

## Kapitel 5: Diskussion

### 5.1. Suramin

#### 5.1.1. Zytotoxizität

Suramin zeigte in allen verwendeten Konzentrationen keine zelluläre Toxizität. Dies entspricht den bisher bei okulären Geweben gemachten Erfahrungen mit diesem Medikament, so bei retinalen Pigmentepithelzellen<sup>(64)</sup> oder bei Linsenepithelzellen (Zytotoxizität 3,6 +/- 1,6%)<sup>(95)</sup>.

#### 5.1.2. Proliferation

Suramin inhibierte die Proliferation von Tenonfibroblasten. Signifikant waren die Ergebnisse aber erst ab Tag 21. Ursache hierfür kann die verwendete Methode sein. Verwendet wurde eine Zellzählmethode. Gerade bei geringen Zellzahlen ist diese Methode bei nur geringen Proliferationsunterschieden nicht ausreichend sensitiv. So lag der Proliferationsunterschied an den ersten Tagen bei jeweils ca. 10%. Gerade bei geringen Zellzahlen von 10 Zellen pro Gesichtsfeld ist dieser Unterschied zu gering, um sich in einem signifikanten Ergebnis niederzuschlagen. Ein weiterer Beleg dafür sind Versuche an humanen retinalen Pigmentepithelzellen von Leschey et al. Diese wurden in 5% fetalem bovines Serum mit 50µg/ml Suramin inkubiert. Im Zellzählversuch konnte auch nach 6 Tagen keine Veränderung der Zellzahl festgestellt werden. Bei gleicher Suraminkonzentration war jedoch die <sup>3</sup>H-Thymidininkorporation signifikant reduziert<sup>(64)</sup>. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit einem Versuch an Endothelzellen aus der Rattencornea. Hier war die Bromodeoxyuridin-Inkorporation ab einer Konzentration von 100µg/ml Suramin signifikant reduziert. 86% der Zellen befanden sich dabei in der G0/G1-Phase<sup>(104)</sup>.

Der Beweis, dass auch an den Tagen 3 bis 15 unseres Versuchs Proliferationshemmung vorlag, kann anhand der Signifikanz ab Tag 21 indirekt erbracht werden, denn dieser Proliferationsunterschied muss auf der Medikamentenwirkung in den ersten drei Tagen auf die zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Zellen beruhen.

Für Suramin sind mehrere Wirkungsmechanismen bekannt. So kann Suramin Wachstumsfaktoren binden und diese komplexieren, kompetitiv um den Rezeptor mit dem Wachstumsfaktor konkurrieren oder den second-messenger-Mechanismus inhibieren. Welcher dieser Mechanismen hier die Hauptwirkung entfaltet, kann nicht sicher differenziert werden. Denn trotz einer erkennbaren Hemmung lag weiterhin eine eindeutige Proliferationstendenz in der mit Suramin behandelten Gruppe vor.

Bei 3T3-Zellen (einer Fibroblastenzelllinie des National Institute of Health) war 72h nachdem Suramin entfernt worden war noch eine Proliferationshemmung nachweisbar<sup>(13)</sup>. In humanen Linsenepithelzellen konnte durch Suramin ebenfalls eine signifikante konzentrationsabhängige Proliferationshemmung erreicht werden, die unabhängig von der Einwirkdauer war<sup>(95)</sup>. Diese beiden Ergebnisse deuten an, dass nicht ein blosses Komplexieren von Wachstumsfaktoren oder eine kompetitive Hemmung am Rezeptor für die Proliferationshemmung verantwortlich war, sondern die Ursache dafür in einer Blockade der zellulären Mechanismen lag. In einem Versuch mit AKR-2B-Zellen, deren DNA-Produktion mit der <sup>3</sup>H-Thymidininkorporationsmethode gemessen wurde, konnte eine Suraminzugabe die Proliferation zwar verringern, der proliferationshemmende Effekt war nach Zugabe von weiterem Serum jedoch wieder umkehrbar<sup>(18)</sup>. Ein Ergebnis, das eher für eine Faktorkomplexierung oder eine kompetitive Hemmung spricht. Bei prinzipiell gleichem Vorgehen gelang dies im Proliferationsversuch dieser Arbeit nicht. Dies deutet an, dass die Proliferationshemmung in diesem Versuch auf Hemmung der sekundären Zellmechanismen beruht. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass Suramin in den Versuchen möglicherweise nicht in der optimalen Konzentration vorlag. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass andere wachstumsfördernde Stoffe im Serum in der Lage sind, die Effekte der Wachstumsfaktoren zu ersetzen. Dabei veränderte Suramin die Zellmorphologie nicht, so dass keine zytotoxischen Prozesse als eigentliche Proliferationshemmer angenommen werden können.

### **5.1.3. Migration**

Die Wanderungshemmung von Suramin konnte bereits an verschiedenen Zellpopulationen demonstriert werden. Diese Effekte waren konzentrationsabhängig.

Dabei wurde bei menschlichen Linsenepithelzellen im Wundproliferationsmodell eine maximale Hemmung von 62% erzielt<sup>(95)</sup>. Bei humanen retinalen Pigmentepithelzellen konnte in einem dem Transwell ähnlichen Verfahren kein Wanderungsunterschied festgestellt werden. Allerdings wirkte in diesem Versuch nicht Suramin direkt auf die Zellen, sondern lag im migrationsfördernden Kulturmedium in der unteren Kammer vor<sup>(64)</sup>. Ein weiterer Beleg dafür, dass Suramin seine Hauptwirkung in vivo nicht durch Komplexieren von Wachstumsfaktoren im Serum erreicht.

Im vorliegenden Transwell Assay System wurde die Migration der Tenonfibroblasten um 51,3% gehemmt, was nahe an der Maximalhemmung liegt, die bisher bei einer okulären Zellkultur mit Suramin in dieser Konzentration erreicht wurde. Dass trotzdem noch Zellen in der Lage waren, zu wandern, kann durch die Wirkung migrationsfördernder Substanzen in FCS erklärt werden, die unabhängig von den Wachstumsfaktoren war.

#### **5.1.4. Extrazellulärmatrixproduktion**

Durch Suraminzugabe war in Rattenhautwunden histologisch weniger Fibronectin nachweisbar<sup>(12)</sup>. In einem Kataraktmodell war in suraminbehandelten Rattenlinsen gar kein Fibronectin mehr nachweisbar<sup>(11)</sup>. Im vorliegenden Versuch wurde die Fibronectinkonzentration durch Suramin ebenfalls signifikant reduziert. Bereits Mietz et al. konnten zeigen, dass Suramin darüber hinaus in der Lage ist, die Produktion von Kollagen Typ-I und -III durch Tenonfibroblasten um mehr als 80% zu verringern<sup>(74)</sup>. Deshalb können wir davon ausgehen, dass die positive Wirkung von Suramin im Sinne einer Antifibrosierung des Filterkissens in der Tat auf einer Verringerung der Fibrosierung beruht.

#### **5.1.5. Transformation**

Die Transformation der Tenonfibroblasten wurde im vorliegenden Versuch signifikant um fast 90% inhibiert. Chan et al. konnten nach 72h Inkubation von C2C12-Zellen mit Suramin ebenfalls eine verringerte  $\alpha$ -SMA-Menge nachweisen<sup>(13)</sup>. Im vorliegenden Versuch war im Unterschied zu Chan et al. eine zusätzliche Gabe von TGF- $\beta$ 1 sowie ein mechanischer Anreiz mit Fibronectin notwendig, um überhaupt eine nennenswerte Umwandlungsrate der Zellen zu erreichen. Unterschiede in der  $\alpha$ -SMA-Menge

zwischen den einzelnen Patientenproben deuten an, dass für TGF- $\beta$ 1 je nach Patient eine unterschiedliche Rezeptordichte vorliegt oder dass die Zellen individuell unterschiedlich stark auf den mechanischen Stress reagieren.

#### **5.1.6. Bisherige Erfahrungen mit Suramin**

In unseren Versuchen deutet sich an, dass der Wirkungseffekt von Suramin prolongiert ist und durch einmalige Gabe erreicht werden kann. Interessanterweise ist Suramin in der Lage, alle Funktionen des Fibroblasten zu unterdrücken, die nach unserem Wissen bei der Wundheilung eine Rolle spielen. Dass diese Hemmung schwächer als in der mit 5-FU behandelten Gruppe ist, mag daran liegen, dass das Medikament möglicherweise in einer nicht maximal wirksamen Konzentration in diesem Zellversuch verwendet wurde. Da Suramin nach Trabekulektomie nur wenige okuläre Nebenwirkungen zeigte<sup>(76)</sup>, stellt es eine interessante Alternative zu den bereits etablierten Antimetaboliten dar.

### **5.2. Genistein**

#### **5.2.1. Zytotoxizität**

Die Zytotoxizitätsangaben für Genistein in der Literatur sind widersprüchlich. So inhibierte Genistein in einer Konzentration von 50 $\mu$ g/ml die Topoisomerase II in CTLL-2-Zellen (zytotoxischen T-Mäusezellen) auf 51%<sup>(4)</sup>. Allerdings hatte die Zugabe von Genistein während der S-Phase keinen Einfluss auf die DNA-Synthese in Mausfibroblasten<sup>(23)</sup>. Erschwerend kommt hinzu, dass Genistein eine fokale Adhäsionskinase der untersuchten Zellen hemmen kann<sup>(17)</sup>, so dass die Adhäsion von stromalen Zellen auf 59% reduziert werden kann<sup>(39)</sup>. Ob sie allerdings dazu führen kann, dass sich einmal adhärierte Zellen wieder ablösen, ist unbekannt.

Im vorliegenden Versuch wurde in einer Konzentration von 100 $\mu$ g/ml Genistein eine erhöhte Membrandurchlässigkeit der untersuchten Zellen festgestellt. Ob dabei eine Hemmung der Topoisomerase oder der Zelladhäsion vorlag, die konsekutiv zum Zelltod führte, kann nicht abschließend geklärt werden.

### 5.2.2. Proliferation

Genistein inhibierte in der verwendeten Konzentration von 50µg/ml über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Inhibierung war stärker als die durch Suramin. Während in den mit Suramin behandelten Gruppen am Tag 28 durchschnittlich 69% der Proliferationsrate der Kontrollgruppe erreicht wurden, so waren es in der mit Genistein behandelten Gruppe 19%.

Beim Proliferationsversuch stoßen wir jedoch wieder auf das Problem einer möglichen Zytotoxizität, da an Tag 3 und 6 die Zellzahl absank. Ob es sich hier um einen prolongierten Hemmeffekt der Topoisomerase II oder anderer möglicherweise gehemmter Enzyme handelte, kann nicht abschließend geklärt werden.

Zu erwähnen ist, dass Denk et al. bei serumfreier Kultivierung von Tenonfibroblasten ebenfalls eine Zellverringering feststellten, die bis zum zehnten Kultivierungstag anhielt. Danach stieg die Zellzahl wieder an<sup>(24)</sup>, so dass sich ebenfalls eine Absenkung in der Proliferationskurve bildete. Es bietet sich daher folgende Erklärungsmöglichkeit an: die Hemmung der Signalwege der Wachstumsfaktorrezeptoren war im vorliegenden Versuch so effizient, dass die Wachstumsfaktoren keine Wirkung auf die Proliferation der Zellen mehr entfalten konnten und deshalb einige Zellen in den programmierten Zelltod übergingen, während andere nach 10 Tagen wieder proliferierten. Dafür spricht auch, dass es unter der Genisteintherapie bei der Fibronectinproduktion nicht zu einer vergleichbaren Absenkung kommt, wie sie durch eine Zellschädigung hervorgerufen worden wäre. Ebenso konnten an den Tenonfibroblasten zu keinem Untersuchungszeitpunkt im Lichtmikroskop morphologische Auffälligkeiten entdeckt werden. Diese Vorstellung kann jedoch nur zutreffen, wenn die Konzentration anderer wachstumsfördernder Stoffe in FCS zu gering war, um die Proliferation der Tenonfibroblasten zu unterstützen. In anderen Versuchen unterdrückte Genistein ab 25µg/ml bereits signifikant die Zellproliferation von retinalen Pigmentepithelzellen beim Schwein. Bei einer Konzentration von 100µg/ml, die bei den Zellen keinen nachweisbaren zytotoxischen Effekt hatte, betrug die Proliferationshemmung 35%<sup>(60)</sup>. Die Proliferation von kornealen Endothelzellen des Kaninchens konnte sogar um 80% reduziert werden<sup>(49)</sup>.

### **5.2.3. Migration**

Genistein inhibierte die Zellmigration im Transwell Assay System um 52,8%. Dies deckt sich sehr gut mit bisher gemachten Untersuchungen des Migrationsverhaltens, in denen die Migration von stromalen Fibroblasten um 40% gehemmt wurde<sup>(39)</sup>. Wir müssen davon ausgehen, dass sich in fetalem Kälberserum auch noch andere Stoffe außer Wachstumsfaktoren befinden, die chemotaktisch wirken. Diese laufen über andere Signalwege und werden deshalb auch nicht gehemmt. Damit ist zu erklären, dass die Migration von Tenonfibroblasten von keinem der untersuchten Wachstumsfaktorinhibitoren vollständig unterdrückt wurde.

### **5.2.4. Extrazellulärmatrixproduktion**

Die Fibronketinkonzentration wurde durch Genistein signifikant reduziert. Das durchgeführte Experiment liefert jedoch keinen Beweis, ob es sich um eine selektive Unterdrückung der Fibronektinexpression handelte, oder ob im Rahmen der verringerten Zellproliferation nur weniger Zellen vorhanden waren, die dann insgesamt weniger Fibronektin exprimierten. Bisher konnte bei humanen fetalen Lungenfibroblasten gezeigt werden, dass Genistein ab einer Konzentration von 25µg/ml die mRNA-Produktion von Fibronektin blockiert<sup>(61)</sup>. Der divergente Verlauf der Kurven von Fibronektinproduktion und Proliferation an Tag 3 und 6 im vorliegenden Experiment lässt jedoch den Schluss zu, dass Genistein auf beide Vorgänge einen unterschiedlichen Einfluss hatte.

### **5.2.5. Transformation**

Im vorliegenden Versuch inhibierte Genistein deutlich die Produktion von  $\alpha$ -SMA. Ähnliche Beobachtungen konnten bisher bei Ratten-Podozyten gemacht werden<sup>(17)</sup>. Ebenso kommt es in Keratozyten der Kaninchenkornea unter Genisteintherapie zu atypischen Pseudopodien, die die Vermutung nahelegen, dass durch die Behandlung das Aktinskelett verändert wurde<sup>(39)</sup>.

### **5.2.6. bisherige Erfahrungen mit Genistein**

Der verwendete Wachstumsfaktorinhibitor wurde nach der vorliegenden Literatur bisher noch nicht im Tenonfibroblastenmodell untersucht. Zusätzlich ist bei Genistein zu beachten, dass das Medikament das Trabekelmaschenwerk sowie den Ziliarmuskel relaxiert<sup>(110)</sup>. Beide Gewebe regulieren den Ausstrom von Kammerwasser, so dass sich intraokular möglicherweise ein zusätzlicher Effekt des Wachstumsfaktorinhibitors ergibt. Bisher zeigte Genistein in der verwendeten Konzentration eine dem 5-FU vergleichbare Hemmwirkung.

## **5.3. 5-FU**

### **5.3.1. Zytotoxizität**

In einer Untersuchung in Tenon-Zellkulturen von 35 Glaukompatienten hatte 5-FU auf die Zellen nur morphologische, aber keine zytotoxischen Effekte. So lagen im Lichtmikroskop an Stelle der breiten Zytoplasmafortsätze verkleinerte Pseudopodien vor<sup>(37)</sup>. Diese Beobachtungen bestätigten sich auch in unseren Versuchen. Sie entsprechen morphologischen Veränderungen auf subzellulärer Ebene: einer Verminderung des Ergastoplasmas und einer Veränderung des zellulären Stützapparates<sup>(83)</sup> und zeigen damit die unspezifische Wirkung von 5-FU auf weitere Zellfunktionen neben der Proliferation.

### **5.3.2. Proliferation**

Auch wenn 5-FU nur wenige Minuten zugegeben wird, so kann es in entsprechend hohen Konzentrationen über 36 Tage lang die Proliferation von Tenonfibroblasten unterdrücken<sup>(50)</sup>. So verwendeten Khaw et al. die von uns benutzte Konzentration in einem ähnlichen Proliferationsversuch und gelangten zu vergleichbaren Ergebnissen. Wobei im vorliegenden Versuch keine durchgehende Reduktion der Zellzahl zwischen dem 12. und 28. Tag wie bei Khaw et al. auftrat<sup>(51)</sup>.

### **5.3.3. Migration und Extrazellulärmatrixproduktion**

5-FU inhibierte die Zellmigration im Transwell Assay System und die Fibronectinexpression über den gesamten Untersuchungszeitraum. Dies entspricht sehr gut den bisher gemachten Beobachtungen von Occleston et al. Da hierbei auch die Produktion von Kollagen Typ I und III inhibiert wurde, können wir davon ausgehen, dass 5-FU die gesamte Extrazellulärmatrixproduktion der Tenonfibroblasten hemmt<sup>(82)</sup>. Dem widersprechen Ergebnisse von Gross et al., die mittels Korrelationskoeffizienten keine Veränderung in der Extrazellulärmatrixproduktion durch 5-FU nachweisen konnten<sup>(37)</sup>. Diese Unterschiede lassen sich dadurch erklären, dass eine Korrelationskoeffizientenberechnung im vorliegenden Fall nur darlegen kann, ob Extrazellulärmatrixproduktion und Zellproliferation linear voneinander abhängen. Dadurch lässt sich jedoch eine nicht-lineare Abhängigkeit nicht ausschließen.

### **5.3.4. Transformation**

Khaw et al. konnten zeigen, dass mit Serum behandelte Tenonfibroblasten in der Lage sind, Kollagengele zu kontrahieren<sup>(52)</sup>. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich vermehrt Tenonfibroblasten in Myofibroblasten umwandeln. Daneben wird allerdings auch die Möglichkeit diskutiert, dass die Gelkontraktion allein durch die Wanderung des Fibroblasten durch die Wundmatrix erreicht wird. In unseren Versuchen zeigte sich, dass die Transformationsrate von Tenonfibroblasten durch Gabe wachstumsfaktorinhibierender Medikamente verringert, jedoch nie vollständig unterdrückt werden kann. Die eher ungerichtete Anordnung von  $\alpha$ -SMA-Fasern in mit 5-FU behandelten Zellen lässt sich damit erklären, dass 5-FU auch in RNA eingebaut wird, so dass abnorme Ribosomen produziert werden, die die Translation der mRNA verändern und abnorme Proteine gebildet werden<sup>(50)</sup>. Dadurch ändert sich die Struktur des Zellgerüsts, so dass eine gerichtete Anordnung der  $\alpha$ -SMA-Moleküle nicht mehr möglich ist.

### **5.3.5. Vergleich der verwendeten Medikamente mit 5-FU**

Beide verwendeten Wachstumsfaktorinhibitoren stellen in vitro eine Alternative zum bisher benutzten 5-FU dar. Die Wirkung von Suramin erschien schwächer als die von 5-FU. Das kann daran liegen, dass bei Suramin möglicherweise nicht die maximal



mögliche optimale Hemmkonzentration verwendet wurde. Die Effekte von 5-FU und Genistein waren fast gleichwertig, so dass sich Genistein für eine weitere intensive Untersuchung empfiehlt, um eine physiologischere Beeinflussungsoption der Wundheilung nach Trabekulektomie zu entwickeln.

#### **5.4. Problem der Voraktivierung von Tenonfibroblasten**

In den Versuchen zeigte sich, dass zwischen der Gruppe der aktivierten und der der nicht-aktivierten Tenonfibroblasten tendenziell Unterschiede im Proliferationsverhalten bestehen. Es bestanden auch interindividuelle Unterschiede. Diese waren allerdings nur an einem Tag zwischen zwei der 6 untersuchten Patientenproben signifikant. Durch Behandlung mit dem Antifibrotikum 5-FU wurden diese Unterschiede vollständig ausgeglichen. Aufgrund dieser Aussage kann die These unterstützt werden, dass Antifibrotika eine eventuell bestehende Voraktivierung von Tenonfibroblasten blockieren. Ebenso verhielten sich die verwendeten Wachstumsfaktorinhibitoren.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass FCS ebenfalls eine aktivierende Wirkung auf Zellen hat, so dass eine mögliche Voraktivierung einer Zellfraktion innerhalb der 24h Adhäsionszeit vielleicht relativiert bzw. abgeschwächt wurde.

Mit dem ELISA wurde in der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied zwischen aktivierter und nicht-aktivierter Gruppe festgestellt, wobei die Fibronectinexpression in der nicht-aktivierten Gruppe überraschenderweise höher war. Einerseits wurde bereits festgestellt, dass Tenonfibroblasten unterschiedlich sensitiv auf verschiedene Wachstumsfaktoren reagieren. So ist PDGF-BB beispielsweise in der Lage, die Proliferation von Tenonfibroblasten um fast 80% zu steigern<sup>(57)</sup>. Andererseits kann die TGF $\beta$ -Familie die Wirkung anderer Wachstumsfaktoren, darunter auch PDGF-BB hemmen<sup>(46)</sup>. Bisher ist unklar, ob in fetalem Kälberserum Faktoren der TGF $\beta$ - oder solche der PDGF-Familie die Wirkung auf die Tenonfibroblasten bestimmen. Eine mögliche Antwort für die überraschend schwächere Fibronectinexpression in der aktivierten Gruppe ist daher, dass hier vermehrt TGF $\beta$ -Faktoren wirken, die gegenregulatorisch auf Wachstumsfaktoren anderer Familien wirken und so eine schwächere Gesamtantwort resultiert. Zu dieser Erklärung passt auch die Tatsache, dass nach Medikamentengabe – und damit dem Wegfallen der Wirkung der „großen

Wachstumsfaktorfamilien“ – die Unterschiede zwischen beiden Gruppen aufgehoben waren.

Im Migrationsverhalten fand sich in der Kontrollgruppe kein Unterschied zwischen aktivierten und nicht aktivierten Tenonfibroblasten. Bei einer für Wachstumsfaktoren sensibilisierten Zellfraktion hätte man erwartet, dass sie sensibler auf chemotaktische Reize reagiert und daher stärker wandert. Einschränkend ist zu bemerken, dass von 8.000 Zellen nur etwa 300 wanderten, dieser Versuch damit möglicherweise nicht ausreichend sensibel war.

Das Ergebnis ist daher zwiespältig. Ein Nachweis, dass eine voraktivierte Population bei Risikopatienten besteht, die zu einer verstärkten Wundheilung führt, konnte nicht sicher erbracht werden. Ob durch eine Hemmung der Wachstumsfaktoren das Trabekulektomieergebnis im Vergleich zu den etablierten Antimetaboliten in Risikogruppen verbessert werden kann, ist daher fraglich. Über das Gleichgewicht zwischen Tenonfibroblast und Wachstumsfaktoren im Rahmen des integrierten Wundheilungsmodells kann daher weiterhin nur spekuliert werden (s. Abb.25).

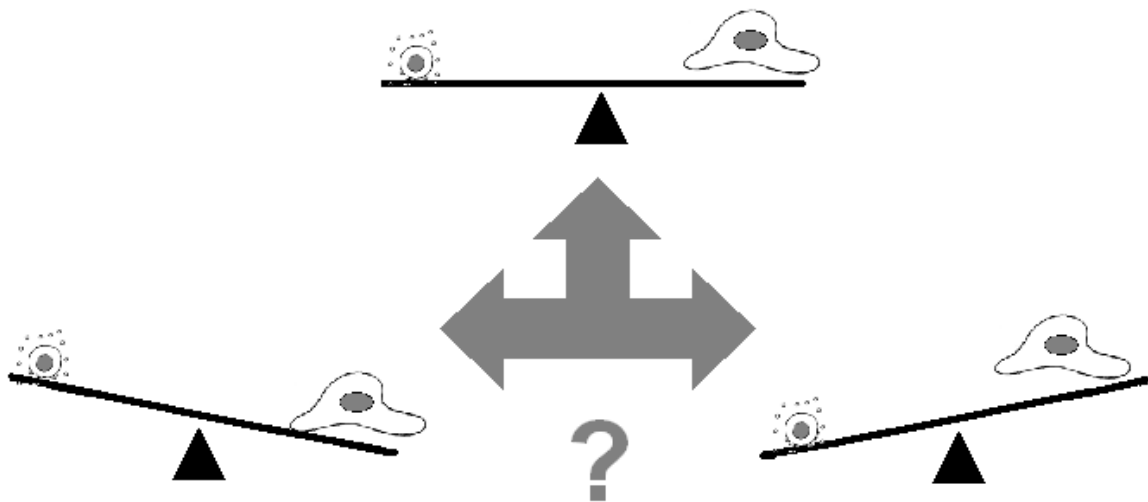


Abb.26: links: die Funktionen des Tenonfibroblasten werden von Wachstumsfaktoren beeinflusst, diese haben aber auf den Ausgang der Wundheilung keinen bestimmenden Einfluss, rechts: die Funktionen des Tenonfibroblasten werden entscheidend von den Wachstumsfaktoren bestimmt. Oben: der Tenonfibroblast und seine Wachstumsfaktoren regulieren sich gegenseitig, in wiefern das System beeinflusst werden kann ist noch unklar.

## 5.5. Einschränkung des verwendeten Modells

Das verwendete Modell stellt eine Vereinfachung der in-vivo-Verhältnisse dar. Es wurde eine isolierte Zellfraktion als Monolayer betrachtet, die in vivo mit zahlreichen anderen Zellen der Wundheilung in ständiger Interaktion steht. Daher konnte keine echte Wundheilungssituation hergestellt werden. So sind zum Beispiel die tatsächlichen Konzentrationsverhältnisse der Wachstumsfaktoren durch den Zusammenbruch mehrerer Schranken im Verlauf der Trabekulektomie unbekannt.

Daher kann nicht sichergestellt werden, dass die untersuchten Konzentrationen der verwendeten Wachstumsfaktorinhibitoren ideale Hemmkonzentrationen für die Funktionen des Tenonfibroblasten darstellen.

Es wurde ein Querschnitt von Versuchen ausgewählt, die gezielt die wichtigsten Funktionen des Fibroblasten im Rahmen der Wundheilung demonstrierten. Diese Versuche liefern uns daher lediglich ein annäherndes Abbild der Funktionen des Tenonfibroblasten in vivo.

Während der ELISA ein sehr sensibles Verfahren darstellt, um unterschiedliche Wirkungen von Medikamenten - auch untereinander - zu vergleichen, waren die anderen Verfahren möglicherweise nicht sensitiv genug, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Zellfraktionen herauszuarbeiten.

Die verwendeten Zellproben stammen selbst aus einer Risikopopulation für das Fehlschlagen einer Trabekulektomie. Die meisten Autoren vermuten aufgrund histologischer Untersuchungen, dass der Misserfolg in dieser Patientenpopulationen auf einer anderen Beschaffenheit des okulären Kammerwinkels oder einer generell größeren Dicke der Tenonkapsel beruht. Ein Unterschied in der Reaktivität der Tenonfibroblasten jugendlicher Patienten im Vergleich zu älteren wurde bisher nicht erbracht<sup>(3, 47)</sup>. In vitro ist er allerdings eine gängige Beobachtung, so dass ein Vergleich der Ergebnisse dieses Versuchs mit einer adulten Population notwendig ist, um die These eines voraktivierten Tenonfibroblasten weiter zu hinterfragen.

Im vorliegenden Versuch war eine zusätzliche Gabe von TGF- $\beta$ 1 notwendig, um eine nennenswerte Transformationsrate der Zellen zu erreichen. Dies sollte nicht zu der Annahme verleiten, dass die Umwandlung nur durch TGF- $\beta$ 1 erreicht wurde. In der Tat ist eine Kombination aus Fibronektin-Grundsubstanz und TGF- $\beta$ 1 - und damit eine Kombination mechanischer und biochemischer Anreize- notwendig, um zu einer Transformation zu führen.

Das verwendete Transwell Assay System ist lediglich in der Lage, die Chemotaxis von Zellen hinreichend zu untersuchen. Daneben existieren jedoch weitere Formen der zellulären Migration, deren Rolle im Wundheilungsmodell nach Trabekulektomie noch unbekannt ist.

## ***Kapitel 6. Zusammenfassung und Ergebnis***

Durch unser vertieftes Verständnis der Wundheilung im Allgemeinen und der Vernarbungsreaktion im Besonderen verlagert sich das Ziel einer intensivierten postoperativen Nachsorge nach Trabekulektomie zunehmend in Richtung einer gezielten Hemmung der durch den Tenonfibroblasten kontrollierten Proliferation, Migration, Extrazellulärmatrixproduktion und Transformation in Myofibroblasten. Die Regulation dieser Funktionen erfolgt durch eine konzertierte Aktion zahlreicher Wachstumsfaktoren. Die Trabekulektomie-Forschung bemüht sich, Medikamente zu finden, die diese konzertierte Aktion unterdrücken. Daher wurde der Einfluß der Wachstumsfaktoringhibitoren Suramin und Genistein auf die Funktionen des Tenonfibroblasten in vitro untersucht und die Ergebnisse mit denen des bereits etablierten Antimetaboliten 5-FU verglichen. Darüber hinaus gibt es Operations-Risikogruppen, bei denen die erzielte Operations-Erfolgsrate bei nur 15% liegt. Zur Erklärung existiert bisher lediglich eine Modellvorstellung, nach der in Risikogruppen Tenonfibroblasten-Zellpopulationen existieren, die besonders empfindlich auf Wachstumsfaktoreinflüsse reagieren und daher zu einer noch weiter gesteigerten