

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wachstumsfaktorinhibitoren zur pharmakologischen
Wundmodulation nach filtrierender Glaukomchirurgie am
in-vitro-Beispiel des Tenonfibroblasten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tobias Marcus Philipp Hager

aus Saarbrücken

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. P.-W. Rieck

2. Prof. Dr. med. G. K. Krieglstein

3. Prof. Dr. med. C. Erb

Datum der Promotion: 19.09.08

Wir können das Unbekannte nur am Bekannten messen.

(„Der Seewolf“, Jack London)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Definition des Glaukoms	9
1.2. epidemiologische Bedeutung des Glaukoms	9
1.3. Behandlung des Glaukoms durch Trabekulektomie	9
1.4. Anatomie und Filtrationsverhalten des Filterkissens	11
1.4.1. anatomischer Aufbau eines filtrierenden Filterkissens	11
1.4.2. Aufbau eines nicht-filtrierenden Filterkissens	12
1.5. Wachstumsfaktoren	13
1.5.1. Definition	13
1.5.2. wichtige Wachstumsfaktoren nach Trabekulektomie	13
1.5.2.1. Quellen von Wachstumsfaktoren im Auge	13
1.5.2.2. PDGF	14
1.5.2.3. TGF-beta	14
1.5.3. Wachstumsfaktorrezeptoren	15
1.5.3.1. Tyrosinkinaserzeptor	15
1.5.3.2. TGF-beta-Rezeptor	16
1.6. vereinfachtes Modell der Wundheilung nach Trabekulektomie	17
1.7. medikamentöse Beeinflussung der Wundheilungsreaktion nach Trabekulektomie	19
1.7.1. Antifibrotika	19
1.7.1.1. bisher verwendete Antifibrotike	19
1.7.1.2. 5-Fluouracil (5-FU)	19
1.7.2. Wachstumsfaktorinhibitoren	21
1.7.3. untersuchte Medikamente	21
1.7.3.1. Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon)	22
1.7.3.2. Suramin (hexasulfonierter Naphthylurea-Bestandteil)	23
1.8. FCS als Modell eines Wachstumsfaktorgemischs	24
2. Ziel der experimentellen Arbeit	24

3. Material und Methoden	26
3.1. Laborinventar	26
3.1.1. Gefäße	26
3.1.2. Instrumente	26
3.1.3. Geräte	26
3.2. Verbrauchslösungen	27
3.3. Medikamentenlösungen	28
3.4. Primärkultur	28
3.4.1. Probengewinnung	28
3.4.2. Anlegen der Primärkultur	29
3.4.3. Passage der Primärkultur	29
3.4.4. Einfrieren von Zellen	30
3.5. Zytotoxizitätsbestimmung mit dem Trypanblaufärbetest	30
3.6. Chemotaxis im Transwell Assay System	31
3.7. Proliferationsbestimmung durch Zellzählung	32
3.8. Bestimmung der Fibronectinexpression durch ELISA	32
3.9. Transdifferenzierung und Immunocytochemie	33
3.10. Statistik	34
4. Ergebnisse	34
4.1. Zytotoxizität	34
4.2. Migrationsverhalten im Transwell Assay System	35
4.3. Proliferationsbestimmung durch Zellzählung	36
4.3.1. Kontrollgruppe	36
4.3.2. Suramin	38
4.3.3. Genistein	40
4.3.4. 5-FU	42
4.4. Fibronectin-ELISA	43
4.4.1. Vorversuch	43
4.4.2. Suramin	43

4.4.3. Genistein	44
4.4.4. 5-FU	45
4.5. Immuncytochemie	47
4.6. photographische Dokumentation der Tenonfibroblasten in den einzelnen Versuchen	48
4.6.1. Proliferationsverhalten der Tenonfibroblasten	49
4.6.2. Zellmorphologie der Tenonfibroblasten im Proliferationsversuch	51
4.6.3. Transwellbilder	53
4.6.4. Zellmorphologie der Transwellfibroblasten	54
4.6.5. Immuncytochemie	56
5. Diskussion	59
5.1. Suramin	59
5.1.1. Zytotoxizität	59
5.1.2. Proliferation	59
5.1.3. Migration	60
5.1.4. Extrazellulärmatrixproduktion	61
5.1.5. Transformation	61
5.1.6. bisherige Erfahrungen mit Suramin	62
5.2. Genistein	62
5.2.1. Zytotoxizität	62
5.2.2. Proliferation	63
5.2.3. Migration	64
5.2.4. Extrazellulärmatrixproduktion	64
5.2.5. Transformation	64
5.2.6. bisherige Erfahrungen mit Genistein	65
5.3. 5-FU	65
5.3.1. Zytotoxizität	65
5.3.2. Proliferation	65
5.3.3. Migration und Extrazellulärmatrixproduktion	66
5.3.4. Transformation	66
5.3.5. Vergleich der verwendeten Medikamente mit 5-FU	66

5.4. Problem der Voraktivierung des Tenonfibroblasten	67
5.5. Einschränkung des verwendeten Modells	69
6. Zusammenfassung	70
7. Bibliographie	72
8. Abkürzungsverzeichnis	82
9. Appendix	83
Lebenslauf	83
Selbstständigkeitserklärung	85
Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluouracil
α -SMA	α -Aktin des glatten Muskels
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basophiler Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BSA	bovines Serumalbumin
Ca^{2+}	Calcium-Ion
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6'-Diamidino-2- phenylindol-Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
IGF-1	insulinartiger Wachstumsfaktor
IP_3	Inositoltrisphosphat
K10%	Kulturmedium 10%
K20%	Kulturmedium 20%
MMC	Mitomycin C
mRNA	mitochondriale RNA
PBS	Phosphatpuffer
PBS-T	PBS mit Tween 0,1%
PDGF	Plättchen-Wachstumsfaktor
PIP_2	Lipidphosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphonat
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
RNA	Ribonukleinsäure
SMAD	Sma- und Mad-verwandtes Protein
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor

Lebenslauf Tobias HAGER

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

Erklärung

„Ich, Tobias Hager, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Wachstumsfaktorinhibitoren zur pharmakologischen Wundmodulation nach filtrierender Glaukomchirurgie am in-vitro-Beispiel des Tenonfibroblasten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Rieck für die freundliche Überlassung des Themas, die erfahrene hilfreiche Begleitung bei der Anfertigung der Dissertation, für die gute wissenschaftliche Betreuung und die konstruktive Anleitung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Sylvia Metzner vom Augenforschungsbereich CVK und Herrn PD Dr. Erich Knop vom Augenforschungsbereich Ziegelstrasse, die mir mit Rat und Tat hilfreich zur Seite standen.