- und Kaninchennetzhäuten ausgeführt. Die Schweineaugen kamen 2—3 Std nach Tötung der Tiere zur Aufarbeitung. Nach Abtragen der Hornhaut und Entfernung von Iris, Linse und Glaskörper wurde ein zentraler Netzhautanteil (11 mm \varnothing) durch Ausstanzen gewonnen. Der Opticuseintritt bestimmte die periphere Begrenzung. Dieses Areal bezeichnen wir im folgenden mit A1, die restliche Netzhaut mit A2. Die Kaninchennetzhäute kamen nach Tötung der Tiere *in toto* zur Untersuchung.

Als Nährlösung verwendeten wir in beiden Versuchsreihen eine Bicarbonat-Ringer-Lösung nach Kisch. Die Messungen erfolgten mit der Warburg-Methode. Das Zentralgefäß wurde mit einer 10%igen Kalilauge beschickt. Die Konzentration der Substrate betrug einheitlich 0,02 mol pro Liter. Das Furacin lag in einer 7×10^{-4} molaren Lösung vor, der O_2 -Verbrauch wurde auf 100 mg Feuchtgewicht berechnet. Die Versuchstemperatur betrug $37^\circ C$ bei einer Temperaturlausgleichsperiode von 10 min und einer Schüttelfrequenz von 100/min. Das Flüssigkeitsvolumen im Haupttrog betrug 2 ml. Als Gasphase diente in allen Versuchen Luft. Die einzelnen Werte geben das durchschnittliche Untersuchungsergebnis von je 10 Augen wieder.

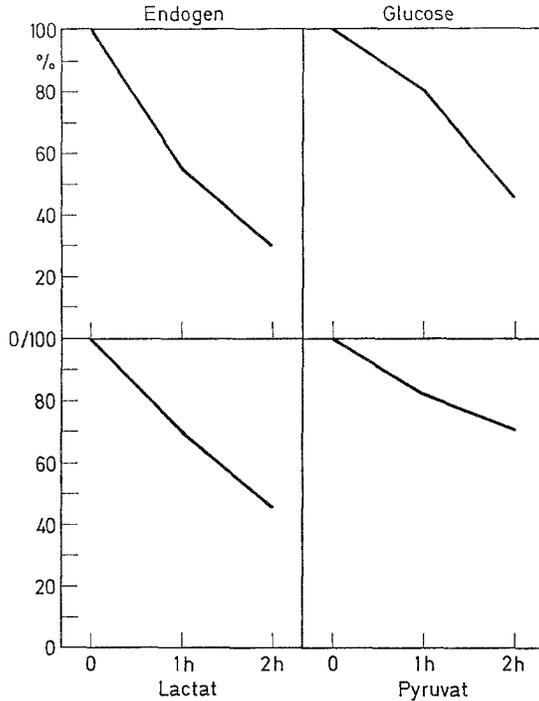


Abb. 2. Wirkung des Furacins auf den O₂-Verbrauch der Kaninchennetzhaut. Furacin-Konzentration: 140 mg/l (7×10^{-4} mol); Q O₂ ist in Prozent des Kontrollwertes angegeben

Ergebnisse

Bei Schweineaugen ist sowohl in A1 wie in A2 der hemmende Effekt des Furacins stärker bei Veratmung von Pyruvat und Lactat als bei Veratmung von Glucose und endogenem Substrat (Abb. 1).

In A2 war bei Veratmung von Glucose und endogenem Substrat eine latente Periode von einer Stunde notwendig, ehe der Hemmeffekt des Furacins auftrat. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von H. E. Paul u. Mitarb. (1952) an der Gehirnrinde. Bei A1 war die Hemmung von Anfang an so stark ausgeprägt, daß sie bereits nach 1 Std die Höhe des 2 Std-Wertes von A2 erreichte. Bei Veratmung von Glucose bzw. endogenem Substrat erfuhr A1 nach 2 Std eine ca. doppelt so hohe Atmungshemmung wie A2. Bei Lactat und Pyruvat war der Unterschied zwischen A1 und A2 gering oder nahezu aufgehoben (Abb. 2).

Am Kaninchenauge ist die Hemmung des O₂-Verbrauches am stärksten bei Veratmung des endogenen Substrates und nimmt von Glucose

über Lactat zu Pyruvat ab. Eine latente Periode konnte hier nicht beobachtet werden.

2. Versuche *in vivo*

Material und Methodik

Hier wurden 60 Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 3—4 kg verwendet. Die Tiere bekamen an 20 aufeinanderfolgenden Tagen je 1 ml einer 10%igen Furacinlösung pro kg subcutan unter die Rückenhaut injiziert. Zur Herstellung der Furacinlösung wurden eine 4% wäßrige Gummiarabicum-Lösung nach 1 Std durch eine Glassinternutsche G₂ abgesaugt, 100 mg Furacin pro ml zugesetzt und mit einem Elektrorührer verrührt. (Von einer einfachen Beigabe des Furacins zum Trockenfutter haben wir abgesehen, um eine ausreichende Ernährung mit Grünfutter zu gewährleisten.) Die Menge des injizierten Furacins wurde entsprechend den Gewichtsveränderungen dosiert. Folgende Kontrolluntersuchungen wurden zu Beginn des Versuches, nach 10, 20 Tagen sowie 20 Tage nach Absetzen des Furacins durchgeführt:

1. Bestimmung des Gewichtes.
2. Fundusuntersuchungen.
3. ERG: Erste Versuchsanordnung: die Ableitung des ERG erfolgte mittels eines modifizierten Schwarzer-EEG-Apparates, registriert wurde im Direktschreibverfahren, Papiergeschwindigkeit 50 mm/sec, bei einer Zeitkonstante von 0,3 sec, die Verstärkung für 100 μ V betrug 6 mm. Nach Pupillenerweiterung mit „Mydriaticum Roche“ wurden die Tiere 30 min lang dunkeladaptiert und zur Ruhigstellung mit 1,5—1,8 ml Nembutal i.v. narkotisiert. Als Elektroden kamen abgeänderte Flügelnadeln so zur Anwendung, daß die aktive Elektrode subconjunctival, die indifferente Elektrode subcutan über der Nase und die Erdungselektrode zwischen den beiden Blättern des gleichseitigen Ohres zu liegen kam. Als Lichtreiz diente bei Raumrotlicht ein stets frisch aufgeladener Elektronenblitz. Das Blitzgerät wurde in 30 cm Entfernung vom Auge so angebracht, daß der Lichtkegel direkt auftraf. In der *ersten* Untersuchungsreihe betrug der Abstand zwischen den einzelnen Lichtreizen 3 min. Die Werte der *a*- und *b*-Wellen wurden aus jeweils 5 aufeinanderfolgenden Werten ermittelt. Zweite Versuchsanordnung: Dabei wurden 15 Lichtimpulse im Abstand von jeweils 10 sec ausgelöst. Die Verstärkung für $V = 100 \mu$ V betrug hier 18 mm. Die erste Antwort einer Lichtblitzserie wurde nicht verwertet. Die Höhe der *b*-Welle wurde vom Fußpunkt aus bestimmt, der bei erhaltener *a*-Welle zugleich dem tiefsten Punkt der *a*-Welle entsprach („Amplitude b totale“, E. Schmöger, 1959).

Ergebnisse

1. Gewichtskontrolle

Während der Injektionsserie zeigte sich eine durchschnittliche Gewichtsabnahme von 15%. Nach Absetzen des Furacins erholten sich die Tiere innerhalb von 10 Tagen.

2. Funduskontrolle

Zwischen dem 6. und 10. Tag traten die ersten Netzhautalterationen in Form von lacksprungartigen Veränderungen unterhalb des Marksegels im Bereich der Sehleiste auf. Am Rande dieser Veränderungen

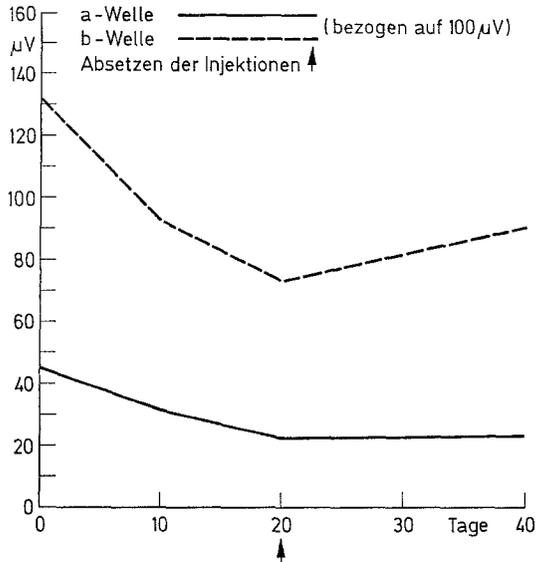
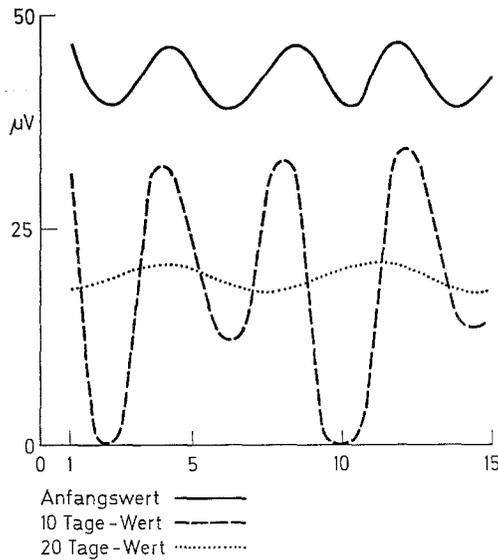
fand sich zarter Pigmentstaub. Die radiär zur Peripherie führenden mehr oder weniger stark ausgeprägten Pigmentstraßen blieben unverändert. Zwischen dem 10. und 20. Tag entstanden aus den zarten Pigmentanhäufungen dicht gelagerte und verschieden verästelte Pigmentverklumpungen, ähnlich den bekannten „Knochenkörperchen“. In dieser Phase war der Prozeß noch ausschließlich auf die Schleiste und ihre unmittelbare Umgebung beschränkt. Nach dem 20.—30. Tag konnte man ein Übergreifen der Pigmentverschiebungen auf die Peripherie beobachten. Die Pigmentstreifen waren durch fein verästelte Pigmentflecken miteinander verbunden, ihre Grenzen konfluieren, so daß ein netzartiges, gesprenkeltes Aussehen resultierte. Glitzernde Einlagerungen bei gleichzeitig kleinflächiger Depigmentierung lassen sich vermutlich auf eine Speicherung stark lichtbrechender Substanzen zurückführen. Am 40. Tag zeigte der Fundus keine weiteren Veränderungen des ophthalmoskopischen Bildes. Die beschriebenen Veränderungen fanden sich stets symmetrisch an beiden Augen und waren bei dunkelpigmentierten Tieren auffälliger als bei Tieren mit geringer Pigmentation. Papille, Marksege und Gefäße waren während der gesamten Beobachtungszeit unauffällig. Gefäßneubildungen traten nicht auf. Die Augen der Versuchstiere zeigten äußerlich keine entzündliche Reaktion, die brechenden Medien blieben klar.

3. ERG

Erste Versuchsanordnung. Dabei konnte eine Verringerung der Höhe der *a*- und *b*-Welle registriert werden (Abb. 3).

Am 10. Injektionstag betrug die Senkung der *a*- und *b*-Welle bereits 30%, am 20. Tag ca. 50%. 20 Tage nach Absetzen des Furacins ergab die Kontrolle für die *a*-Welle die gleichen Werte wie zu Ende der Injektionsserie. Die *b*-Welle kehrte zum 10 Tage-Wert zurück. Nach dem 10. Versuchstag erwies sich die Errechnung des Mittelwertes als ungenau; die Reizantworten zeigten nämlich zu starke Schwankungen um den Mittelwert, so daß hinsichtlich der Schädigung nur eine summarische quantitative Aussage möglich war. Grad und Art der Schädigung waren größer, als durch den Mittelwert allein ausgedrückt werden konnte. So kam es nicht nur zu einer Herabsetzung der maximalen Antwort von *a*, sondern in der Folge zum Auftreten von verminderten bis aufgehobenen Reaktionen auf den Lichtimpuls. Die Differenz zwischen Maximal- und Minimalbeantwortung nahm im Laufe des Experimentes zu, wobei gleichzeitig die Minimalwerte zu überwiegen begannen. Bei der *b*-Welle fanden sich ähnliche Bilder, jedoch in geringerer Größenordnung.

Zweite Versuchsanordnung (15 Einzelblitze in jeweils 10 sec Abstand). Hier zeigt die *a*-Welle beim unbehandelten Tier nur geringe Schwankungen der Minimal- und Maximalwerte (Abb. 4).

Abb. 3. Veränderungen der a - und b -Welle nach Furacingabe am KaninchenaugeAbb. 4. Schematische Darstellung der α -Wellenamplitude in μV im Verlauf des Versuchs

Nach 10 Tagen traten starke Schwankungen auf. Häufig war die α -Welle erloschen. Der errechnete Mittelwert entsprach dem der ersten Versuchsanordnung und lag ca. 30% unter dem Ausgangswert. Der

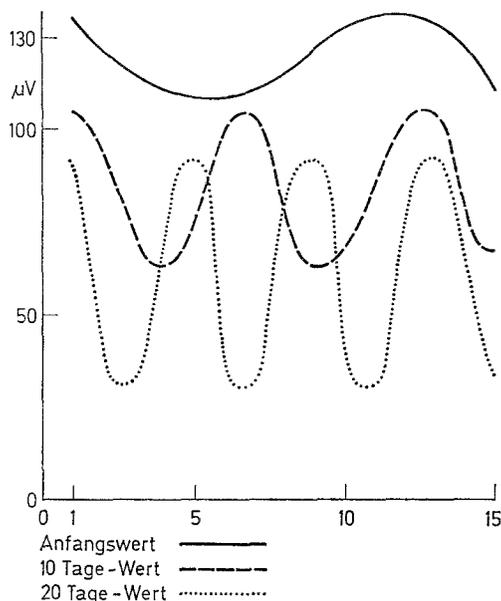


Abb. 5. Schematische Darstellung der b -Wellenamplitude in μV im Verlauf des Versuchs

tiefste Mittelwert wurde nach 20 Tagen erreicht. Die Amplitude der a -Welle zeigte zu diesem Zeitpunkt auffallend geringe Schwankungen. Bei der Auswertung der b -Welle (Abb. 5) fanden sich ebenfalls zu Beginn des Experimentes die höchsten Werte mit geringer Schwankungsbreite (Abb. 5).

Nach 10 Tagen Behandlung mit Furacin kam es zu starken Amplitudenschwankungen von b , deren Frequenz zunahm. Am Ende des Versuches wurden die niedrigsten Mittelwerte der b -Welle registriert. Gleichzeitig traten nicht nur die stärksten Schwankungen zwischen Minimal- und Maximalantworten auf, auch ihre Häufigkeit nahm weiter zu. Bei einigen Tieren fanden wir nach 20 Tagen bei verlängerter Refraktionszeit einen Doppelgipfel der b -Welle.

Aus unseren Untersuchungsergebnissen in vitro und in vivo darf angenommen werden, daß die am Kaninchenauge gefundenen Veränderungen nach Injektion von Furacin vorwiegend auf eine graduelle Blockierung des aeroben Kohlenhydratstoffwechsels zurückzuführen sind.

Infolge dieser Netzhautschädigung finden wir zwar ein reduziertes, aber noch erhaltenes ERG.

Hier haben wir es nicht nur mit einer Beeinträchtigung der Reaktionsfähigkeit zu tun, vielmehr handelt es sich um eine Inkonstanz der Beantwortung einzelner Reize in einer bestimmten zeitlichen Reihenfolge.

Wir führen diesen Befund auf eine erhöhte Ermüdbarkeit bzw. verminderte Regenerationsfähigkeit der Netzhaut zurück.

Literatur

- Bernardinis, E. D.: Ricerche sperimentale sul metabolismo della retina in vivo. *Rass. ital. Ottal.* **22**, 345 (1953).
- Dodd, M. C.: The chemotherapeutic properties of 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone (Furacin). *J. Pharmacol. exp. Ther.* **86**, 311 (1946).
- Featherstone, R. M., Nelson, W. O., Waldan, F., Marberger, E., Boccabella, A., Boccabella, R.: Pyruvate oxydation in testicular tissues during furadroxyl-induced spermatogenic arrest. *Endocrinology* **56**, 727 (1955).
- François, J., Maugdal, M. C.: Experimentally induced chloroquine retinopathy in rabbits. *Amer. J. Ophthalm.*, Ser. 3, **64**, 88 (1967).
- Grignolo, A., Orzalesi, N., Calabria, G. A.: Studies on the fine structure and the rhodopsin cycle of the rabbit retina in experimental degeneration induced by sodium iodate. *Exp. Eye Res.* **5**, 86 (1966).
- Hobbs, H. E., Sorsby, A., Freedman, A.: Retinopathy following chloroquine therapy. *Lancet* **1959 II**, 478.
- Jess, A.: Die Gefahren der Chemotherapie für das Auge, insbesondere über eine das Sehorgan schwer schädigende Komponente des Chinins und seiner Derivate. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthalm.* **104**, 48 (1921).
- Kisch, B.: Normale Atemwerte frischer tierischer Gewebe. *Biochem. Z.* **271**, 420 (1934).
- Krantz, John C., Jr., Evans, W. E., Jr.: A contribution to the pharmacology of 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **85**, 324 (1945).
- Matsusaka, T.: Etude histochimique de la rétine: L'effet de l'acide iodoacétique sur le glycogène et l'acide nucléinique du sègment interne des cellules visuelles de la rétine. *Ann. Oculist. (Paris)* **188**, 1071 (1956).
- Meier-Ruge, W.: *Medikamentöse Retinopathie*. Stuttgart: Thieme 1967.
- Noell, W. K.: Effect of iodoacetate on the vertebrate retina. *J. cell. comp. Physiol.* **37**, 183 (1951).
- Studies on visuell cell viability and differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **74**, 337 (1958).
- Orzalesi, N., Grignolo, A., Calabria, G. A.: Experimental degeneration of the rabbit retina induced by sodium-fluoride. *Exp. Eye Res.* **6**, 165 (1967).
- Paul, H. E., Paul, M. F., Kopko, F.: Effect of furacin (5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone) on the in vitro metabolism of mammalian tissues. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **79**, 555 (1952).
- — — Bender, R. C., Everett, G.: Carbohydrate metabolism studies on the testis of rats fed certain nitrofurans. *Endocrinology* **53**, 585 (1953).
- Potts, A. M.: Agents which cause pigmentary retinopathy. *Symp. on Prolonged Pharmakotherapy and Eye*, Buffalo (1966).
- Reading, H. W.: Metabolism of endogenous substrate in the retina. *Nature (Lond.)* **199**, 817 (1963).
- Riehm, W.: Augenschädigung nach Septojodinjektion. *Münch. med. Wschr.* **73**, 590 (1926).
- Sallmann, L.: Über Netzhautschädigung durch Salze der unterjodigen, unterbromigen und unterchlorigen Säure. *Z. Augenheilk.* **80**, 342 (1933).
- Sorsby, A., Harding, R.: Experimental degeneration of the retina. VIII. Dithizone retinopathy. *Vision Res.* **2**, 149a (1962).

- Sorsby, A., Harding, R.: Experimental degeneration of the retina. X. The retinotoxic reaction of sodium periodate and iodine pentoxide and the inefficacy of other oxydizing agents. *Vision Res.* **2**, 327 (1962).
- Schmöger, E.: Klinische Elektro-Retinographie. *Der Augenarzt*, Bd. II, S. 785. Stuttgart: Emke 1968.
- Wallenstein, L., Snyder, J.: Neurotoxic reaction to chloromycetin. *Ann. intern. Med.* **36**, 1526 (1952).

Dr. H. Weiß
Dr. B. Kosmath
I. Universitäts-Augenklinik
Spitalgasse 2
A-1090 Wien IX