

Aus dem Institut für Klinische Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Endothelin-antagonisierende Effekt von Prostaglandin-  
Analoga am Trabekelmaschenwerk des Auges**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Galina Thomasowna Münzer  
aus Rostow am Don / Russland

Gutachter/in:           1. Prof. Dr. med. M. Fromm  
                                  2. Prof. Dr. med. U. Pleyer  
                                  3. Priv.-Doz. Dr. med. H. Thieme

**Datum der Promotion: 20.11.2009**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung – Das Glaukom</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Definition des Glaukoms</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Geschichte des Glaukoms</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Epidemiologie</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Einteilung der Glaukome</b>	<b>8</b>
1.4.1. Das primäre chronische Offenwinkelglaukom (POWG)	9
1.4.2. Sekundäre Offenwinkelglaukome	10
1.4.3. Primäre Winkelblockglaukome	10
1.4.4. Sekundäre Winkelblockglaukome	11
1.4.5. Die okuläre Hypertension	11
<b>1.5. Aktuelle Aspekte der Pathogenese</b>	<b>12</b>
<b>1.6. Der intraokulare Druck (IOD)</b>	<b>12</b>
1.6.1. Anatomische Grundlagen des Kammerwinkels	13
1.6.2. Die Physiologie der Kammerwasserproduktion	14
1.6.3. Die Physiologie des Kammerwasserabflusses	15
1.6.4. Die Regulation des Augeninnendrucks	16
1.6.5. Die Auswirkungen eines erhöhten Augeninnendrucks	17
<b>1.7. Die therapeutische Senkung des Augeninnendrucks</b>	<b>17</b>
1.7.1. Medikamentöse Glaukomtherapie	18
1.7.2. Operative Glaukomtherapie	19
<b>1.8. Die Bedeutung des Trabekelmaschenwerks für die Glaukomtherapie</b>	<b>19</b>
1.8.1. Das kontraktile Trabekelmaschenwerk	20
1.8.2. Der funktionelle Antagonismus zwischen Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel	21
<b>1.9. Endothelin - eine vasoaktive Substanz</b>	<b>23</b>
1.9.1. Endothelin und seine Bedeutung für die Pathogenese des Glaukoms	23
<b>1.10. Prostaglandinanaloga – eine potente Sustanzklasse in der modernen     Glaukomtherapie</b>	<b>24</b>
<b>1.11. Fragestellung</b>	<b>26</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Kontraktionsmessungen</b>	<b>27</b>
2.1.1. Deskription und Präparation des Gewebematerials	27

2.1.2.	Versuchsapparatur	29
2.1.3.	Versuchsablauf	32
2.1.4.	Versuchsauswertung und Statistik	33
2.1.5.	Verwendete Lösungen und Pharmaka	33
<b>2.2.</b>	<b>Calciummessungen</b>	34
2.2.1.	Zellkulturen	34
2.2.2.	Grundlagen der Calciummessmethode mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM	35
2.2.3.	Grundlagen der Berechnung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration	36
2.2.4.	Versuchsaufbau	37
2.2.5.	Versuchsdurchführung	38
2.2.6.	Versuchsauswertung und Statistik	39
2.2.7.	Verwendete Lösungen und Pharmaka	40
<b>3.</b>	<b>Versuchsergebnisse</b>	41
<b>3.1.</b>	<b>Ergebnisse zur Wirkung von Fluprostenol auf die Kontraktion im bovinen Trabekelmaschenwerk (BTM)</b>	41
3.1.1.	Die Wirkung von Fluprostenol auf die Carbachol-induzierte Kontraktion des BTM	41
3.1.2.	Die Wirkung von Fluprostenol auf die Endothelin-induzierte Kontraktion des BTM	42
3.1.3.	Die Wirkung von Fluprostenol in Kombination mit AI-8810 auf die ET-1 induzierte Kontraktion des BTM	43
3.1.4.	Zusammenfassung der Wirkung von Fluprostenol auf die Kontraktion im BTM	44
<b>3.2.</b>	<b>Ergebnisse zur Wirkung von Fluprostenol auf die intrazelluläre <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Konzentration des BTM</b>	45
3.2.1.	Die Wirkung von Endothelin-1 auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im BTM	45
<b>3.3.</b>	<b>Ergebnisse zur Wirkung von <math>\text{PGF}_{2\alpha}</math> auf die Kontraktion im BTM unter <math>\text{Ca}^{2+}</math>-freien Versuchsbedingungen</b>	47
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	50
<b>4.1.</b>	<b>Endothelin-1</b>	51
4.1.1.	Endothelinrezeptoren	52
4.1.2.	Endothelin und seine Bedeutung für den IOD	52

4.1.3.	Endothelin-Antagonisierung durch Unoprostone	53
<b>4.2.</b>	<b>Prostaglandine und ihre Bedeutung für den IOD</b>	<b>55</b>
4.2.1.	Der Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und anderen Prostaglandinen auf die Gefäßmuskulatur	56
4.2.2.	Nachweis und Bedeutung des FP-Rezeptors im Trabekelmaschenwerk und anderen okulären Geweben	58
<b>4.3.</b>	<b>Unterstützung der Hypothese der Endothelin-Antagonisierung durch Prostaglandin-Analoga mittels neuer Forschungsergebnisse dieser Arbeit</b>	<b>59</b>
4.3.1.	Kontraktionsmessungen	59
4.3.1.1.	Calcium-abhängige Signaltransduktion	61
4.3.1.2.	Calcium-unabhängige Signaltransduktion	61
4.3.2.	Calciummessungen	63
<b>4.4.</b>	<b>Mögliche Wirkung der Prostaglandin-Derivate auf die Signaltransduktion im Trabekelmaschenwerk</b>	<b>64</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>78</b>
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	78
7.2.	Danksagung	79
7.3.	Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit	79
7.4.	Lebenslauf	80

## **1. Einleitung – Das Glaukom**

Das Glaukom (griech. glaukos = graublau), auch als grüner Star bekannt, ist eine der häufigsten Erblindungsursachen weltweit. Diese chronisch progrediente Augenerkrankung führt zu einer langsam fortschreitenden Beeinträchtigung des Sehvermögens, die unerkannt und unbehandelt oft mit einer Erblindung endet. Daher ist von großer Bedeutung, rechtzeitig therapeutisch zu handeln und den Patienten potente Glaukompharmaka für optimale Therapieergebnisse zur Verfügung zu stellen.

Diese Arbeit untersucht die genaue Wirkungsweise einer Gruppe neuer Antiglaukomatosa, den sogenannten Prostaglandin-Analoga, um mit diesen Kenntnissen möglicherweise neue therapeutische Ansätze zu schaffen.

### **1.1. Definition des Glaukoms**

Seit der Entstehung des Krankheitsbegriffes vor Jahrhunderten hat die Definition des Glaukoms sich durch erweiterte Erkenntnisse zum Krankheitsbild vervollständigt und gewandelt. Heute bezeichnet das Glaukom eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen Augenerkrankungen, die durch den progredienten Verlust retinaler Ganglienzellen gekennzeichnet sind. Bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf wird dies als zunehmende Aushöhlung (Exkavation) an der Papille sichtbar und führt letztendlich zur Optikus-Atrophie. Die progrediente Schädigung des Sehnervs bewirkt den Verlust visueller Funktionen mit Entstehung charakteristischer Gesichtsfeldausfälle und führt unbehandelt meistens zur Erblindung. Als einer der wichtigsten pathogenetischen Faktoren für diese Erkrankung ist der individuell zu hohe intraokulare Druck (IOD) definiert worden. Er stellt nach heutigem Kenntnisstand keinen festen Bestandteil der Glaukomdefinition dar, hat aber einen besonders hohen Stellenwert in der Pathogenese und Therapie der Erkrankung.

### **1.2. Geschichte des Glaukoms**

Die Ersterwähnung des Begriffs „Glaukom“ geht zurück bis zur griechischen Antike und findet sich in den hippokratischen Schriften wieder. Zu dieser Zeit bezeichnete „Glaucoma“ die bläulich-grünliche Trübung der Iris und schloss alle Augenerkrankungen ein, bei denen eine

Farbveränderung der Pupille begleitet von Sehverlust zu beobachten war. Dies bezog wahrscheinlich überwiegend die Katarakt mit ein. Etwa seit der Zeitwende wurde eine neuere Definition eingeführt, die „Glaucoma“ als Trübung der Linse und „Hypochyma“ als erstarrten Erguss vor der Linse bezeichnete. Der Irrglaube, dass das Glaukom eine Erkrankung der Linse sei, hielt sich bis ins 18. Jahrhundert. 1707 erklärte der französische Augenarzt Maître-Jan, dass die Trübung und Verhärtung der Linse der „wahre“ Star (Katarakt) sei. Die letzten Zweifel beseitigte 1753 Jaques Daviel, der die Kataraktoperation einführte und zeigte, dass nur ein Teil der Erblindungen durch Entfernung der Linse heilbar sind. Erst dann begann man, die verschiedenen Augenerkrankungen besser zu verstehen und zu unterscheiden. Der Pathomechanismus des Glaukoms war damals jedoch noch unklar. Obwohl der arabische Arzt At-Tabari bereits im 10. Jahrhundert auf eine Augenerkrankung mit erhöhter Härte des Augapfels hinwies und Banister in Europa 1626 erstmalig die Härte des Augapfels bei der Palpation mit dem Glaukom in Verbindung brachte, gelang die Entdeckung der Erblindungsursache erst nach Einführung des Ophthalmoskops durch Helmholtz (1851). Durch die nun mögliche Beobachtung des Augenhintergrundes berichteten Jacobson (1853) sowie Jäger und von Gräfe (beide 1854) über Veränderungen der Papille beim Glaukom. Heinrich Müller bewertete 1858 die Exkavation der Papille und die festgestellte Nervenfaseratrophie erstmals als direkte Folge eines erhöhten IOD. Als Ursache der IOD-Erhöhung galt zu dieser Zeit noch die Hypersekretion des Kammerwassers auf entzündlicher Basis, die vom Glaukomanfall bei akutem Winkelblockglaukom abgeleitet wurde. Heute ist bekannt, dass es sich nahezu immer um eine Abflussstörung des Kammerwassers handelt. Weitere entscheidende Fortschritte in der Glaukomdiagnostik brachte 1938 die Einführung der Tonometrie, Perimetrie und Gonioskopie, welche eine direkte Untersuchung des Kammerwinkels ermöglicht.

### **1.3. Epidemiologie**

Das Glaukom stellt ein bedeutendes Weltgesundheitsproblem dar. Mit schätzungsweise 66,8 Millionen Erkrankten und 6,8 Millionen beidseits Erblindeten weltweit [1] ist es eine der häufigsten Erblindungsursachen. Es wird jedoch vermutet, dass allein in den industrialisierten Ländern bei nur ca. 50 % der Patienten die Erkrankung bekannt ist [2]. Dort ist das Glaukom nach der altersbedingten Makuladegeneration und der diabetischen Retinopathie die dritthäufigste Erblindungsursache [3,4]. In den Entwicklungsländern, wo es nach der Katarakt sogar die zweithäufigste Ursache darstellt, liegt die Dunkelziffer noch wesentlich höher. Das heißt,

dass das Ausmaß der Betroffenen aufgrund vieler unerkannter und unbehandelter Fälle nur schwer einzuschätzen ist und davon ausgegangen werden muss, dass die vorliegenden Zahlen nur einen unvollständigen Überblick auf die Verbreitung weltweit wiedergeben können.

Die Prävalenz des Glaukoms jenseits des 40. Lebensjahres wird in Europa und den USA auf etwa 0,5 % - 2 % geschätzt [5]. In Deutschland entspräche das etwa 200.000 bis 800.000 Patienten. Der Berufsverband der Augenärzte Deutschlands sprach 2003 von rund 20.000 glaukombedingt Erblindeten in Deutschland. Allein im Jahr 2003 kamen 1113 Neuerblindungen dazu, wobei ein Zuwachs auf bis über 2000 neu Erblindete jährlich im Jahr 2030 prognostiziert wird [6].

Glaukome treten abhängig von der Form der Erkrankung in allen Altersgruppen auf, die Häufigkeit nimmt jedoch mit dem Alter steil zu und beträgt bei den über 60-Jährigen etwa 6 %, bei den über 80-Jährigen sogar 10 % - 17 %. Das Lebensalter steht demnach unter den allgemeinen Risikofaktoren mit an erster Stelle.

#### **1.4. Einteilung der Glaukome**

In der heutigen Literatur findet sich eine Vielzahl von Einteilungen der verschiedenen Glaukomformen. Eine häufig verwendete Klassifikation unterscheidet die Glaukome nach ihrer Ätiologie in die sogenannten primären und sekundären Glaukome. Als primär wird ein Glaukom bezeichnet, wenn es nicht als Folge einer anderen Augenerkrankung entstanden ist. Es tritt dann meist beidseitig auf. In diese Gruppe gehört das Glaucoma chronicum simplex (sog. chronisches Offenwinkelglaukom) mit erhöhtem oder normalem IOD, letzteres auch als Normaldruckglaukom bezeichnet. Das Winkelblockglaukom und das kongenitale Glaukom sind weitere primäre Glaukomformen. Bei sekundären Glaukomformen kommt es infolge einer anderen Augenerkrankung (z.B. Uveitis), Verletzung oder als unerwünschte Nebenwirkung von therapeutischen Maßnahmen (z.B. durch Cortison) zur Glaukomerkrankung. Auch hier kann in Gruppen mit Offenwinkelglaukomen und Winkelblockglaukomen unterschieden werden. Das Glaukom kann in diesem Fall ein- und beidseitig auftreten.

Eine weitere Klassifikation ist die Einteilung der Glaukome nach ihren anatomischen Kriterien und damit auch dem Pathomechanismus. Hier unterscheidet man in Offenwinkelglaukome (auch Weitwinkelglaukome) und in Winkelblockglaukome (auch Engwinkelglaukome). Diese Bezeichnungen beziehen sich auf den sogenannten Kammerwinkel zwischen Kornea-Rückfläche und Iris-Vorderseite. Dort befindet sich das Trabekelmaschenwerk, durch welches



das Kammerwasser das Auge verlässt. Bei Offenwinkelglaukomen ist dieser Winkel normal weit und beträgt ungefähr  $40^\circ$ . Die anatomische Beziehung zwischen Iris und Trabekelmaschenwerk ist nicht verändert. Die Winkelblockglaukome sind gekennzeichnet durch einen abgeflachten, etwa  $15^\circ$  messenden Kammerwinkel. Das Trabekelmaschenwerk ist dabei durch die Iris blockiert, der Kammerwinkel anatomisch verlegt und damit verschlossen.

Sowohl für die Offenwinkel- als auch die Winkelblockglaukome lassen sich kongenitale Formen abgrenzen, bei denen es bedingt durch Entwicklungsstörungen zur unvollständigen oder fehlerhaften Ausbildung der Abflussstrukturen bzw. des Kammerwinkels und damit zur IOD-Steigerung kommt.

Auf einige der erwähnten Glaukomformen soll im Weiteren genauer eingegangen werden.

#### 1.4.1. Das primäre chronische Offenwinkelglaukom (POWG)

Das POWG macht in Europa ca. 60 % - 90 % aller Glaukomfälle aus und ist damit die häufigste Glaukomform. Allein dadurch, aber auch durch die bis heute noch nicht genau verstandene Pathogenese, nimmt es in der Glaukomforschung eine besondere Stellung ein.

Der Definition nach ist es eine im Allgemeinen bilaterale, aber nicht immer symmetrische Erkrankung, die chronisch-protrahiert verläuft und charakterisiert ist durch:

- Erkrankungsbeginn im Erwachsenenalter (ab dem 40. Lebensjahr)
- für das Glaukom typischer Sehnerv- und/oder Gesichtsfeldschaden
- unbehandelter IOD bei vielen Patienten zumindest zeitweise über 21 mmHg
- offener, unauffälliger Kammerwinkel
- Fehlen anderer Ursachen eines sogenannten sekundären Offenwinkelglaukoms  
( Leitlinie Nr. 15a des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands e.V.; 2006)

Die IOD-Erhöhung beim POWG wird durch einen primär erhöhten Abflusswiderstand im Trabekelmaschenwerk verursacht. Dieser ist bedingt durch bisher noch nicht genau erforschte, pathologische Veränderungen des trabekulären Maschenwerks selbst. Man geht von einer multifaktoriellen Pathogenese der Erkrankung aus, bei der unter anderem degenerative Veränderungen, genetische Disposition, aber auch Autoimmunprozesse eine Rolle zu spielen scheinen. Zu den Risikofaktoren des POWG gehört vor allem das Alter. Die meisten Erkrankungen treten bei Patienten auf, die älter als 65 Jahre sind. Bis zu 17 % aller über 85-jährigen

leiden an einem POWG. Eine weitere Bedeutung kommt der Rasse zu. Bei Afroamerikanern ist das Auftreten eines POWG signifikant häufiger, entwickelt sich früher und verläuft schwerer als bei den „weißen“ Bevölkerungsgruppen. Außerdem ist eine Myopie mit einer erhöhten Inzidenz der Erkrankung verknüpft.

Trotz der geläufigen Definition des POWG ist zu beachten, dass mindestens ein Sechstel bis ein Drittel aller Patienten mit sonst charakteristischem Krankheitsverlauf stets Druckwerte unter 21 mmHg vorweisen. Diese Form der Erkrankung wird als **Normaldruckglaukom** (auch Niederdruckglaukom) bezeichnet. In diesen Fällen scheinen Durchblutungsstörungen am Sehnerv maßgeblich an der Pathogenese beteiligt zu sein. Wie es aber genau zu einer Schädigung des Sehnervs kommt, ist bisher noch nicht geklärt.

#### 1.4.2. Sekundäre Offenwinkelglaukome

Steigt der IOD in Folge einer anderen Augenerkrankung bei offenem Kammerwinkel an, spricht man von einem sekundären Offenwinkelglaukom. Hier wird nach der Ätiologie in verschiedene Formen unterschieden, zu denen unter anderem das Kortisonglaukom, das hämolytische und das entzündungsbedingte Glaukom gehören. Außerdem sollen hier wegen ihrer Häufigkeit und Ähnlichkeit mit dem POWG auch das Pseudoexfoliationsglaukom und das Pigmentdispersionsglaukom erwähnt werden. Bei beiden Glaukomformen ist die Obstruktion die Folge einer Blockade des Trabekelmaschenwerks - beim Pseudoexfoliationsglaukom durch Ablagerungen eines abnormalen extrazellulären fibrillären Materials, beim Pigmentdispersionsglaukom durch Ablagerungen von Pigmentgranula. Eine weitere Einteilung erfolgt nach der Lokalisation der Obstruktion des Kammerwasserabflusses. Man unterscheidet hierbei eine *prätrabekuläre* Form von einer *trabekulären* und einer *posttrabekulären* Form.

#### 1.4.3. Primäre Winkelblockglaukome

Das primäre Winkelblockglaukom entsteht durch eine IOD-Erhöhung, die einhergeht mit einer Obstruktion des Kammerwasserabflusses als Folge eines partiellen oder vollständigen Kammerwinkelverschlusses durch die Iris. Dabei verlegt die Iris die Basis des Trabekelmaschenwerks, sodass das Kammerwasser nicht über dieses abfließen kann. Die Gruppe der Winkelblockglaukome beinhaltet verschiedene akute und chronische Zustände. Die Erkan-

kung tritt bei anatomisch prädisponierten Augen auf und verläuft häufig bilateral. Die akute Form, der sogenannte Glaukomanfall, tritt jedoch meist einseitig auf. Mit maximal 5 % aller Glaukomefälle ist das primäre Winkelblockglaukom im Vergleich zum POWG sehr selten und betrifft dabei Frauen häufiger als Männer.

#### 1.4.4. Sekundäre Winkelblockglaukome

Die Ursache der Drucksteigerung bei sekundären Winkelblockglaukomen ist wie beim primären Winkelblockglaukom der Verschluss des Kammerwinkels. Der Winkelverschluss tritt hier jedoch wie bei allen sekundären Glaukomformen als Folge einer anderen Augenerkrankungen auf. Wie auch bei den primären Winkelblockglaukomen werden akute von chronischen Formen unterschieden. Ein Beispiel ist das Neovaskularisationssyndrom, bei dem sich in Folge einer hypoxämischen Augenerkrankung neue, intraokulare Gefäße bilden. Die Kontraktion des fibrovaskulären Gewebes im Kammerwinkel führt dazu, dass die Iris über das Trabekelmaschenwerk gezogen wird und der Kammerwinkel sich Reißverschluss-artig verschließt. Es tritt unter anderem bei der proliferativen diabetischen Retinopathie auf.

#### 1.4.5. Die okuläre Hypertension

Die okuläre Hypertension nimmt eine Sonderstellung bei den Glaukomformen ein. Sie liegt vor, wenn der Patient einen über die Norm erhöhten IOD (wiederholt über 21 mmHg) hat, ohne dabei glaukotypische Krankheitszeichen wie Sehnerven- und Gesichtsfeldeinschränkungen vorzuweisen. Jeder Mensch scheint demnach einen individuellen IOD-Bereich zu haben, der von dem Auge toleriert wird, ohne dass es zu einer Schädigung des Sehnervs im Sinne eines Glaukoms kommt. Man weiß allerdings, dass ein Teil der Patienten mit einer okulären Hypertension im Laufe ihres Lebens ein Glaukom entwickeln werden. Je höher der IOD dabei ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass es zur Ausbildung eines Glaukoms kommt. Oft lässt sich erst nach jahrelanger Beobachtung genau sagen, ob eine okuläre Hypertension oder ein POWG mit langsamem Funktionsverfall vorliegt. Aus diesem Grund wird bei Druckwerten, die dauerhaft über 25 mmHg liegen, mit einer drucksenkenden Therapie begonnen, um das Risiko einer glaukomatösen Schädigung zu minimieren.

### 1.5. Aktuelle Aspekte der Pathogenese

Die Pathogenese der Glaukome ist multifaktoriell und bis heute in ihren Einzelheiten noch nicht vollständig entschlüsselt. Es existieren zwei Haupttheorien, die den Pathomechanismus der progressiven Optikusneuropathie bei Glaukomen beschreiben: die mechanische Druckschädigung durch einen erhöhten IOD und die vaskuläre Komponente, die gekennzeichnet ist durch eine herabgesetzte Durchblutung des Sehnerven [7]. Beide Theorien wurde in den letzten 150 Jahren von vielen Forschergruppen diskutiert und verteidigt, lassen jedoch auch heute noch viele Fragen offen. So sind viele Sekundärglaukome, wie z.B. das traumatische oder das steroidinduzierte Glaukom, in ihrer Entstehung gut verstanden. Hier gilt der oft sehr stark erhöhte IOD als unumstrittene, pathogenetisch wichtigste Kenngröße. Anders verhält es sich dagegen mit dem am häufigsten vorkommenden POWG und dem Normaldruckglaukom. Die Pathomechanismen sind hier weniger klar definiert. Gerade bei dem Normaldruckglaukom kann die Krankheitsentstehung durch die Druckerhöhung alleine nicht erklärt werden. Ein Erklärungsansatz wäre, dass in dem individuellen Fall der im normalen IOD-Bereich liegende Druckwert zu hoch ist. Andere Erklärungsansätze zielen darauf ab, dass neben der relativen IOD-Erhöhung primär eine verminderte Durchblutung durch Perfusionsstörungen und eine strukturelle Schwäche der Kollagenstruktur des Sehnervs als Ursachen in Betracht kommen [5]. Ein Zusammenwirken mehrerer Pathomechanismen gleichzeitig ist somit sehr wahrscheinlich.

Dennoch ist und bleibt der individuell zu hohe Augeninnendruck, nicht allein wegen seiner eminenten Bedeutung für die Progression der Erkrankung, ein zentrales Thema der Glaukomforschung und Hauptangriffspunkt der zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten.

### 1.6. Der intraokulare Druck (IOD)

Der IOD ist das Produkt von Kammerwasserproduktion einerseits und Kammerwasserabfluss andererseits. Während ein im individuellen Normbereich liegender IOD für die Funktion des Auges essentiell ist, gilt eine Erhöhung des IOD als wichtigster Risikofaktor des Glaukoms. Der IOD-Normbereich in der Augen-gesunden Bevölkerung liegt statistisch errechnet bei  $15,5 \pm 5,5$  mmHg, das heißt, die so genannten Normalwerte bewegen sich zwischen 10 und 21 mmHg. Dieser Normbereich und die davon abgeleitete Definition, dass ein IOD über 21

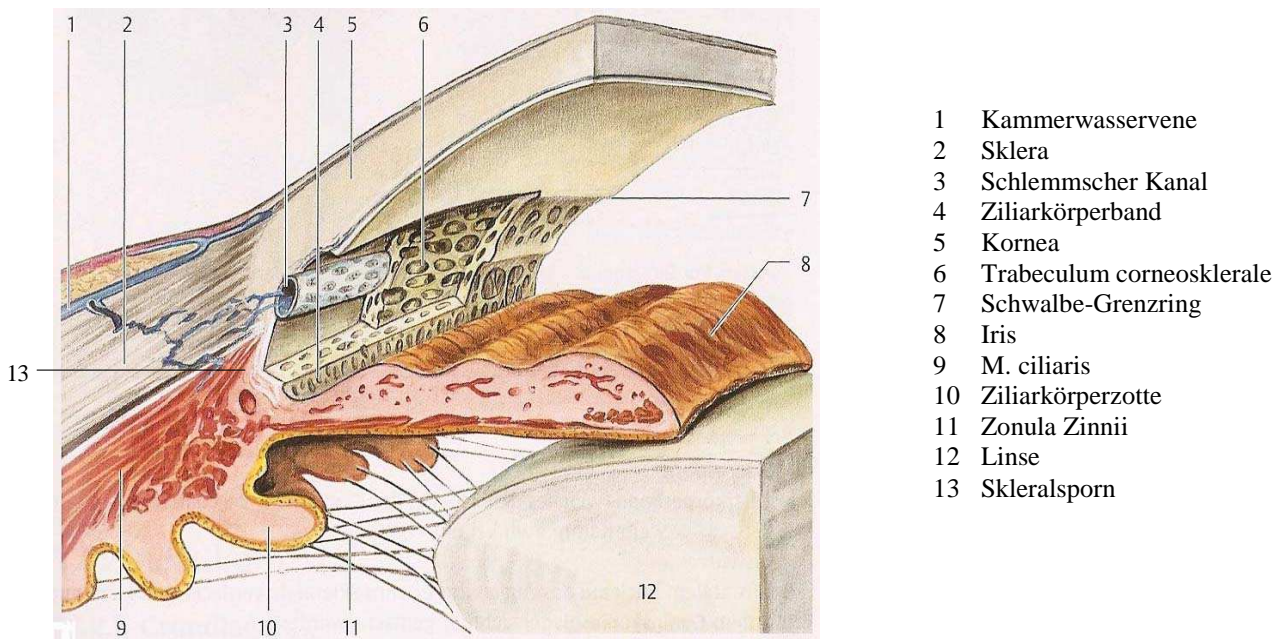
mmHg als pathologisch anzusehen ist, sind rein willkürlich gesetzte Grenzwerte, die einer erheblichen Schwankungsbreite unterliegen.

Der IOD eines bestimmten Menschen ist nie ein konstanter Wert. Er ist unter anderem abhängig vom Lebensalter, der zirkadianen Rhythmik und der körperlichen Aktivität. Auch die individuelle Toleranz gegenüber höheren Augendruckwerten ist groß. So werden bei einigen Patienten bereits bei einem Druck kleiner 21 mmHg Glaukomschäden beobachtet (Normaldruckglaukom), während andere unbeschadet Werte über 30 mmHg haben (okuläre Hypertension). Die häufig gebrauchte Grenze zwischen einem „normalen“ und „pathologischen“ IOD von 21 mmHg ist künstlich und nicht zuverlässig. Eine individuelle Bestimmung für jeden Patienten ist deshalb unerlässlich.

#### 1.6.1. Anatomische Grundlagen des Kammerwinkels

Abbildung 1.1. zeigt schematisch den histologischen Aufbau des Kammerwinkels: Zwei für den Kammerwasserabfluss entscheidende Strukturen sind der Schlemmsche Kanal und das Trabekelmaschenwerk. Der Schlemmsche Kanal (3) liegt in der perilimbalen Sklera (2) am korneoskleralen Übergang. Die innere Wand des Kanals wird von unregelmäßigen, spindelförmigen Endothelzellen gebildet. Die Begrenzung des Kanals zur vorderen Augenkammer stellt das Trabekelmaschenwerk (6) dar, das sich gitternetzartig über dem Kanal ausdehnt. Es ist eine siebartige Struktur, über die 85 % des Kammerwassers in den Schlemmschen Kanal fließen.

Im Trabekelmaschenwerk lassen sich drei strukturell und funktionell verschiedene Abschnitte unterscheiden, die fließend ineinander übergehen: 1. das *uveale Maschenwerk*, das an die Vorderkammer angrenzt; 2. das *korneosklerale Maschenwerk*, das sich zwischen Sklerasporn und Hornhaut erstreckt und 3. das *endotheliale (juxtakanalikuläre) Maschenwerk*, das aus einem schmalen Streifen Bindegewebes besteht. Der sogenannte Sklerasporn (13) trennt das Trabekelmaschenwerk vom Ziliarmuskel (9), dessen Muskelzellen radiär am Sklerasporn ansetzen.



**Abb. 1.1.:** Schematische Darstellung des Kammerwinkels (aus: Augenheilkunde - Sachsenweger 2002)

### 1.6.2. Die Physiologie der Kammerwasserproduktion

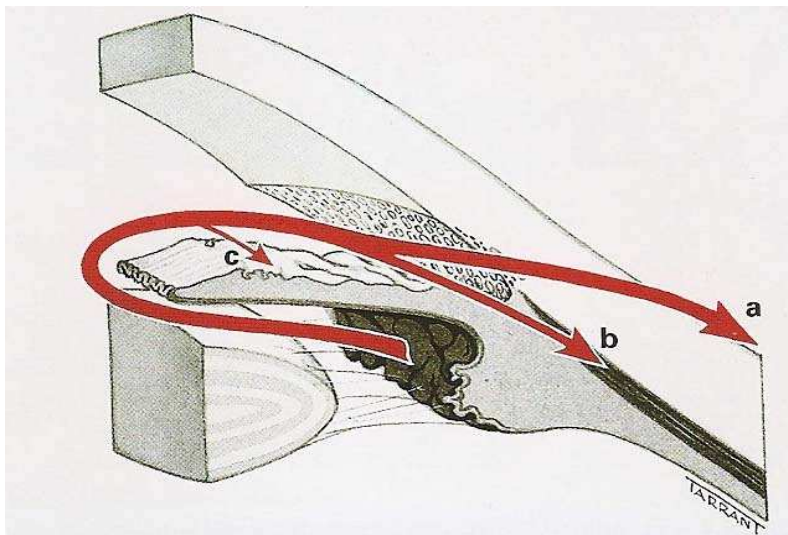
Das Kammerwasser ist eine elektrolyt-, protein- und nährstoffhaltige wässrige Lösung. Es ernährt avaskuläre Gewebe wie die Linse, das Hornhautendothel und das Trabekelmaschenwerk. Außerdem dient es mit seinem Gehalt an Immunfaktoren und seiner Zirkulation der Entfernung potentiell schädigender Agenzien aus dem Augeninneren und ist für die Aufrechterhaltung der Form und Stabilität des Auges verantwortlich. Die treibenden Kräfte für die Kammerwasser-Sekretion sind vorwiegend aktive Transportprozesse im Ziliarkörperepithel [8]. Diese sind das Ergebnis eines metabolischen Prozesses, der von mehreren Enzymsystemen abhängig ist, insbesondere der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , welche  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Hinterkammer sezerniert, und der Carboanhydrase. Neben den genannten Enzymen ist auch das  $\beta$ -adrenerge System an der Kammerwassersekretion beteiligt. Wasser folgt dem osmotischen Gradienten passiv. Faktoren wie Hypoxie und Hypothermie, die den aktiven Metabolismus hemmen, schränken die Kammerwasserproduktion ein. Der IOD selbst dagegen hat auf die Produktion keinen nennenswerten Einfluss [9].

### 1.6.3. Die Physiologie des Kammerwasserabflusses

Das Kammerwasser wird von den Ziliarkörperfortsätzen durch einen kombinierten Prozess aus Ultrafiltration und aktiver Sekretion in einer Größenordnung von 2 - 4  $\mu\text{l}/\text{Minute}$  in die hintere Augenkammer sezerniert. Es fließt durch die Pupille von der hinteren in die vordere Augenkammer und verlässt das Auge von dort auf zwei verschiedenen Wegen:

1. Über die *trabekuläre (konventionelle) Route* erfolgt mit circa 85 % der Hauptanteil des Kammerwasserabflusses. Das Kammerwasser fließt durch das Trabekelmaschenwerk in den Schlemmschen Kanal und wird dann von den episkleralen Venen drainiert. Dieser Weg ist abhängig von dem ausgeübten Druck und der vorhandenen Kammerwassermenge.
2. Über die *uveosklerale (unkonventionelle) Route* fließt der geringere Anteil von circa 15 % des Kammerwassers ab. Es gelangt über die Ziliarkörpervorderseite in den suprachoroidalen Raum und wird über die venöse Zirkulation in Ziliarkörper, Chorioidea und Sklera drainiert. Dieser Weg ist druckunabhängig.

Ein kaum nennenswerter Anteil des Abflusses erfolgt zudem direkt über die Iris. In der Abbildung 1.2. ist der Kammerwasserabfluss noch einmal schematisch dargestellt.



- a** konventionelle Route über das Trabekelmaschenwerk
- b** uveosklerale Route
- c** Abfluss über die Iris

**Abb. 1.2.:** Schematische Darstellung des normalen Kammerwasserabflusses (aus: Clinical Ophthalmology – A Systematic Approach. - Kanski 2003 [9])

#### 1.6.4. Die Regulation des Augeninnendrucks

Die Gesamtmenge an zirkulierendem Kammerwasser ergibt sich durch das Gleichgewicht zwischen der Sekretion durch den Ziliarkörper und der Abflussrate über den uveoskleralen und konventionellen Weg. Die Kammerwasserproduktion ist dabei annähernd konstant und wird nur durch wenige pathologische Zustände in ihrer Produktionsrate beeinflusst. Dagegen sind der Kammerwasserabfluss und vor allem die Beschaffenheit der Abflusswege von entscheidender Bedeutung für die Regulation des IOD.

Das Kammerwasser passiert relativ ungehindert die einzelnen trabekulären Schichten bis zum juxtakanalikulären Maschenwerk. Die Poren der Schichten, durch die das Kammerwasser fließt, werden zum Endothel des Schlemmschen Kanals immer dichter und feiner und bilden so eine Art Filter. Der Hauptabflusswiderstand wird schließlich vom kleinporigsten Gewebe des trabekulären Maschenwerks, dem Trabekulum juxtakanalikulare, und der Endothelschicht zum Schlemmschen Kanal gebildet. Dieser Widerstand ist nötig, um das Druckgefälle zwischen den episkleralen Venen (ca. 7 mmHg) und dem IOD (ca. 10 - 15 mmHg) und damit einen geregelten Abfluss aufrecht zu erhalten. Das juxtakanalikuläre Bindegewebe ist mit reichlich extrazellulärer Matrix wie z.B. Kollagenen, elastischen Fasern und Glykoproteinen ausgefüllt. Es ist demnach verständlich, dass pathologische Veränderungen dieser Struktur und ihres Funktionszustandes über die Abflussrate in dieser Region mitentscheiden und zu einer Abflussbehinderung und damit Druckerhöhung beitragen können [10]. Eine Vermehrung des extrazellulären Materials tritt mit zunehmendem Alter auf, wodurch der Abflusswiderstand im Alter steigt, was die erhöhte Inzidenz im hohen Alter erklärt.

Die Endothelzellen, die den Schlemmschen Kanal begrenzen und ebenfalls am Abflusswiderstand maßgeblich beteiligt sind, besitzen die einzigartige Fähigkeit, in Abhängigkeit vom Druckgradienten transzelluläre Kanäle zu bilden, die sich dynamisch öffnen und schließen [11]. Die Regulation des Kammerwasserabflusses erfolgt unter anderem durch den Ziliarmuskel, der über zonuläre Fasern direkt mit den Trabekeln verbunden ist und bei Kontraktion das gesamte Trabekelmaschenwerk einschließlich des juxtakanalikulären Gewebes aufweitet [12]. Daneben trägt die Eigenkontraktilität der Trabekelmaschenwerkzellen, die funktionell antagonistisch zum Ziliarmuskel wirken, einen bedeutenden Teil zur Regulierung des Abflusses bei. Das Trabekelmaschenwerk ist demnach entgegen früherer Annahmen kein passiver Filter, sondern als aktives Gewebe selbst an der Abflussregulation beteiligt [13].

Bei Glaukompatienten auftretende Drucksteigerungen werden in den meisten Fällen durch eine Abflussbehinderung im Bereich des Trabekelmaschenwerks und nur sehr selten durch



eine gesteigerte Kammerwasserproduktion verursacht [14]. Erhöht sich der Abflusswiderstand, steigt der IOD. Wird hingegen der Abflusswiderstand verringert, sinkt der IOD [15]. Deshalb stellen genauere Untersuchungen des Trabekelmaschenwerks einen wichtigen Schwerpunkt in der Glaukomforschung dar.

#### 1.6.5. Die Auswirkungen eines erhöhten Augeninnendrucks

Ein individuell zu hoher IOD kann auf Dauer zu einer strukturellen Schädigung des Sehnervenkopfes und zum Untergang retinaler Ganglienzellen führen. Dies kann glaukomtypische Gesichtsfeldausfälle bis hin zu einer Erblindung nach sich ziehen. Man geht von mehreren Pathomechanismen aus, durch die eine IOD-Erhöhung zum Untergang der retinalen Ganglienzellen führt. Zum einen kommt es druckbedingt zu einer direkten mechanischen Schädigung der Axone des Nervus opticus und der retinalen Ganglienzellen durch Kompression, was zur Apoptose der Zellen führt [16]. Zum anderen ruft der veränderte Druckgradient eine Minderperfusion der Sehnervpapille und der Retina hervor [17]. Dadurch werden die Durchblutung und Ernährung der retinalen Ganglienzellen reduziert und der Zelluntergang weiter beschleunigt. Es ist bisher nicht bekannt, ob die damit einhergehende Herabsetzung der Durchblutung des Sehnervs als primäre Konsequenz des zu hohen IOD oder sekundär als Folge eines Gefäßschadens ohne Bezug zum IOD zu betrachten ist. Auch ein gestörter retrograder Axoplasmtransport und die damit einhergehende Mangelversorgung der Nervenzellen wird als Ursache diskutiert [18]. Wie sich die Pathomechanismen gegenseitig beeinflussen und welchen Anteil die einzelnen Mechanismen am Gesamtschädigungsmuster haben, ist bisher nicht geklärt.

### 1.7. Die therapeutische Senkung des Augeninnendrucks

Obwohl immer mehr über das Glaukom und seine Pathophysiologie bekannt wird und man heute weiß, dass ein erhöhter IOD nicht alleine für die Krankheitsentstehung und -progression verantwortlich sein kann, gilt die relative IOD-Erhöhung weiterhin als wichtigster und nach wie vor als einziger erfolgreich behandelbarer Risikofaktor [19].

Nachdem in den letzten Jahren die Wirksamkeit der drucksenkenden Therapie oft angezweifelt wurde, konnte die Notwendigkeit der Drucksenkung in jüngster Zeit durch groß angelegte

Studien eindeutig belegt werden. So konnte die Wirksamkeit der IOD-senkenden Therapie nicht nur beim fortgeschrittenen Glaukom (Advanced Glaucoma Intervention Study) und beim frühen Glaukom (Early Manifest Glaucoma Trial), sondern auch beim Normaldruckglaukom (Collaborative Normal Tension Glaucoma Study) bewiesen werden [20, 21, 22]. Zusätzlich verzögert oder verhindert eine medikamentöse Drucksenkung bei der okulären Hypertension das Auftreten von Schäden an Sehnerv und Gesichtsfeldausfälle im Sinne einer relativen Risikoreduktion um 54 % (absolute Risikoreduktion 5,1 %) [23].

Das Prinzip aller derzeit eingesetzten Therapieoptionen beruht auf einer Senkung des IOD. Das gilt sowohl für die konservativ-medikamentöse als auch für die chirurgisch-interventionelle Methode, die beide rein symptomatisch wirken.

### 1.7.1. Medikamentöse Glaukomtherapie

Die primäre Behandlung des POWG und auch vieler Sekundärglaukome erfolgt zunächst medikamentös. Dabei werden in erster Linie lokal applizierbare Therapeutika eingesetzt. Das Wirkprinzip der meisten in der Glaukomtherapie verwendeten Medikamente beruht auf dem Eingriff in das Verhältnis zwischen Kammerwasserproduktion und -abfluss. Das heißt, sie bewirken eine Senkung der Kammerwasserproduktion (z.B. durch  $\beta$ -Blocker oder Carboanhydrasehemmer) oder eine Steigerung des Abflusses. Die Abflusssteigerung kann dabei durch Erhöhung des konventionellen oder des uveoskleralen Abflusses erreicht werden. Der konventionelle Abfluss wird durch die Applikation von Parasympathomimetika, der uveosklerale durch Prostaglandinderivate-Zugabe erhöht [24]. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die heute gebräuchlichen Glaukomtherapeutika gegeben werden:

Die Substanzklasse der **Parasympathomimetika (Cholinergika)**, zu denen das Pilocarpin gehört, erhöht durch Kontraktion des Ziliarmuskels den Kammerwasserabfluss und senkt so den IOD. Die Wirkung hängt dabei stark von der Beweglichkeit des Ziliarmuskels und der Entfaltbarkeit des Trabekelmaschenwerks ab.

**Carboanhydrasehemmer** senken den IOD durch ihren inhibierenden Effekt auf die Carboanhydrase II und bewirken so eine Hemmung der Kammerwassersekretion.

Auch die **Sympatholytika**, zu denen im Wesentlichen die selektiven und nicht-selektiven  $\beta$ -Blocker gehören, bewirken eine Drucksenkung über eine selektive Hemmung der Kammerwasserproduktion im Ziliarkörper.

**Sympathomimetika ( $\alpha$ 2-Agonisten)** verdanken ihre IOD-senkende Wirkung vor allem ihrem inhibierenden Effekt auf die Kammerwassersekretion. Daneben wird auch eine Wirkung auf den trabekulären oder uveoskleralen Abflussweg diskutiert.

Auf die **Prostaglandinanaloga**, die die neuste und potenteste Substanzgruppe darstellen, soll wegen ihrer Zentralität und Bedeutsamkeit gesondert eingegangen werden.

### 1.7.2. Operative Glaukomtherapie

Eine operative Intervention ist erst indiziert, wenn nach intensivierter, medikamentöser Behandlung kein Einfluss auf die Progression der Erkrankung erkennbar ist, Nebenwirkungen auftreten oder sich Druckschwankungen schlecht einstellen lassen. Auch mangelnde Compliance seitens des Patienten kann eine operative Therapie notwendig machen. Es bestehen mehrere Möglichkeiten, den IOD über eine Operation zu senken. Je nach Art des Glaukoms können sich unterschiedliche Operationsverfahren anbieten, so wie die Iridektomie, die Trabekulektomie oder die Filtrationsoperation. In den letzten Jahren wurden außerdem Glaukomdrainagesysteme als Alternative zu den etablierten Operationsmethoden entwickelt. Wie die medikamentöse Therapie dient auch die operative in erster Linie der IOD-Senkung. Mechanisch lassen sich auch hier sowohl Kammerwasserabfluss als auch –produktion positiv beeinflussen.

### 1.8. Die Bedeutung des Trabekelmaschenwerks für die Glaukomtherapie

Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 1.6.4.), ist das Trabekelmaschenwerk hauptsächlich am Abflusswiderstand im Auge beteiligt und hat große Bedeutung für die Physiologie des Kammerwasserabflusses. Der größte Anteil des Kammerwassers (ca. 85 %) verlässt das Auge über den konventionellen Abflussweg, das heißt, über die filterähnliche Struktur des trabekulären Maschenwerks. Das Trabekelmaschenwerk leistet folglich einen wesentlichen Beitrag zur Regulation des IOD. Neben seiner Filterfunktion, die vor allem bei den sekundären Glaukomen deutlich wird, verfügt das Trabekelmaschenwerk außerdem über kontraktile Eigenschaften [25]. Dabei ist vor allem das Kontraktionsverhalten dieses Gewebes ein wichtiger Aspekt und viel versprechender Ansatzpunkt zur IOD-Senkung.

### 1.8.1. Das kontraktile Trabekelmaschenwerk

Bisher wurde angenommen, dass im Wesentlichen der Ziliarmuskel durch seinen Angriff am Trabekelmaschenwerk den Kammerwasserabfluss reguliert. Durch seine Kontraktion entfaltet sich das Trabekelmaschenwerk, so dass die filtrierende Oberfläche vergrößert wird und der Abflusswiderstand sinkt.

Bárány war 1962 der Erste, der nachweisen konnte, dass drucksenkende Medikamente wie zum Beispiel Pilocarpin über eine Kontraktion des Ziliarmuskels zur Herabsetzung des Abflusswiderstands führen [26]. Von einer eigenständigen Beteiligung des Trabekelmaschenwerks am Kammerwasserabfluss ging man jedoch lange Zeit nicht aus.

Heute ist bekannt, dass das trabekuläre Maschenwerk mehr als nur ein passiver Filter ist. Es ist in vielfältiger Weise aktiv an der Regulation des IOD beteiligt. Zum einen wirkt es über den Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix der Trabekelmaschenwerkzellen und durch eine aktive Zell-Volumenregulation auf den Abflusswiderstand [27]. Zum anderen konnte bewiesen werden, dass das Trabekelmaschenwerk selbst ein kontraktiles Gewebe mit glattmuskulärer Funktion ist [28, 29], das nicht nur indirekt über den Ziliarmuskel, sondern direkt durch seine Kontraktilität an der Regulation des Kammerwasserabflusses teilnimmt [30]. Kontrahieren die Trabekelmaschenwerkzellen, kommt es zur Verengung der intertrabekulären Räume. Der Abflusswiderstand und damit auch der IOD werden erhöht. Eine Relaxation der Zellen bewirkt durch Aufweitung der interzellulären Zwischenräume eine Senkung des Abflusswiderstandes und des IOD.

Die Arbeitsgruppe um Professor Wiederholt konnte anhand einer Reihe von Untersuchungen an kultivierten Zellen des Menschen und des Rindes beweisen, dass die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks ähnlich reguliert wird wie die glatter Muskelzellen [31, 32, 33]. Des Weiteren wurden an den Trabekelmaschenwerkzellen neben Glattmuskel-typischen kontraktilen Proteinen wie Myosin und Myosin-Leichtketten-Phosphatase wesentliche, an normalen glattmuskulären Kontraktionen beteiligte Rezeptoren, wie muscarinerge, adrenerge und Endothelin-Rezeptoren, nachgewiesen. Von diesen scheinen vor allem letztere für das Glaukom oder den IOD von großer Bedeutung zu sein (siehe Kapitel 1.9.1.).

In den letzten Jahren sind Effekte von verschiedenen Substanzen und Pharmaka auf die Kontraktilität von Ziliarmuskel und Trabekelmaschenwerk untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks viele Ähnlichkeiten, aber auch fundamentale Unterschiede zum Ziliarmuskel aufweist [34, 35, 36]. So hatten Substanzen wie muscarinerge und  $\beta$ -adrenerge Agonisten sowie Prostaglandin-Agonisten qualitativ

ähnliche Effekte auf isolierte Trabekelmaschenwerkstreifen und Ziliarmuskelstreifen. Fundamentale Unterschiede dagegen fand man bei den  $\alpha_2$ -adrenergen Agonisten wie Brimonidin, welche nur Kontraktionen am Trabekelmaschenwerk auslösten. Auch Endothelin wirkte am Trabekelmaschenwerk effektiver als am Ziliarmuskel. Alle hier aufgeführten Versuchsergebnisse beziehen sich auf Versuche, welche unter Calcium-haltigen Bedingungen durchgeführt wurden. Unserer Arbeitsgruppe gelang es zu zeigen, dass Endothelin unter Calcium-freien Versuchsbedingungen nur am Trabekelmaschenwerk, nicht jedoch am Ziliarmuskel eine Kontraktion induziert [37]. Das bedeutet, dass sich Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel bezüglich ihrer Kontraktilität pharmakologisch sehr unterschiedlich beeinflussen lassen. Dies bietet die Möglichkeit eines gezielten Therapieansatzes in der medikamentösen Glaukomtherapie.

### 1.8.2. Der funktionelle Antagonismus zwischen Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel

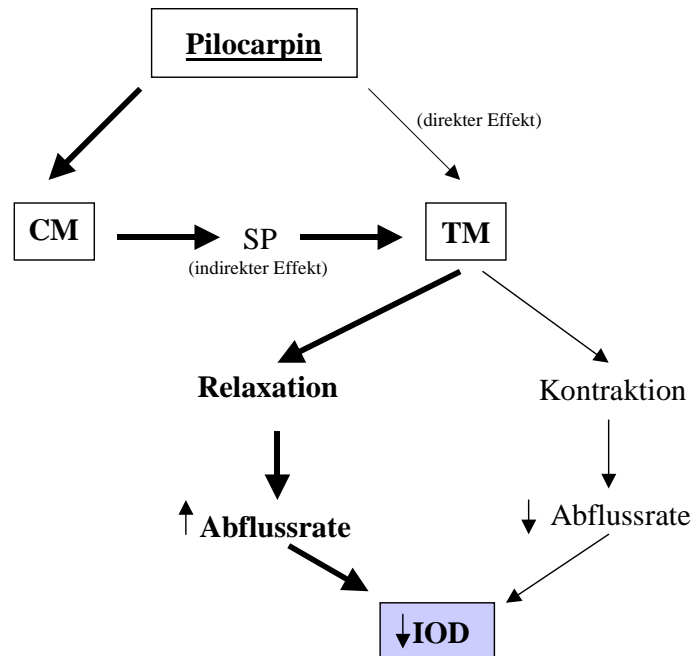
Wie in Kapitel 1.8.1. bereits beschrieben, bewirkt eine Kontraktion des Ziliarmuskels durch Zug am Sklerasporn eine Aufweitung der Abflusswege zwischen den Trabekelmaschenwerkzellen, was eine Erhöhung des Kammerwasserabflusses nach sich zieht (siehe Abbildung 1.3.). Untersuchungen an bovinen Augen, bei denen der Abflusswiderstand ausschließlich durch das Trabekelmaschenwerk reguliert wird, zeigten, dass Substanzen, die am isolierten Trabekelmaschenwerk eine Kontraktion auslösen (Pilocarpin, Carbachol, Endothelin), im Gegensatz dazu zu einer Reduktion der Kammerabflussrate führen [38].

Ebenso gegensinnig verhält es sich mit der Relaxation der beiden Gewebe. Bei einer Relaxation des Ziliarmuskels verdichtet sich das trabekuläre Maschenwerk und der Kammerwasserabfluss wird reduziert, wohingegen Substanzen, die einen relaxierenden Effekt auf das Trabekelmaschenwerk haben ( $\beta$ -Agonisten und Ethacrynsäure), eine Erhöhung der Abflussrate induzieren.

Die oben genannten, Kontraktion-induzierenden Substanzen bewirken bei Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel aufgrund ihrer glattmuskulären Natur jeweils eine Kontraktion. Diese Kontraktion hat jedoch einen gegensinnigen Effekt auf den Abflusswiderstand, sodass man von einem funktionellen Antagonismus sprechen kann. Dieser Antagonismus soll am Beispiel der Wirkung von Pilocarpin näher erläutert werden:

Pilocarpin ist ein Parasympathomimetikum und zählt zu den ältesten Antiglaukomatosa. Es ist weithin akzeptiert, dass Pilocarpin eine Kontraktion am Ziliarmuskel auslöst und damit eine

IOD-Senkung bewirkt. Lepple-Wienhues et al. konnte 1991 erstmals zeigen, dass es auch am Trabekelmaschenwerk eine Kontraktion induziert [39]. Die Wirkung auf den Ziliarmuskel überwiegt dabei jedoch, woraus insgesamt eine Steigerung des Kammerwasserabflusses resultiert (siehe Abbildung 1.3.). Beim malignen Glaukom dagegen besteht häufig ein ziliärer Block. Die Gabe von Pilocarpin führt in diesem Fall nicht zu einer Kontraktion des Ziliarmuskels, so dass allein der kontraktile Effekt auf das Trabekelmaschenwerk übrig bleibt. Hier kommt es durch die Gabe von Pilocarpin zu einer isolierten Kontraktion des trabekulären Maschenwerkes, was eine Reduktion des Kammerwasserabflusses und damit eine IOD-Erhöhung zur Folge hat, weswegen Pilocarpin in diesem Fall absolut kontraindiziert ist.



**Abb. 1.3.:** Der funktionelle Antagonismus zwischen Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel; CM = Ziliarmuskel; TM = Trabekelmaschenwerk; SP = Skleralsporn; IOD = intraokularer Druck (modifiziert nach: Wiederholt et al. 2000 [13])

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wird besonders deutlich, wie wichtig ein intaktes Gleichgewicht zwischen Trabekelmaschenwerktonus und Ziliarmuskeltonus für die Kammerwasserregulation und den IOD ist. Um bei einem pathologisch veränderten Trabekelmaschenwerktonus in die daraus resultierende Dysbalance gezielt medikamentös eingreifen zu können, müsste das verwendete Pharmakon in der Lage sein, das Trabekelmaschenwerk isoliert zu relaxieren und gleichzeitig den Ziliarmuskel unbeteiligt zu lassen. Unerwünschte

Wirkungen wie Akkommodationsstörungen oder Störungen der Pupillenmotorik könnten damit so gering wie möglich gehalten werden. Diesbezüglich sind Kenntnisse über die verschiedenen, bereits angewendeten oder sich noch in Erprobung befindenden Antiglaukوماتosa und ihre genauen physiologischen und biochemischen Wirkmechanismen von großer Bedeutung.

## **1.9. Endothelin - eine vasoaktive Substanz**

Endothelin ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes vasoaktives Polypeptid, das erstmals 1988 von Yanagisawa beschrieben wurde [40]. Mit einer 10-fach stärkeren vasokonstriktorischen Wirkung als Angiotensin II stellt es einen der wichtigsten endogenen vaskulären Mediatoren dar und hat große Bedeutung bei der Gefäßhomöostase. Es existieren mindestens drei bekannte Isoformen des Endothelins (Endothelin-1 bis -3), die sich unter anderem durch verschiedene pharmakologische Profile, Gewebslokalisation und zelluläre Effekte voneinander unterscheiden [41]. Charakteristisch für das Endothelin-1 (ET-1) ist, dass es quantitativ bei weitem überwiegt und das potenteste der drei Peptide ist [42,43]. Die Wirkung von Endothelin wird über die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Endothelin-Rezeptoren vermittelt [44]. Derzeit sind zwei verschiedene Rezeptorsubtypen des Endothelin-Rezeptors bekannt, die als ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> bezeichnet werden.

Die Bedeutung der vasokonstriktiven Eigenschaften des Endothelins für die Pathogenese zahlreicher, vor allem kardiovaskulärer Erkrankungen ist hinreichend erwiesen [43, 45]. Auch eine Wirkung auf verschiedene Strukturen des Auges und eine Beteiligung an der Glaukom-entstehung konnte gezeigt werden.

### **1.9.1. Endothelin und seine Bedeutung für die Pathogenese des Glaukoms**

Bereits kurz nach der Erstbeschreibung des Endothelins wurde bekannt, dass Endothelin auch am Auge eine physiologische Bedeutung hat. So machten Lepple-Wienhues et al. 1992 die Entdeckung, dass die Konzentration von Endothelin im Kammerwasser eines gesunden Auges in etwa der zwei- bis dreifachen Plasmakonzentration entspricht [46]. Anhand einer Reihe unterschiedlicher Untersuchungsmethoden von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass das Peptid vor allem vom Ziliarepithel produziert und ins Kammerwasser sezerniert wird [47, 48]. Heute weiß man, dass Endothelin in den unterschiedlichsten Strukturen

des Auges, so auch im Trabekelmaschenwerk, zu finden ist und viele regulatorische Funktionen übernimmt [49].

Die Frage, ob das Peptid auch an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt ist, ergab sich, als Untersuchungen an bovinem Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel zeigten, dass ET-1 in beiden Geweben zu einer Kontraktion führt. Dabei war am Trabekelmaschenwerk die ET-1-induzierte Kontraktion stärker ausgeprägt als am Ziliarmuskel [50]. Da beide Gewebe mit ihrer kontraktiven Eigenschaft erheblich zum Abflusswiderstand beitragen, könnte ET-1 als potenter Kontraktionsinduktor nicht unerheblich an der IOD-Regulation beteiligt sein. Diese Fragestellung führte zu einer Vielzahl von Untersuchungen, die nach einer Verbindung zwischen Endothelin und Glaukom suchten. Experimente an Augen von verschiedenen Spezies zeigten, dass appliziertes ET-1 einerseits einen Einfluss auf Kammerwasserproduktion und –abfluss hat, andererseits als Vasokonstriktor zur Reduktion der Durchblutung von Retina und Sehnerv und damit zu deren Schädigung beiträgt [51-57]. Das bedeutet, dass ET-1 sowohl über die mechanische als auch über die vaskuläre Komponente der Pathogenese Einfluss auf die Glaukomentstehung bzw. –progression haben könnte. Bekräftigt wurde die Vermutung einer Beteiligung von ET-1 an der Glaukomentstehung, als deutlich erhöhte Endothelinkonzentrationen im Kammerwasser von Glaukompatienten nachgewiesen wurden [58, 59]. Zusätzlich konnten Kaiser [60] und Sugiyama [61] zeigen, dass es bei Patienten mit Normaldruckglaukom im Vergleich zu gesunden Probanden zu einer signifikanten Erhöhung der ET-1-Konzentration im Plasma kommt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ET-1 in vielfältiger und sehr komplexer Weise in physiologische und pathophysiologische Parameter am Auge einzugreifen scheint. Durch seine kontraktionsinduzierenden Effekte an Trabekelmaschenwerk könnte es maßgeblich an der Glaukomentstehung und –progression beteiligt sein. Das macht Endothelin zu einem vielversprechenden Angriffspunkt bezüglich einer gezielten pharmakologischen Glaukomtherapie im Sinne einer Endothelin-Antagonisierung. Dieses Therapiekonzept ist Bestandteil zahlreicher, zurzeit laufender Untersuchungen sowie auch zentrales Thema dieser Arbeit.

#### **1.10. Prostaglandinanaloga – eine potente Substanzklasse in der modernen Glaukomtherapie**

Prostaglandine (PG) sind von der Arachidonsäure abgeleitete Gewebshormone aus der Gruppe der Eicosanoide, die äußerst kurzlebig sind und in fast allen Geweben von Säugetieren und



Menschen gebildet werden. Man unterscheidet verschiedene Unterformen der Prostaglandine, die sich in Struktur, Vorkommen, Wirkung und Regulation voneinander unterscheiden (z.B.  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ). Ihre Wirkung wird über G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren vermittelt. Diese unterscheiden sich untereinander durch die Affinität für bestimmte Prostaglandine, wodurch die einzelnen Rezeptor-Subtypen mit entsprechender Bezeichnung hervorgehen (z.B. FP-, IP-, EP-Rezeptor). Die Prostaglandine sind in ihrer Wirkung sehr komplex, da die Wirkungsweise von Unterform zu Unterform stark variiert und teilweise sogar für ein Prostaglandin durch verschiedene Rezeptoren unterschiedlich vermittelt wird. Sie nehmen Einfluss auf zahlreiche Vorgänge im Organismus, unter anderem auf die Vasodilatation, auf Schmerzzustände und Entzündungen [62, 63].

Am Auge ist die Wirkung der Prostaglandine als Botenstoff einer Entzündung seit Jahren bekannt. Man weiß, dass sie bei entzündlichen Krankheitszuständen im Augeninneren wie einer Uveitis oder Iritis massiv erhöht exprimiert werden. Ihre Bedeutung als potente Antiglaukomatosa blieb jedoch lange Zeit unerkannt. Das änderte sich 1977, als Camras et al. durch Untersuchungen an Kaninchenaugen entdeckten, dass bereits geringe Mengen von Prostaglandinen den IOD langanhaltend senken können [64]. Damit begann die Entwicklung einer neuen Klasse von Pharmaka für die Glaukombehandlung. Zahlreiche Untersuchungen an anderen Tiermodellen und schließlich die Anwendung am Menschen folgten mit dem Ergebnis, dass Prostaglandine bzw. ihre Derivate heute neben den  $\beta$ -Blockern zu der sogenannten „first-line-therapy“ gerechnet werden. Ursache dafür ist ihre äußerst effektive IOD-Senkung (bis zu 30 %) bei niedriger Dosierung und dadurch geringerer Nebenwirkungsrate [19]. In den letzten Jahren wurden verschiedene Prostaglandin-Analoga, hauptsächlich Agonisten des Prostaglandin- $\text{F}_{2\alpha}$ -Rezeptors (FP-Rezeptor) wie Latanoprost, Travoprost und Bimatoprost erfolgreich in der Therapie des Glaukoms eingesetzt [65-68], weitere sind derzeit noch in Entwicklung.

Obwohl die Prostaglandin-Analoga zu den am häufigsten verabreichten Antiglaukomatosa gehören, ist der genaue Wirkmechanismus, der zur IOD-Senkung führt, noch immer nicht hinreichend geklärt. Zahlreiche Untersuchungen sprechen dafür, dass Prostaglandine über die Verbesserung des uveoskleralen Kammerwasserabflusses zu einer Senkung des IOD führen. Wie bereits erwähnt, macht der uveosklerale Abfluss jedoch nur etwa 15 % des gesamten Kammerwasserabflusses aus. Bei einer so effektiven IOD-Senkung, wie sie durch die Prostaglandin-Analoga erzielt wird, liegt die Vermutung nahe, dass neben dem uveoskleralen auch der konventionelle Abflussweg durch die Prostaglandine beeinflusst wird.

### 1.11. Fragestellung

Es ist anzunehmen, dass die effektive Drucksenkung des Augeninnendrucks durch die Prostaglandin-Analoga vermutlich nicht allein auf eine Erhöhung des uveoskleralen Abflusses zurückzuführen ist. Daher wird in dieser Arbeit der Einfluss dieser Substanzklasse auf den konventionellen Abfluss untersucht. Speziell wird hier die Wirkungsweise des bereits therapeutisch genutzten  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogs Travoprost® (= Fluprostenol), eines sehr selektiven Agonisten mit hoher Bindungsaffinität zum Prostaglandin-FP-Rezeptor, auf die kontraktile Eigenschaften des Trabekelmaschenwerks analysiert. Es soll geprüft werden, ob Travoprost® einen Endothelin-antagonisierenden Effekt auf die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks ausübt, wie er bereits für das synthetische Docosanoid Unoprostone und für  $\text{PGF}_{2\alpha}$  selbst beschrieben wurde [69, 70]. Weiterhin soll untersucht werden, ob dieser Effekt der Prostaglandin-Analoga auch die Calcium-unabhängige Kontraktion des Trabekelmaschenwerks betrifft. Zusammenfassend sollen mit dieser Arbeit die bestehenden Kenntnisse in Bezug auf die Wirkmechanismen der Prostaglandine am Auge erweitert und vertieft werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Kontraktionsmessungen

#### 2.1.1. Deskription und Präparation des Gewebematerials

Für die Direktmessung der Kontraktilität wurden ausschließlich bovine Augen verwendet, die von einem örtlichen Schlachthof bezogen wurden. Da die Tiere für den menschlichen Verzehr bestimmt waren, kann man aufgrund von strenger Qualitätsprüfung durch dafür zuständige Behörden davon ausgehen, dass die Tiere in gutem gesundheitlichen Zustand waren. Das Alter der Tiere, deren Augen verwendet wurden, lag zwischen zwei und vier Jahren.

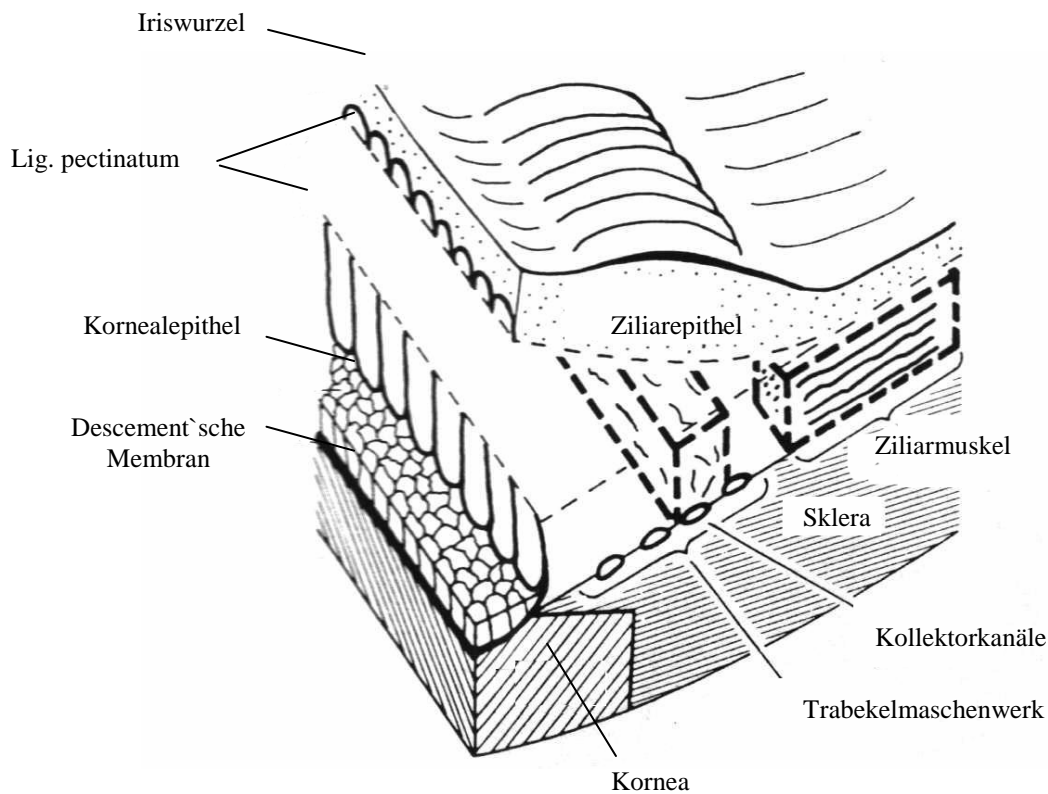
Während die Kontraktilität des Ziliarmuskels verschiedener Säugetierarten, auch dem des Menschen, schon vor langem und von mehreren Arbeitsgruppen untersucht wurde [71, 72], wurden Direktmessungen an isolierten Trabekelmaschenwerkstreifen erstmals 1991 von Lepple-Wienhues et al. erfolgreich durchgeführt [39]. Bedingt durch die enge anatomische Verbindung zwischen Ziliarmuskel und Trabekelmaschenwerk in Augen von höheren Primaten [73, 74], benutzte die Arbeitsgruppe Wiederholt et al. für ihre Messungen das bovine Modell. Es eignet sich aus mehreren Gründen besonders gut für Kontraktionsmessungen am Trabekelmaschenwerk.

Zum einen ist hier die anatomische Trennung von Ziliarmuskel und Trabekelmaschenwerk leichter, da diese getrennt voneinander vorliegen. Anders als im menschlichen Auge strahlen hier keine Fibrillen des Ziliarmuskels in das Trabekelmaschenwerk ein und verursachen somit keine „Kontamination“ des Trabekelmaschenwerks durch Ziliarmuskelgewebe. Der Grund dafür ist, dass im bovinen Modell der Ziliarmuskel lediglich rudimentär vorhanden ist und das Trabekelmaschenwerk ein retikuläres Maschenwerk darstellt [29, 73]. Zum anderen sind die bovinen Trabekelmaschenwerkstreifen im Gegensatz zu humanem Gewebe größer und können damit ausreichend Kraft entwickeln, um eine messbare isometrische Kontraktion auszulösen, die von der empfindlichen Messapparatur registriert werden kann. Dazu wäre das native Gewebe des humanen Trabekelmaschenwerks nicht in der Lage. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Experimente an isolierten Trabekelmaschenwerkstreifen durchgeführt, da die Wirkung bestimmter Agenzien auf eben diese Gewebeart von Interesse war.

Die verwendeten Rinderaugen wurden direkt nach der Schlachtung auf Eis gekühlt ins Labor transportiert und dort anschließend nach folgender Methode [25] sofort präpariert:

Das periorbitale Fettgewebe sowie die äußeren Augenmuskeln wurden sorgfältig mit Schere und Pinzette vom Bulbus entfernt und das Auge danach durch einen zirkulären Schnitt circa 10 mm hinter dem Limbus corneae in zwei Hälften geteilt. Während die hintere Hälfte samt anhaftendem Glaskörper gleich verworfen wurde, entfernte man von der vorderen vorsichtig mit einer Pinzette Glaskörperreste und Linse, um diese Hälfte dann mit einem Skalpell auf fester Unterlage in vier etwa gleich große Sektoren zu teilen. Dabei wurde der Schnitt strahlenförmig von der schlitzförmigen Iris ausgehend nach distal geführt. Die weitere Präparation der einzelnen Viertel erfolgte unter mikroskopischer Sicht, wobei der zu präparierende Sektor mit Nadeln so auf einer festen Platte fixiert wurde, dass die Kornea nach unten wies. Die Iris wurde vorsichtig mit einer Pinzette angehoben und ohne Zug auszuüben in Richtung der Kornea umgeschlagen, wodurch das Ligamentum pectinum sichtbar wurde, das beim bovinen Auge die Iriswurzel am korneoskleralen Übergang fixiert. Das Irisepithel geht an der Iriswurzel in das Ziliarkörperepithel über, unter dem sich das Trabekelmaschenwerk- und Ziliarmuskelgewebe befindet. Um diese Strukturen freizulegen, wurde das Ligamentum durchtrennt und im Anschluss daran das sich dahinter befindliche Ziliarkörperepithel durch feine, horizontale Schnitte mit einem Skalpell vom darunter befindlichen Trabekelmaschenwerkgewebe gelöst. Letzteres imponiert als grau-weiße, wollartige Struktur und lässt sich somit leicht gegen das Epithel abgrenzen. Durch einen leichten Zug am freipräparierten Ziliarkörperepithel wurde nun die blauschwarze, untere Schicht des Ziliarmuskels sichtbar. Die obere Schicht blieb dabei mit dem Ziliarkörperepithel und der Iris verbunden und wurde abpräpariert und verworfen. Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel waren nun gut sichtbar und aufgrund der unterschiedlichen Farbe und dem Faserverlauf deutlich voneinander abgrenzbar. Der Ziliarmuskel, dessen Fasern im Gegensatz zum Trabekelmaschenwerk vertikal zum Kornearand verlaufen, wurde abschließend durch einen sauberen Schnitt an der Grenze zum Trabekelmaschenwerk von diesem getrennt und entfernt. Die benötigten Trabekelmaschenwerkstreifen wurden parallel zum Kornearand aus der Mitte des Trabekelmaschenwerks herausgeschnitten, sodass ein 0,5 – 1 mm breiter und 8 – 12 mm langer Streifen entstand, der je nach Länge durch einen vertikalen Schnitt in zwei bis drei Segmente mit einer Mindestlänge von 4 - 5 mm geteilt wurde. Die fertig präparierten Gewebestreifen wurden anschließend bis zum Versuchsbeginn in mit Ringerlösung gefüllten Petrischalen auf Eis gelegt und in einem Kühlschrank aufbewahrt.

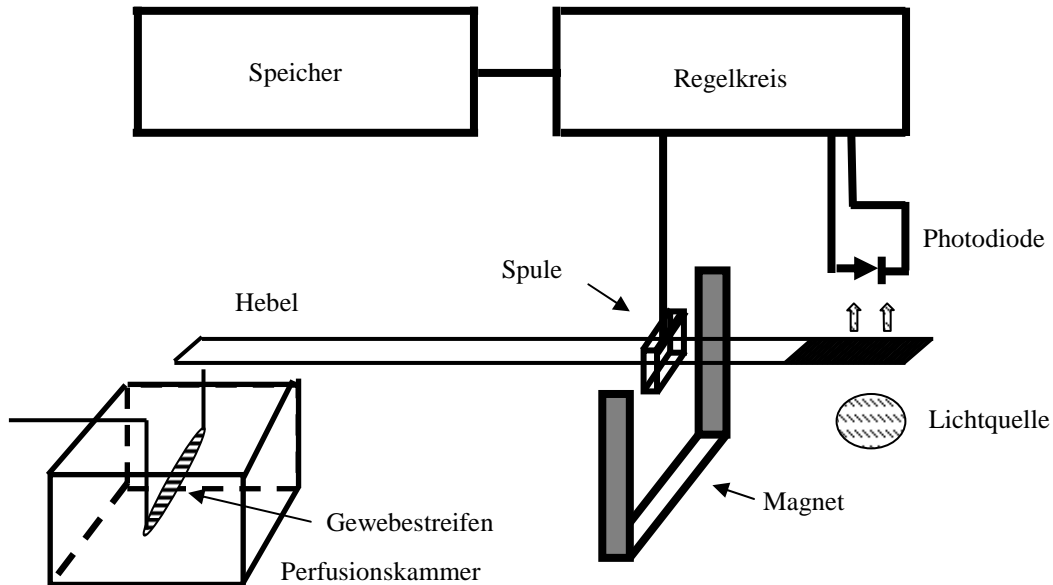
Abbildung 2.1. gibt einen Einblick in die Anatomie des bovinen Kammerwinkels und in die Schnittführung zur Präparation von Ziliarmuskel und Trabekelmaschenwerk.



**Abb. 2.1.** : Schema des bovinen Kammerwinkels mit Illustration der Schnitfführung zur Präparation von Ziliarmuskel- und Trabekelmaschenwerkstreifen (aus: Lepple-Wienhues et al., 1991a, [25]).

### 2.1.2. Versuchsapparatur

Die verwendete Messvorrichtung bestand aus einem Perfusionssystem und einem System zur Tonusmessung, einem sogenannten Kraft-Längenmesser (Force-Lenght-Traducer) [25] ähnlich dem, wie er von Brutsaert et al. [75] beschrieben wurde. Mit dem Tonusmessgerät konnte die isometrische Kontraktion von Trabekelmaschenwerkstreifen in einem Messbereich von 0,5 – 2000  $\mu\text{N}$  erfasst werden. Ausgelöst wurden die jeweiligen Gewebskontraktionen durch Zugabe bestimmter stimulierender Substanzen und der zu untersuchenden Pharmaka. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines die Anlage steuernden Computers aufgezeichnet. Ein Schema der Messapparatur lässt sich aus der Abbildung 2.2. entnehmen.



**Abb. 2.2.:** Schematischer Aufbau eines Kraft-Längen-Messers der Messapparatur zur Kontraktionsmessung (abgewandelt nach: Lepple-Wienhues et al., 1991a, [25]).

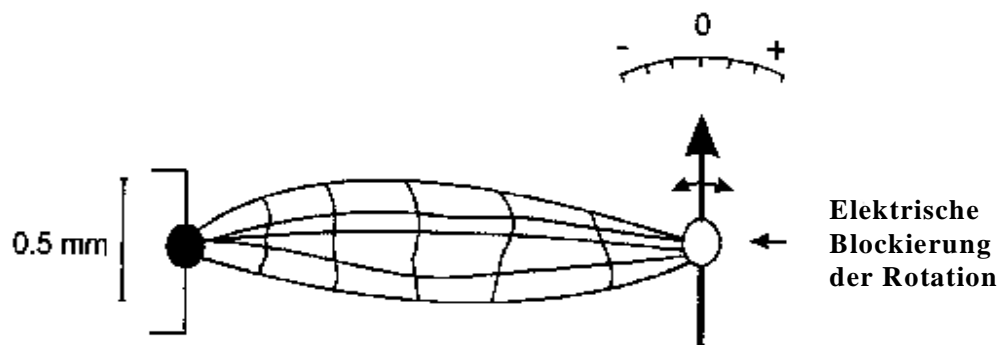
Das Perfusionssystem, bestehend aus sieben Gewebekammern, machte es möglich, die in den Kammern inkubierten Gewebestreifen verschiedenen Lösungen auszusetzen. Dafür wurden die einzelnen Trabekelmaschenwerkstreifen mit einem Gewebekleber (Histoacryl, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) zwischen zwei Nadeln des Kraft-Längenmessers gespannt und in die jeweilige Perfusionskammer von 2 ml Volumen eingetaucht. Jede dieser Kammern wurde mit circa 4,6 ml/min Perfusionslösung durchspült, ohne dass dabei erwähnenswerte Strömungsturbulenzen entstanden. Der Strömungsfluss wurde durch eine gemeinsame Rollerpumpe (Ismatec, Zürich, Schweiz) gewährleistet. Über das daran angeschlossene Schlauchsystem wurden alle sieben Kammern gleichmäßig und nahezu zeitsynchron mit der jeweiligen Lösung perfundiert. Wurde auf eine andere Lösung umgeschaltet, so wurde das Kammervolumen bei dem oben erwähnten Perfusionsfluss nach etwa 45 Sekunden ausgetauscht. Sowohl die Perfusionskammern als auch die Schläuche waren doppelwandig. Diese Ummantelung sorgte für eine kontinuierliche Durchspülung mit 37 °C warmem Wasser, wodurch das Temperaturniveau der Perfusionslösung konstant gehalten werden konnte.

Der Kraft-Längenmesser, mit dem die Direktmessung der Kontraktilität erfolgte, entspricht einem umgebauten Drehspulelement. Von den zwei Nadeln, zwischen denen die Trabekelmaschenwerkstreifen eingespannt wurden, war eine fixiert, die andere war beweglich und mit

einem Kraft-Längen-Wandler, dem langen Hebel einer feinen Drehspule, verbunden. Der kürzere Hebel stellte die Lichtschranke zwischen einer Lichtquelle und einer Photodiode dar und bewirkte dadurch eine positionsabhängige Verschattung der letztgenannten. Eine Kontraktion oder Relaxation der Gewebestreifen führte zur Auslenkung des Hebels, woraus eine Rotation der Drehspule resultierte, die von der Photodiode registriert wurde. Diese Rotation wurde in einen Strom umgerechnet, der der auftretenden Kraft entgegenwirkte und somit die Länge der Gewebestreifen konstant hielt. Die für die Gegenreaktion aufgewendete Stromstärke wurde auf Mikronewton kalibriert, was eine Direktmessung der Kontraktion ermöglichte. Dabei konnten Längenänderungen von weniger als  $10 \mu\text{N}$  wahrgenommen werden. Auf diese Weise entstand ein Protokoll des Muskeltonus der verwendeten Trabekelmaschenwerkstreifen, das über einen Analog-Digital-Wandler (BMC Systeme GmbH, Deutschland) alle 15 Sekunden von einem Computer aufgezeichnet wurde. Das Messprinzip wird in der Abbildung 2.3. noch einmal verdeutlicht.

• **Kraft-Längen-Wandler**

• **Isometrische Kontraktion**



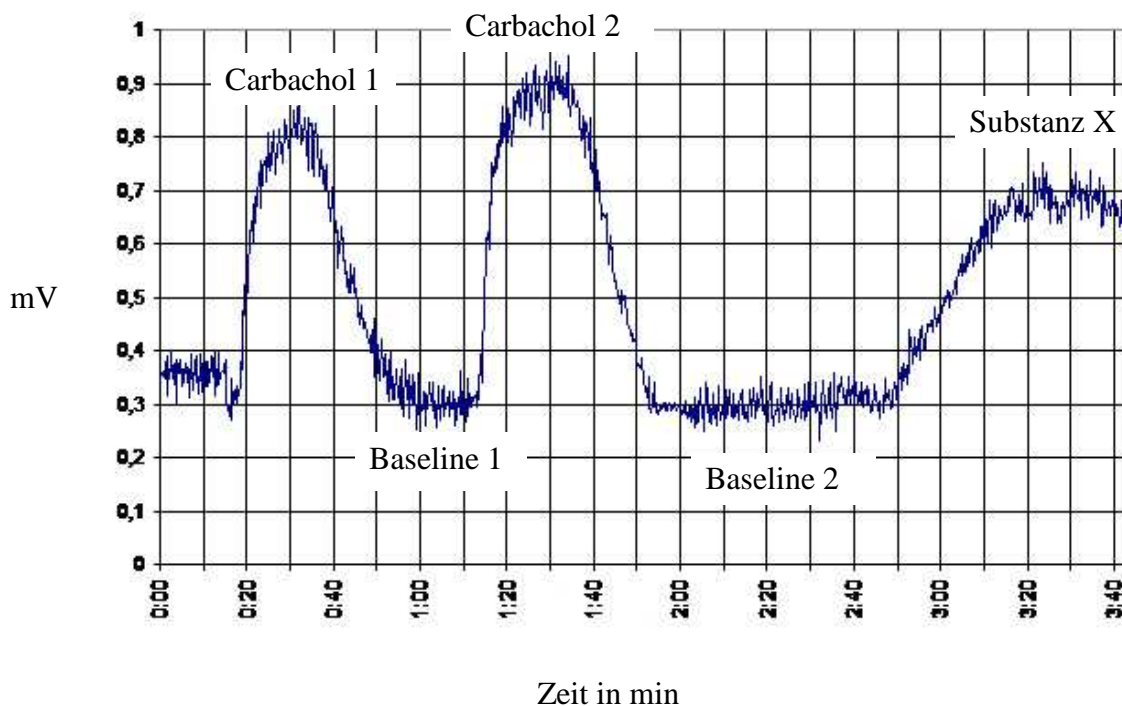
**Isolierter Trabekelwerk-Gewebestreifen (4-5mm)**

**Abb. 2.3.:** Schematische Darstellung der Messung isometrischer Kontraktionen. Bei der Messung wird der Strom gemessen, der benötigt wird, den Zeiger auf „Null“ zu halten. Dadurch sind geringste Kraftgrößen in Mikronewton messbar (aus: Wiederholt et al., 2000 [13]).

### 2.1.3. Versuchsablauf

Die Trabekelmaschenwerkstreifen wurden in den Kraft-Längenmesser eingeklebt und auf ca. 50 – 100  $\mu\text{N}$  vorgespannt. Dann wurden sie in die Perfusionskammern getaucht, die vor Versuchsbeginn mit Ringerlösung gespült wurden. Dem Einspannen folgte eine mindestens 60-minütige Äquilibrationsphase mit Ringerlösung, die, wie alle im Versuch verwendeten Lösungen, auf  $37^\circ\text{C}$  angewärmt und mit 5 %  $\text{CO}_2$  in Luft begast wurde, um den pH-Wert der Lösung konstant bei 7,4 zu halten.

Der Computer zeichnete diesen Tonus-Grundzustand als sogenannte „Baseline“ auf. In die Versuchsauswertung wurden nur Gewebestreifen einbezogen, die über diesen Zeitraum einen stabilen Basistonus aufwiesen. Zu Beginn jedes Versuchs wurden die Gewebestreifen zwei Mal hintereinander mit Carbachol in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M stimuliert und dadurch eine maximale Kontraktion ausgelöst. Der resultierende Kontraktionseffekt wurde auf die zweite Carbacholapplikation auf 100 % gesetzt und diente als Referenzwert für alle weiteren Messungen (siehe Abb. 2.4.).



**Abb. 2.4.:** Beispiel einer Kontraktionskurve. Dabei wurde die Kontraktion der zu testenden Substanz X ins Verhältnis zur Maximalkontraktion von Carbachol  $10^{-6}$  M (= 100 %) gesetzt.



Die Kontraktionsänderungen der zu untersuchenden Substanzen wurden prozentual auf diese Vorkontraktion bezogen. Zudem diente die Vorkontraktion mit Carbachol dazu, die Unversehrtheit und damit Kontraktionsfähigkeit der jeweiligen Gewebestreifen zu überprüfen. Anschließend wurde Carbachol ausgewaschen, der Grundzustand dadurch wieder hergestellt und die Gewebeproben konnten auf Kontraktionseffekte anderer Substanzen untersucht werden.

#### 2.1.4. Versuchsauswertung und Statistik

Für die Versuche wurde jeweils nur ein Auge pro Rind verwendet, sodass die Zahl der Augen der Anzahl der untersuchten Individuen entspricht. Die Präparation der Augen erfolgte nach standardisiertem Schema. Trotz standardisierter Präparation ließen sich Unterschiede in Qualität, Dicke und Länge der Gewebstreifen nicht vermeiden. Um die einzelnen Versuchsergebnisse dennoch miteinander vergleichen zu können, wurden die nach Vorkontraktion durch Carbachol gemessenen Werte ins Verhältnis zu dieser maximalen Referenzkonzentration gesetzt. Die Ergebnisse sind deshalb als relative Werte in Prozent angegeben.

Mit Hilfe des Excel-Programms wurden die vom Computer aufgezeichneten und gespeicherten Daten in ein Kurvendiagramm umgewandelt (siehe Abb. 2.4.).

Die Messwerte werden als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of mean) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Student-t-Test, bei einer multiplen Testung wurde die Bonferroni-Korrektur angewandt. Eine Signifikanz der Ergebnisse bestand bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  (\*), sehr signifikant waren  $p$ -Werte  $< 0,01$  (\*\*), hoch signifikant solche mit  $p < 0,001$  waren (\*\*\*).

#### 2.1.5. Verwendete Lösungen und Pharmaka

Für den oben beschriebenen Versuchsvorgang wurden folgende Lösungen und Pharmaka verwendet:

- Ringerlösung, die die Grundlage aller weiteren Lösungen bildete und sich zusammensetzte aus (in mM): 151  $\text{Na}^+$ ; 5  $\text{K}^+$ ; 1,7  $\text{Ca}^{2+}$ ; 0,9  $\text{Mg}^{2+}$ ; 131  $\text{Cl}^-$ ; 0,9  $\text{SO}_4^{2-}$ ; 1  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ; 28  $\text{HCO}_3^-$  und 5 Glucose
- Calcium-freie Ringerlösung, die mit EGTA ( $10^{-5}\text{M}$ ) und mit BAPTA-AM ( $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$ ) (Sigma, Deisenhofen Deutschland) versetzt wurde.

Allen Lösungen wurden kontinuierlich mit 5 % CO<sub>2</sub> in Luft begast, um den pH-Wert konstant bei 7,4 zu halten.

Folgende, die jeweiligen Fragestellungen betreffende Pharmaka, wurden den Versuchslösungen zugesetzt:

- Carbachol (10<sup>-6</sup>M); (Sigma Deisenhofen Deutschland)
- Endothelin-1 (10<sup>-8</sup>M); (Alexis Deutschland GmbH, Grünberg)
- Fluprostenol (=Travoprost) (10<sup>-6</sup>M); (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)
- PGF<sub>2α</sub> (10<sup>-6</sup>M); (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)
- AL – 8810 (10<sup>-6</sup>M); (Sigma Aldrich, Deutschland)

## **2.2. Calciummessungen**

### **2.2.1. Zellkulturen**

Für die Calciummessungen wurden kultivierte Zellen des bovinen Trabekelmaschenwerks verwendet. Die Gewebepreparation zur Gewinnung des Trabekelmaschenwerks erfolgte nach bereits beschriebener Methode [25]. Dafür galten dieselben Rahmenbedingungen wie auch für die Kontraktionsmessungen.

Die präparierten Gewebeproben wurden anschließend in Petrischalen unter Deckgläschen bei 37°C mit einem speziellen Kulturmedium inkubiert. Dieses setzte sich zusammen aus Dulbecco's Modification of Eagle's minimal essential Medium (DMEM) ergänzt mit 20 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Ein Gemisch aus 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> sorgte unter sterilen Bedingungen für eine konstante Begasung der Zellkulturen. Das verwendete Nährmedium wurde regelmäßig zwei Mal wöchentlich erneuert.

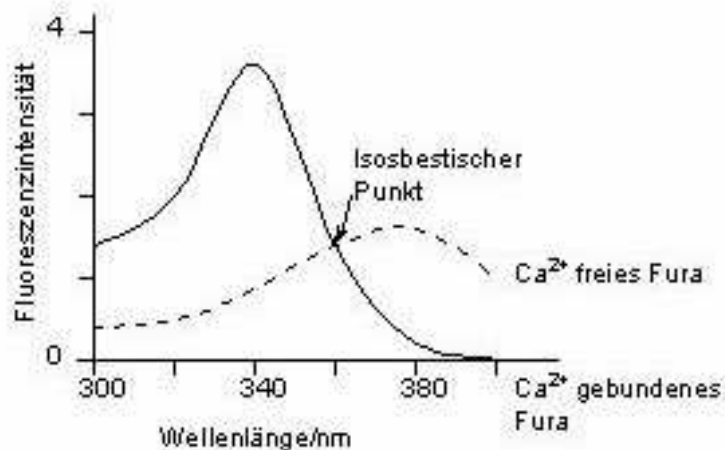
Die Calciummessungen wurden nicht an Primärkulturen durchgeführt, sondern an passagierten Zellen. Sobald die Konfluenz bei Anwachsen der Zellen nach ungefähr 6 – 8 Wochen erreicht war, wurden die Zellen nach der Trypsin-EGTA-Methode von den initialen Petrischalen abgelöst. Dabei wurden Calcium- und Magnesiumionen durch das EGTA als Chelatkomplexbildner gebunden und somit die Entfaltung der proteolytischen Wirkung des Enzyms Trypsin ermöglicht. Die Zellen wurden nach der Isolierung aus dem Zellverband auf mehrere neue Petrischalen aufgeteilt und erneut im Brutschrank kultiviert. Für die Versuche wurden die Zellen nach drei bis fünf Passagen verwendet. Die Zellen lagen semikonfluent und ein-

schichtig vor. Zellen höherer Passagen wurden nicht mehr benutzt, da dadurch eine Dedifferenzierung der Zellen zunehmend wahrscheinlicher wurde.

### 2.2.2. Grundlagen der Calciummessmethode mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM

Grynkiewicz et al. [76] entwickelten 1985 den synthetischen Fluoreszenzfarbstoff Fura-2, dessen Struktur sich von den Calcium-Chelatoren EGTA und BAPTA ableitet und der ebenso Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) bindet. Die Bindung der freien  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgt reversibel und konzentrationsabhängig. Dadurch sind Änderungen der Konzentration des freien zytosolischen Calciums einfach zu verfolgen. Fura-2 erlaubt somit eine einfache und zuverlässige Messung von intrazellulärem Calcium ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) und ist deswegen der am häufigsten dafür eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff. Das Fluorophor wurde als Acyetoxyethyl-Ester (AM) verwendet, es ist in dieser Form lipophil und damit membrangängig. Bei der Inkubation der Zellen mit Fura-2-AM diffundiert die Substanz durch die Zellmembran und der Ester wird intrazellulär durch unspezifische Esterasen abgespalten. Der Farbstoff liegt nun als hydrophiles und damit membranimpermeables Fluorophor vor. Er kann die Zelle nicht mehr verlassen und reichert sich im Zytosol der Zelle an.

Fura-2 zeichnet sich im Besonderen durch seine hohe Calciumselektivität und hohe Fluoreszenzintensität, sowie durch eine geringe Pufferkapazität für  $\text{Ca}^{2+}$  aus. Die Fluoreszenzintensität ist abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Wellenlänge des anregenden Lichts, wobei der  $\text{Ca}^{2+}$ -beladene Farbstoff andere Fluoreszenzeigenschaften aufweist als der  $\text{Ca}^{2+}$ -freie. Maximal  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes Fura-2 erreicht bei einer Anregung mit Licht von 340 nm Wellenlänge sein Maximum an Fluoreszenz, während  $\text{Ca}^{2+}$ -freies Fura-2 eine maximale Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm aufweist (s. Abb. 2.5.). Somit nimmt die Fluoreszenzintensität mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei 340 nm zu, bei 380 nm jedoch ab und umgekehrt. Das Verhältnis des bei den genannten Anregungswellenlängen emittierten Lichtes spiegelt die Änderungen der freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wider. Zwischen diesen Maxima liegt bei 361 nm der sogenannte isobestische Punkt, der die Wellenlänge bezeichnet, bei der die Fluoreszenzintensität unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist.



**Abb. 2.5.:** Darstellung der Fluoreszenzeigenschaften des Calcium-sensitiven Farbstoffs FURA-2. Der isosbestische Punkt bezeichnet die Wellenlänge, bei der die Fluoreszenzintensität unabhängig von der Calciumkonzentration ist. Für Fura-2 liegt diese Wellenlänge bei 361 nm [77].

### 2.2.3. Grundlagen der Berechnung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die Fluoreszenzintensität von Fura-2 ist neben der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auch abhängig von weiteren Faktoren wie zum Beispiel dem Ausbleichen des Farbstoffs durch das anregende Licht, der Farbstoffkonzentration in der Zelle oder durch Verlust von Fura-2 durch Exozytose. Um eine weitgehende Unabhängigkeit von diesen Einflüssen zu erreichen, setzten Grynkiewicz et al. die Fluoreszenzintensitäten nach dualer Anregung als Quotienten in Beziehung zueinander (englisch *Ratio*). In den hier beschriebenen Versuchen wurde Fura-2 mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm angeregt. Änderungen des Verhältnis  $R_{340/380}$  ( $\text{Ratio}_{340/380}$ ) waren gleichbedeutend mit Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die absoluten Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ließen sich mit der Dissoziationskonstante und folgender Gleichung nach Grynkiewicz berechnen:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \cdot \frac{Sf_2}{Sb_2},$$

$R_{\min}$  entspricht dabei dem Quotienten aus den Fluoreszenzintensitäten unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen ( $\text{Ratio}_{340/340}$ ),  $R_{\max}$  stellt entsprechend die maximale Ratio dar, bei der der gesamte

Farbstoff mit  $\text{Ca}^{2+}$  gesättigt vorliegt ( $\text{Ratio}_{380/340}$ ) und R steht für den jeweiligen Quotient der Fluoreszenzintensität bei den Anregungswellen 340 nm und 380 nm ( $\text{Ratio}_{340/380}$ ).

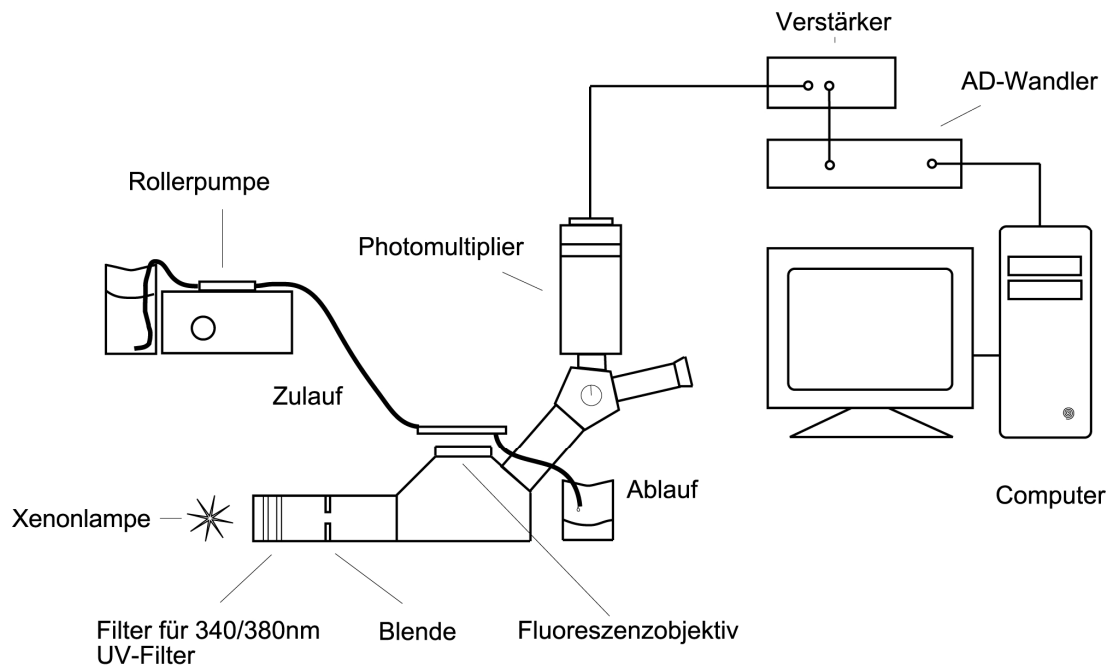
Die  $K_d$  ist die Dissoziationskonstante für Fura-2 (nach Grynkiewicz 135 nM in 100 mM KCl; 20°C; pH 7,1-7,2),  $Sf_2$  die Fluoreszenzintensität des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Farbstoffs bei der Wellenlänge  $\lambda_2 = 380\text{nm}$  und  $Sb_2$  die Fluoreszenzintensität des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Fura-2 bei ebenfalls  $\lambda_2 = 380\text{nm}$ . Die Werte für  $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$ ,  $Sf_2$  und  $Sb_2$  mussten zuvor durch die unten beschriebene Kalibration ermittelt werden.

#### 2.2.4. Versuchsaufbau

Der sich aus mehreren Geräten zusammensetzende Calciummessstand umfasst unter anderem eine Xenonlampe (Osram XPO 75 W/2), die mittels eines schnell rotierenden Filters (6 / sec) Licht von 340 nm und 380 nm Wellenlänge zur Anregung des Farbstoffes erzeugt. Das Licht der fluoreszenzanregenden Wellenlängen wurde anschließend über ein Fluoreszenzobjektiv (Plan-Neofluar, 20x; 0,50 Zeiss) des Inversmikroskops (Zeiss Axiovert 100) durch eine Blende auf die Zellgruppen fokussiert.

Das von den mit Farbstoff beladenen Zellen ausgesandte Fluoreszenzsignal wurde von einem Photomultiplier bei 510 nm (Hamamatsu 928 SF) gemessen. Die Registrierung der Signale erfolgte über einen Verstärker (Dual Wavelength Photometer; Luigs & Neumann, Ratingen). Anschließend wurden die Signale von einem AD/DA Wandler (HEKA Electronics; Patch Clamp EPC 9; Lambrecht) digitalisiert und waren somit für den Computer nutzbar. Sie wurden als Datenfile aufgezeichnet und konnten dann mit Hilfe des Programms TIDA für Windows ausgewertet werden. Die gemessenen Fluoreszenzantworten für 340 nm und 380 nm wurden dabei getrennt aufgezeichnet. Im TIDA-Programm wurde abschließend der Quotient beider Fluoreszenzantworten berechnet und die gesuchte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ermittelt.

Die mit Fura-2 beladenen Zellen befanden sich auf einem Deckgläschen, welches in die Mitte einer Perfusionskammer eingebracht wurde, über der sich das inverse Mikroskop befand. Eine an der Hinterseite der Kammer befindliche Rollerpumpe führte dem System kontinuierlich die jeweiligen Lösungen zu und sorgte für einen Lösungsaustausch innerhalb von Sekunden sowie einen konstanten Flüssigkeitsspiegel in der Perfusionskammer. Der Abfluss erfolgte über die Kammervorderseite. Die Abbildung 2.6. zeigt schematisch den Aufbau des beschriebenen Versuchsaufbaus.



**Abb. 2.6.:** Schematische Darstellung des Fura-Messstandes

### 2.2.5. Versuchsdurchführung

Die verwendeten Zellkulturen sollten im optimalen Fall etwa 14 Tage alt und semikonfluent bis konfluent sein. Die Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen, unter dem Mikroskop auf Konfluenz überprüft und mit Ringerlösung gespült. Anschließend folgte die 30-minütige Inkubation der Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  Fura-2-AM bei Raumtemperatur und unter maximal abgedunkelten Verhältnissen. Während der Inkubationszeit wurde der Messstand vorbereitet und ein zellbeladenes Deckgläschen ohne Fura-Inkubation in die Versuchskammer eingebracht, um das Messgerät abzugleichen und an die Lichtverhältnisse anzupassen.

Nach dem Abgleich musste darauf geachtet werden, dass die Lichtverhältnisse im Raum konstant blieben. Der Versuchsraum sollte dabei so dunkel wie nur möglich gehalten werden, um Streulicht und ein Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden. Dann wurden die inkubierten Zellen für eine weitere halbe Stunde in der Perfusionskammer mit Ringerlösung gespült, um extrazelluläre Fura-Reste auszuwaschen. Danach konnte mit dem Versuch begonnen werden. Zuerst wurde die Ruhe- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ermittelt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Substanzen zugeführt und die resultierenden Fluoreszenzsignale kontinuierlich auf dem Computer aufgezeichnet.

Am Ende eines Versuches wurde dann eine Kalibrierung mit entsprechenden Eichlösungen durchgeführt, um die absolute  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Zellen ermitteln zu können. Hierfür erfolgte zunächst eine Spülung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung (mit 10 mM EGTA versetzt), bis ein stabiles Signal erreicht war. Danach wurde den Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Ringerlösung mit Ionomycin ( $10^{-5}$  M) appliziert. Ionomycin ist ein Calcium-Ionophor und erhöht durch Porenbildung die Calcium-Permeabilität der Zellmembran. Konsekutiv diffundiert Calcium entlang seines Gradienten in den Extrazellulärraum, wo es dann durch EGTA gebunden wird. Dabei werden auch die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher weitgehend entleert, so dass Fura in der Zelle nahezu  $\text{Ca}^{2+}$ -frei vorliegt und  $R_{\min}$  ermittelt werden kann.

Im Anschluss daran wurde  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige Ringerlösung mit Ionomycin appliziert, das heißt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Extrazellulärlösung befand sich durch die Porenbildung nun auch intrazellulär. Unter diesen Bedingungen lag Fura-2 in der Zelle  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigt vor und  $R_{\max}$  konnte berechnet werden.

#### 2.2.6. Versuchsauswertung und Statistik

Die Auswertung der Versuche, deren Gesamtzahl mit  $n = x$  angegeben wurde, erfolgte über das vorher erwähnte TIDA-Programm. Dort wurden die einzelnen Versuche abgespeichert und konnten mit Hilfe des Programms analysiert werden.  $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$  sowie  $Sf_2$  und  $Sb_2$  wurden dafür vorher aus den Eichungs- bzw. Registrierungskurven abgelesen und dann in die Gleichung von Grynkiewicz eingesetzt. Resultat dessen war eine Kurve, aus der die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsverlauf abgelesen werden konnte.

Um die Wirkung der einzelnen Substanzen auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu ermitteln, wurde die Ruhe- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als 100 % gesetzt und die maximale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die nach Applikation der Substanzen erreicht wurde, dazu in Bezug gesetzt.

Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of mean) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte wie auch bei den Kontraktionsmessungen mit dem t-Test nach Student. Eine Signifikanz bestand wie üblich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ , wobei auch hier bei den Abbildungen gilt:  $p < 0,05$ (\*);  $p < 0,01$ (\*\*) und  $p < 0,001$ (\*\*\*).

### 2.2.7. Verwendete Lösungen und Pharmaka

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

Stammlösungen : HEPES-gepufferte Ringerlösung (Konzentration in mM): 151 Na<sup>+</sup>; 5 K<sup>+</sup>; 1,7 Ca<sup>2+</sup>; 0,9 Mg<sup>2+</sup>; 156,7 Cl<sup>-</sup>; 0,9 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; 1 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>; 10 HEPES und 5 Glucose  
Fura-2-AM wurde wie auch Ionomycin in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Beide Substanzen lagen in einer Endkonzentration von 10<sup>-5</sup> M vor.

Eichlösungen : Ca<sup>2+</sup>-freie Lösung entspricht in ihrer Zusammensetzung der Extrazellulärlösung ohne die Zugabe von Calcium sowie zusätzlich 10 mM EGTA und 10<sup>-5</sup> M Ionomycin  
: Ca<sup>2+</sup>-haltige Lösung entspricht in ihrer Zusammensetzung der Extrazellulärlösung sowie zusätzlich 10<sup>-5</sup> M Ionomycin

Alle hierfür verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma bezogen.

Folgende Pharmaka wurden der Extrazellulärlösung während der jeweiligen Versuche in den angegebenen Konzentrationen hinzu gegeben:

- Endothelin-1 (10<sup>-8</sup>M); (Alexis Deutschland GmbH, Grünberg)
- Fluprostenol (=Travoprost®) (10<sup>-6</sup>M); (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)
- PGF<sub>2α</sub> (10<sup>-6</sup>M); (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)
- AL-8810 (10<sup>-6</sup>M); (Sigma Aldrich, Deutschland).



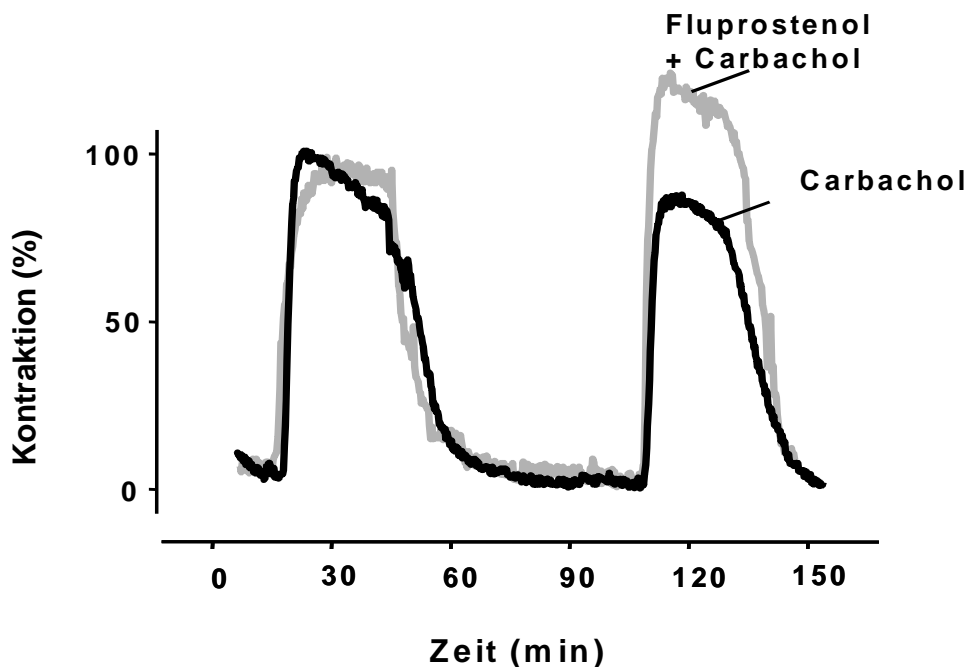
### 3. Versuchsergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse zur Wirkung von Fluprostenol auf die Kontraktion im bovinen Trabekelmaschenwerk (BTM)

##### 3.1.1. Die Wirkung von Fluprostenol auf die Carbachol-induzierte Kontraktion des BTM

Carbachol ist ein Parasympathomimetikum mit direkter Wirkung auf Muscarinrezeptoren. Es induziert im bovinen Trabekelmaschenwerk in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M eine maximal mögliche Kontraktion. Die Carbachol-induzierte Kontraktion diente bei allen durchgeführten Kontraktionsmessungen als Referenzwert für weitere Kontraktionen im Versuchsverlauf.

Das Prostaglandin-Analogon Fluprostenol (Fluprostenol-Isopropylester = Travoprost) ist ein Agonist des Prostaglandin F – Rezeptors (FP-R). In folgendem Versuch wurde der Effekt von Fluprostenol auf die Carbachol-induzierte Kontraktion im BTM untersucht. Dazu wurden die Gewebestreifen über 20 Minuten mit Fluprostenol inkubiert. Anschließend wurde Carbachol in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M für weitere 20 Minuten dazu gegeben.



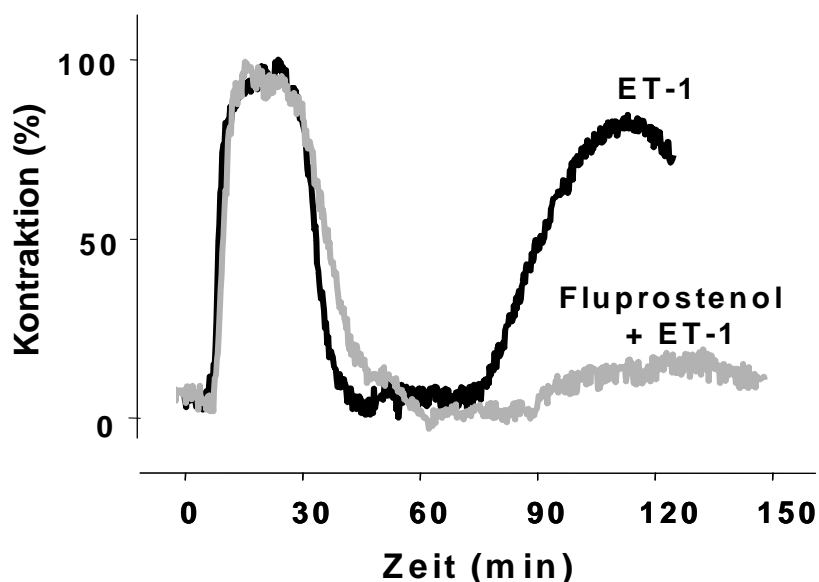
**Abb. 3.1.:** Das Kurvendiagramm zeigt eine Originalregistrierung zweier typischer Kontraktionskurven des BTM. Dabei zeigt die schwarze Kurve die reine Carbachol-vermittelte Kontraktion, die graue die Carbachol-vermittelte Kontraktion nach Vorinkubation und in Kombination mit dem FP-Rezeptor-Agonisten Fluprostenol.

Die Abbildung 3.1. zeigt den Verlauf der Carbachol-induzierten Kontraktion unter Zugabe von Fluprostenol ( $10^{-6}$  M). Es wurde eine relative Kontraktionskraft von  $127.1 \% \pm 18.6 \%$  ( $n=7$ ) gemessen, die nicht signifikant verschieden von der reinen Carbachol-induzierten Kontraktion war ( $p>0,05$ ). Fluprostenol hat somit keinen Einfluss auf den Tonus-Grundzustand oder die durch Carbachol induzierte Kontraktion.

### 3.1.2. Die Wirkung von Fluprostenol auf die Endothelin-induzierte Kontraktion des BTM

Wie vorangegangene Experimente zeigten, induziert das Isopeptid Endothelin-1 (ET-1) in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M am BTM eine Kontraktion von  $61.5 \pm 8.4 \%$  ( $n= 6$ ) in Bezug zur maximal möglichen Kontraktion mit Carbachol.

Analog zu vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  [70] sollte hier geklärt werden, ob Fluprostenol die gleiche inhibierende Wirkung auf die ET-1 vermittelte Kontraktion zeigt wie  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Der Versuchsablauf entsprach dem der Vorversuche mit Carbachol. Bei den Kontraktionsmessungen wurde ET-1 in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M zugesetzt.

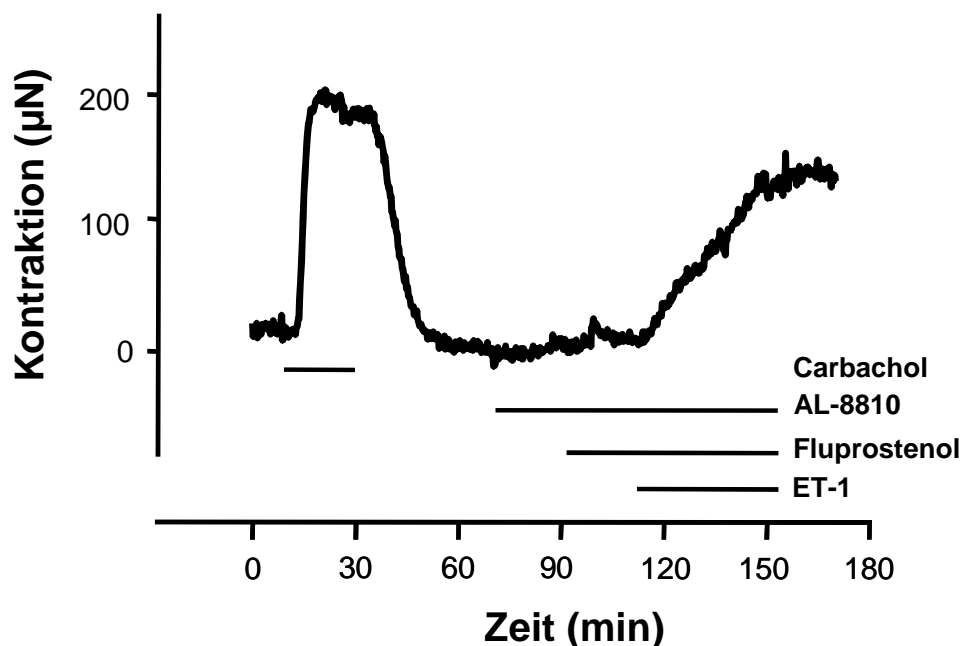


**Abb. 3.2.:** Originalregistrierung zweier typischer ET-1-vermittelter Kontraktionskurven im BTM mit (graue Kurve) und ohne (schwarze Kurve) Vorinkubation und Zugabe von Fluprostenol nach einem Carbachol-induzierten Peak.

Aus den Versuchsdaten geht hervor, dass Fluprostenol ebenso wie  $\text{PGF}_{2\alpha}$  einen hemmenden Effekt auf die ET-1-induzierte Kontraktion hat. Diese beträgt in Gegenwart von Fluprostenol  $25.0 \% \pm 6.5 \%$  der Carbachol-induzierten Kontraktion ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ). Die Abbildung 3.2. zeigt einen zu diesem Versuch exemplarischen Kurvenverlauf.

### 3.1.3. Die Wirkung von Fluprostenol in Kombination mit Al-8810 auf die ET-1 induzierte Kontraktion des BTM

Um zu überprüfen, ob der hemmende Effekt von Fluprostenol auf die Endothelinkontraktion über den FP-Rezeptor vermittelt wird, wurde Fluprostenol ( $10^{-6}$  M) nach einer 20-minütigen Vorinkubation und unter anschließender Zugabe des FP-Rezeptor-Antagonisten Al-8810 in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M appliziert. Anschließend wurde ET-1 ( $10^{-8}$  M) über einen Zeitraum von 40 Minuten zugesetzt.

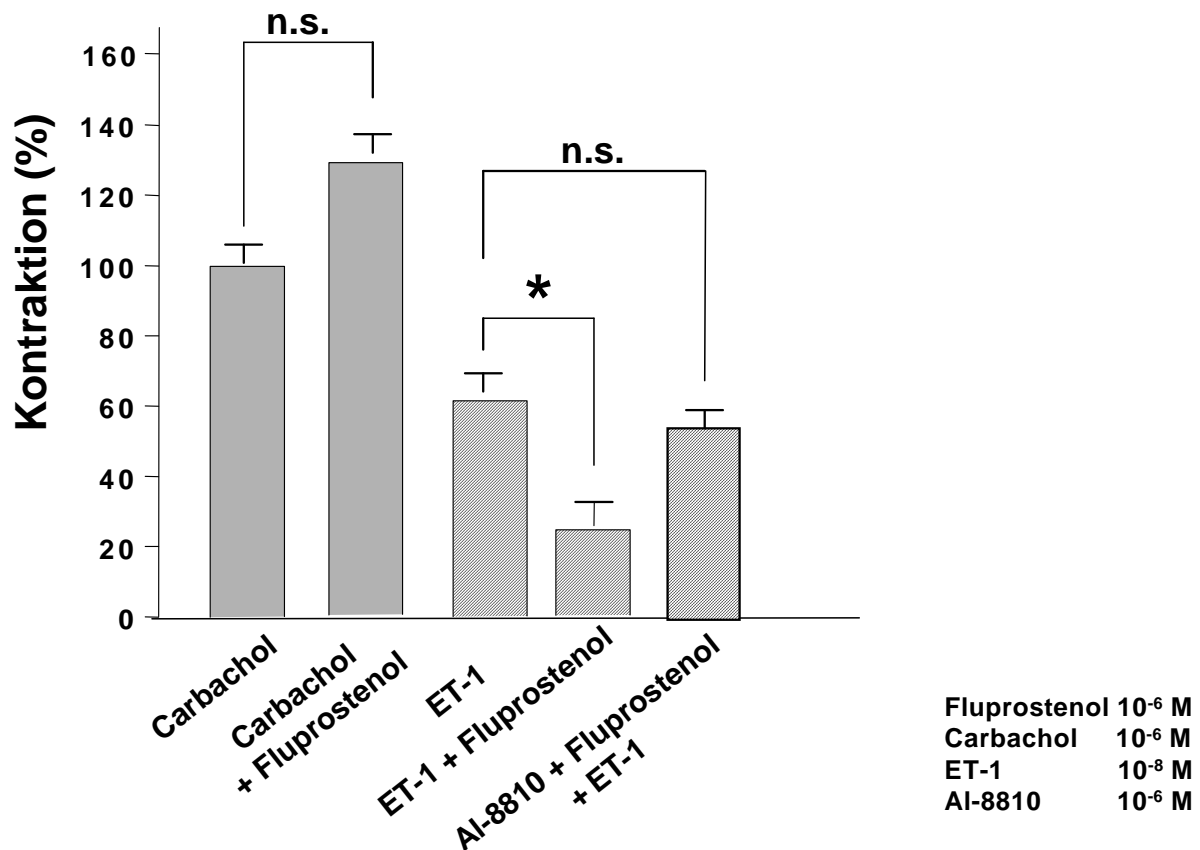


**Abb. 3.3.:** Originalregistrierung einer typischen ET-1-vermittelten Kontraktionskurve nach Inkubation des BTM mit dem FP-Rezeptor-Antagonisten Al-8810 und Fluprostenol im Anschluss an einen Carbachol-induzierten Peak.

Wie die Abbildung 3.3. verdeutlicht, wird durch die Zugabe von AI-8810 der inhibierende Effekt von Fluprostenol auf die Endothelin-induzierte Kontraktion des BTM aufgehoben. Unter diesen Bedingungen betrug die relative Kontraktionskraft  $50.3 \% \pm 6.1 \%$  ( $n=6$ ) und unterschied sich damit nicht signifikant von der ET-1-induzierten Kontraktion ( $p>0,05$ ).

### 3.1.4. Zusammenfassung der Wirkung von Fluprostenol auf die Kontraktion im BTM

Die bisherigen Versuche zeigten, dass Fluprostenol auf die Endothelin-induzierte Kontraktion eine inhibierende Wirkung hat. Der FP-Rezeptor-Antagonist AI-8810 konnte diese Wirkung aufheben. Fluprostenol hatte keinen Einfluss auf die Carbachol-induzierte Kontraktion und zeigte keinen Einfluss auf den Grundtonus. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse von 3.1.1. bis 3.1.3. sieht man in der Abbildung 3.4..



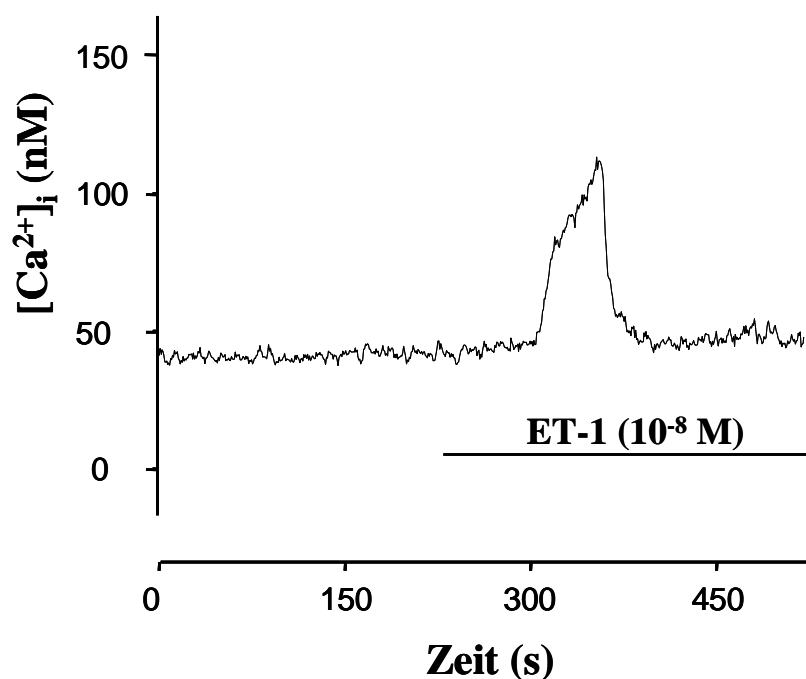
**Abb. 3.4.:** Effekt von Fluprostenol auf die Carbachol- induzierte Kontraktion und auf die ET-1-induzierte Kontraktion mit und ohne Zugabe des FP-Rezeptor-Antagonisten AI-8810.

### 3.2. Ergebnisse zur Wirkung von Fluprostenol auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des BTM

Eine weitere Möglichkeit die unter 3.1. beobachteten Ergebnisse zu festigen, ist die Durchführung von Calciummessungen an kultivierten BTM-Zellen. In der folgenden Versuchsreihe wurde die Wirkung von Endothelin alleine und in Kombination mit Fluprostenol auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in BTM-Zellen untersucht.

#### 3.2.1. Die Wirkung von Endothelin-1 auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im BTM

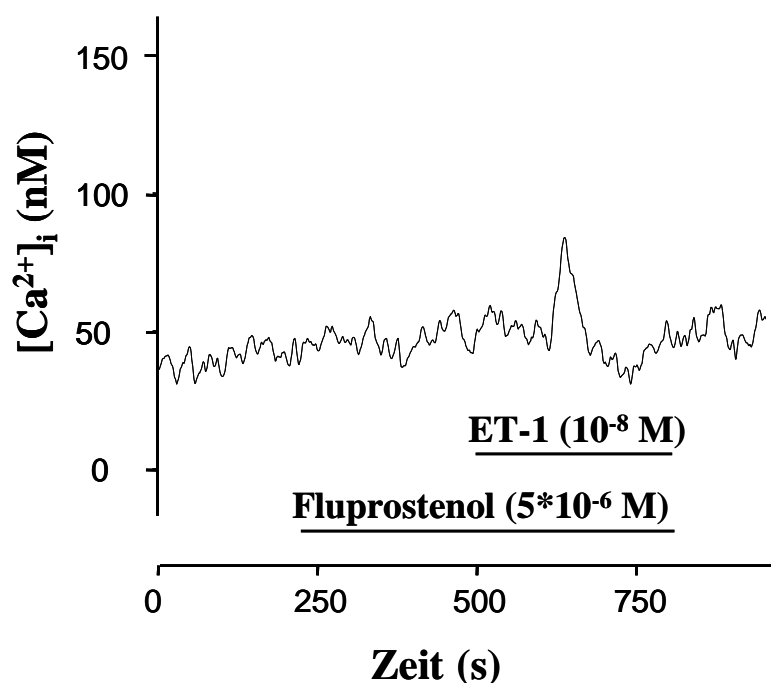
Unter Ruhebedingungen betrug die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von BTM-Zellen  $81.6 \pm 9.6$  nM (n=10). In kultivierten BTM-Zellen bewirkte ET-1 ( $10^{-8}$  M) einen charakteristischen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) auf  $203.8 \% \pm 23.3\%$  (n=4) gegenüber dem Ruhewert (siehe Abb.3.5 und Abb. 3.7.).



**Abb. 3.5.:** Originalregistrierung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung – Anstieg des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in BTM-Zellen durch ET-1.

### 3.2.2. Die Wirkung von Fluprostenol auf den Endothelin-induzierten Anstieg der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im BTM

Um zu überprüfen, ob Fluprostenol auf den ET-1-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg einen ähnlich hemmenden Effekt wie auf die Kontraktion ausübt, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen durchgeführt. Unter Zugabe von Fluprostenol ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ), welches selbst keine Wirkung auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hat, kam es zu einer deutlichen Senkung des Endothelin-induzierten Anstiegs des ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf  $141.5 \% \pm 6.0 \%$  ( $n=5$ ) im Vergleich zum Ruhewert (siehe Abb. 3.6 und Abb.3.7.).



**Abb. 3.6.:** Originalregistrierung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung – Effekt des FP-Rezeptor-Agonisten Fluprostenol auf den ET-1-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in BTM-Zellen. Der charakteristische  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak ist deutlich geringer.

### 3.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen

Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in der Abbildung 3.7. in Form eines Balkendiagramms zu sehen. ET-1 bewirkt einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Konzentration an freiem Calcium ( $p < 0,05$ ). Durch das Prostaglandin-Analogon Fluprostenol

wird dieser Anstieg inhibiert. Somit bewirkt Fluprostenol eine signifikante Reduktion des Endothelin-induzierten Effekts ( $p < 0,05$ ).

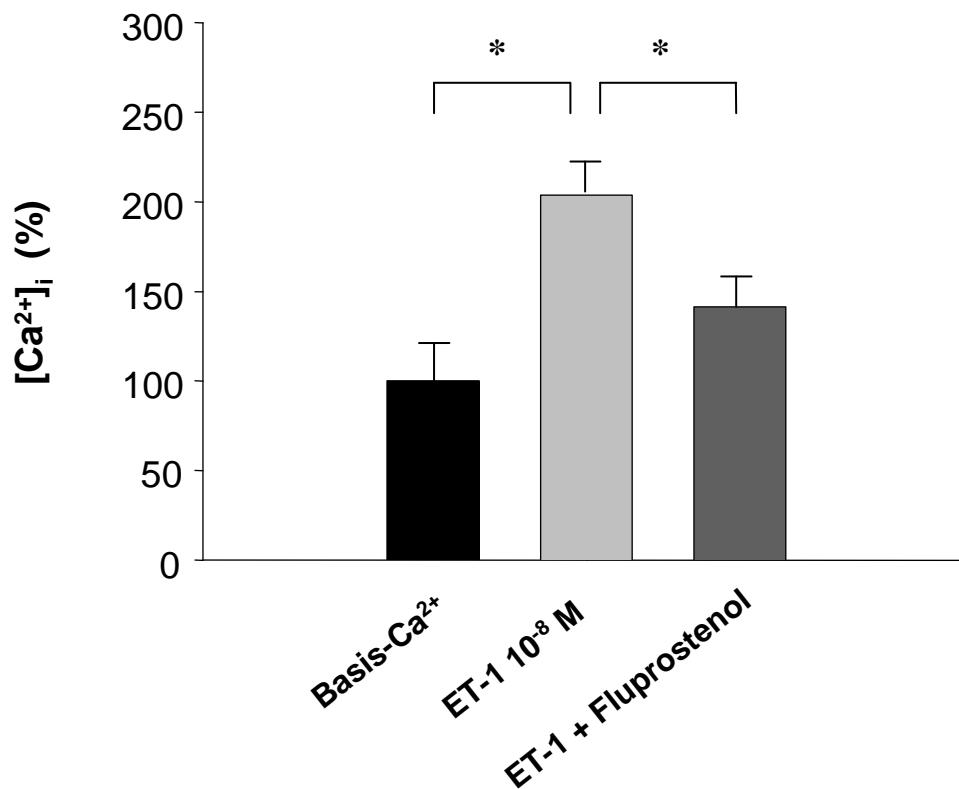


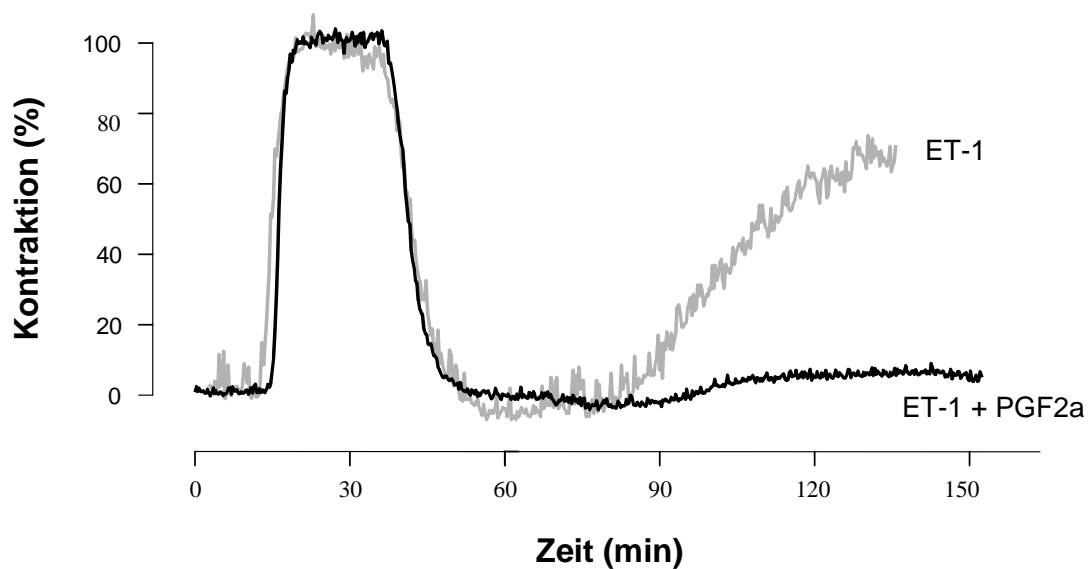
Abb. 3.7.: Wirkung des FP-Rezeptor-Agonisten Fluprostenol auf den ET-1-induzierten Anstieg des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

### 3.3. Ergebnisse zur Wirkung von PGF<sub>2α</sub> auf die Kontraktion im BTM unter Ca<sup>2+</sup>-freien Versuchsbedingungen

Es ist bekannt, dass Endothelin sowohl eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige als auch eine Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Kontraktion induziert. Gegenstand der folgenden Versuchsreihe war im Speziellen die Wirkung von PGF<sub>2α</sub> auf die Endothelin-induzierte Kontraktion unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen.

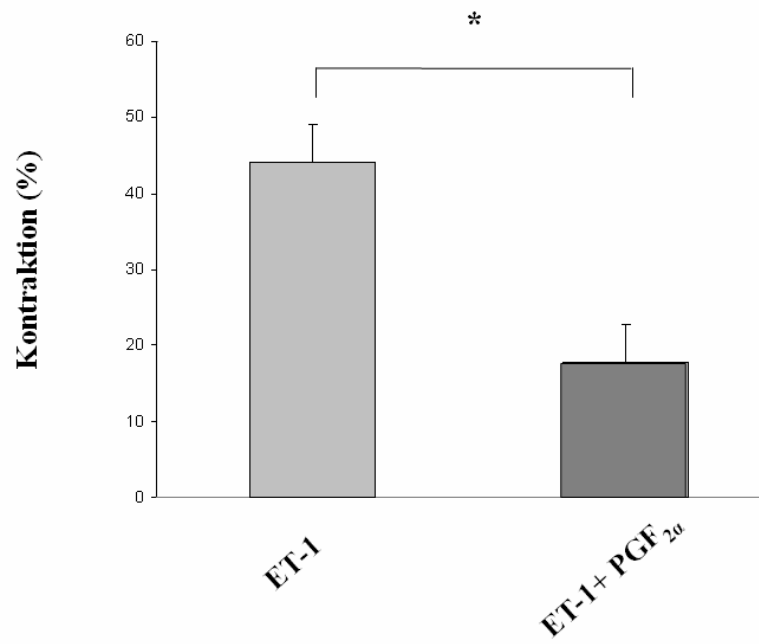
Das Prostaglandin-Analogon PGF<sub>2α</sub> gehört wie Fluprostenol zu den Agonisten des FP-Rezeptors. Es hat am BTM ähnliche Wirkungen wie Fluprostenol, das heißt, es bewirkt eine partielle Hemmung der Endothelin-induzierten Kontraktion [70]. Es wurde überprüft, ob dieser partiell hemmende Effekt auch unter Ca<sup>2+</sup>-freien Versuchsbedingungen gilt. Nach Auslösen der Kontrollkontraktion unter Carbachol wurde dafür der für die Versuche verwendeten

Ringerlösung der Komplexbildner EGTA ( $10^{-5}$  M) und der membrangängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM ( $2 \cdot 10^{-5}$  M) zugesetzt. Dadurch wurden extra- und intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Versuchsbedingungen geschaffen. Die anschließende Applikation von ET-1 zeigte, dass Endothelin auch unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen noch eine Kontraktion von  $44.1 \% \pm 7.4 \%$  ( $n=10$ ) induziert, welche durch die Vorinkubation mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  signifikant auf  $17.7 \% \pm 5.9 \%$  ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ) reduziert wird (siehe Abb. 3.8. und Abb. 3.9.).



**Abb. 3.8.:** Originalregistrierung zweier ET-1-vermittelter Kontraktionskurven unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Versuchsbedingungen im Anschluss an einen Carbachol-induzierten Peak unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Bedingungen. Dabei zeigt die graue Kurve die reine ET-1-vermittelte Kontraktion, die schwarze die ET-1-vermittelte Kontraktion nach Vorinkubation und in Kombination mit dem FP-Rezeptor-Agonisten  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .





**Abb. 3.9.:** Wirkung des FP-Rezeptor-Agonisten PGF<sub>2α</sub> auf die ET-1-induzierte Kontraktion unter Ca<sup>2+</sup>-freien Versuchsbedingungen.

## 4. Diskussion

Den Hauptangriffspunkt der heutigen Glaukomtherapie stellt immer noch die Senkung des IOD dar. Das gilt sowohl für den konservativ-medikamentösen als auch für den chirurgisch-interventionellen Therapieansatz.

Alle bisher verwendeten Glaukompharmaka erzielen eine IOD-Senkung, indem sie entweder die Kammerwassersekretion hemmen oder den Kammerwasserabfluss beeinflussen, und zwar hauptsächlich über die uveosklerale Route. Dies scheint in Anbetracht dessen, dass der uveosklerale Abflussweg zu nur ca. 15 % am Gesamtabfluss beteiligt ist, erstaunlich, da eine direkte Beeinflussung über den konventionellen Weg, über den mehr als 80 % des Kammerwassers abfließen, einen sehr viel effektiveren Therapieansatz bieten würde.

Auch neuere Antiglaukomatosa wie die Substanzgruppe der Prostaglandin-Analoga, die mittlerweile zu den Standardmedikamenten der Glaukomtherapie gehört, wirken über eine Steigerung der Abflussrate. Allerdings wird der genaue Wirkmechanismus dieser Präparatgruppe noch kontrovers diskutiert. So gehen manche Forscher davon aus, dass die Prostaglandin-Analoga hauptsächlich über eine Steigerung der uveoskleralen Abflussrate zur IOD-Senkung beitragen [78, 79]. Andere vermuten einen Einfluss auf den konventionellen Abflussweg als ursächlichen Wirkmechanismus und Erklärung für die Effektivität der Prostaglandinanaloga [69].

Die von uns durchgeführten Untersuchungen beschreiben einen Endothelin-antagonisierenden Effekt der FP-Rezeptor-Agonisten am Trabekelmaschenwerk und unterstützen somit die Annahme, dass Prostaglandin-Analoga den konventionellen Abflussweg beeinflussen. Dabei wurde im Wesentlichen die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks untersucht. Aus vorausgegangenen Untersuchungen wissen wir, dass das Trabekelmaschenwerk und die glatte Muskulatur in vielerlei Hinsicht wie z.B. in Morphologie, Kontraktionsregulation und funktionellem Verhalten nahezu identisch sind [33, 80]. Wie für die glatte Muskulatur ist auch für das bovine Trabekelmaschenwerk neben einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Signaltransduktion beschrieben worden [37, 81, 82]. Unsere Kontraktilitätsuntersuchungen beziehen beide Signaltransduktionswege mit ein.

Neben der von uns untersuchten trabekulären Kontraktilität gibt es noch einige andere Theorien über die Abflussregulation im Trabekelmaschenwerk. Einige Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass spezifische Veränderungen des Zytoskeletts der Trabekelmaschenwerkzellen den konventionellen Abfluss beeinflussen [83, 84]. Verschieden Faktoren wie mechanische Spannung und hydrostatischer Druck beeinflussen und regulieren dabei komplexe Interakti-

onssysteme des trabekulären Zytoskeletts und sind darüber an der Regulation des Kammerwasserabflusses beteiligt. Eine weitere bedeutende Rolle soll den Auf- und Abbauprozessen der Extrazellulärmatrix der Trabekelmaschenwerkzellen zukommen. Daran sind vor allem so genannte Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren beteiligt, welche im Rahmen von Remodellierungsprozessen über Veränderungen des extrazellulären Widerstands einen Einfluss auf den Kammerwasserabfluss auszuüben scheinen [19].

#### **4.1. Endothelin-1**

Das Peptid Endothelin-1 gehört zu den potentesten, bisher bekannten Vasokonstriktoren und wird unter anderem von den Endothelzellen der Gefäße gebildet. Es hat eine große Bedeutung bei der Gefäßhomöostase und ist an einer Vielzahl von pathologischen Prozessen wie kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt.

Am Auge spielt es ebenfalls eine bedeutende Rolle. Zahlreiche Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass ET-1 an der Pathogenese des Glaukoms mitbeteiligt ist. So hat man im Kammerwasser von Patienten mit POWG und mit Pseudoexfoliationsglaukom erhöhte Endothelinkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden [58, 59, 85]. Dazu passt auch der Befund, dass im Blutplasma von Patienten mit Normaldruckglaukom eine Erhöhung der Endothelinkonzentration nachgewiesen wurde [60, 61].

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Endothelin-1 und seine Rezeptoren in verschiedenen Geweben des Auges vorkommen und dort eine regulatorische Funktion zu haben scheinen. Endothelin wird vor allem vom Ziliarepithel produziert und ins Kammerwasser sezerniert, ist aber unter anderem auch im Kornealepithel, im retinalen Gefäßendothel, in der Iris und in der Papilla nervi optici zu finden [49].

An der glatten Gefäßmuskulatur und den Perizyten des Auges verursacht ET-1 eine Kontraktion und scheint folglich an der Regulation von retinaler und chorioidaler Durchblutung beteiligt zu sein [49, 61]. Durch seine nachgewiesene kontraktile Wirkung auf Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel hat ET-1 außerdem Einfluss auf die Regulation der Kammerwasserdynamik und damit den IOD [39]. Seine Wirkung vermittelt ET-1 über zwei Rezeptortypen, den Endothelin-Rezeptor A (ET<sub>A</sub>-Rezeptor) und den Endothelin-Rezeptor B (ET<sub>B</sub>-Rezeptor) [44].

#### 4.1.1. Endothelinrezeptoren

Die beiden Endothelin-Rezeptorsubtypen  $ET_A$  und  $ET_B$  werden von den verschiedenen Geweben des Körpers in unterschiedlicher Häufigkeit und Verteilung exprimiert [86]. Der  $ET_A$ -Rezeptor, der vor allem auf glatten Muskelzellen der Gefäße und anderer Organe sowie auf Kardiomyozyten zu finden ist, bindet unter physiologischen Bedingungen die verschiedenen Endothelin-Isoformen mit unterschiedlicher Affinität ( $ET-1 > ET-2 \gg ET-3$ ). Die stark vaso-konstriktorische Wirkung von  $ET-1$  wird über diesen Subtyp vermittelt. Der  $ET_B$ -Rezeptor, der vor allem auf Epithel- und Endothelzellen ( $ET_{B1}$ ), aber auch auf glatten Muskelzellen ( $ET_{B2}$ ) nachweisbar ist, bindet dagegen alle drei Isoformen mit annähernd gleicher Affinität. Eine Aktivierung dieses Rezeptorsubtyps kann sowohl eine Vasodilatation ( $ET_{B1}$ ), die über die Freisetzung von NO vermittelt wird [87], als auch eine Vasokonstriktion ( $ET_{B2}$ ) zur Folge haben.

Bei beiden Rezeptorsubtypen handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine. Durch die Bindung von  $ET-1$  an die entsprechenden Rezeptoren werden verschiedene G-Protein-Untereinheiten aktiviert, die je nach Spezifität für die weitere Signaltransduktion über die Phospholipase C oder die Adenylatcyclase verantwortlich sind. Diese Enzyme sind dann an der Bildung diverser Second Messenger wie cAMP, NO, Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) beteiligt. Während der  $ET_A$ -Rezeptor-vermittelte Signalweg vor allem zu einer Erhöhung von intrazellulärem Calcium (über  $IP_3$ ) oder einer Aktivierung der Proteinkinase C (über DAG) führt, fördert die  $ET_B$ -Rezeptor-Aktivierung unter anderem die Produktion von cAMP und die NO-vermittelte Produktion von cGMP.

Im Auge konnte der  $ET_A$ -Rezeptor vor allem in chorioidalen und retinalen Blutgefäßen, der  $ET_B$ -Rezeptor dagegen überwiegend in neuronalen und glialen Nervenzellen der Retina gefunden werden [88]. Auch im Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel lassen sich beide Rezeptortypen nachweisen [89, 90].

#### 4.1.2. Endothelin und seine Bedeutung für den IOD

Zahlreiche Untersuchungen in den letzten Jahren weisen auf einen Zusammenhang zwischen  $ET-1$  und der Pathogenese des Glaukoms hin.

ET-Rezeptoren finden sich sowohl am Trabekelmaschenwerk als auch am Ziliarmuskel und an beiden Geweben lässt sich durch ET-1 eine Kontraktion induzieren. Beide Gewebe sind im Wesentlichen an der Regulation des Kammerwasserabflusses und damit des IOD beteiligt. Entsprechend dem oben beschriebenen funktionellen Antagonismus zwischen Ziliarmuskel und Trabekelmaschenwerk (siehe Kap.1.8.2) bedeutet dies, dass ET-1 direkt in die Regulation des IOD eingreifen kann.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die ET-1-induzierte Kontraktion des Trabekelmaschenwerks und des Ziliarmuskels wahrscheinlich in erster Linie durch Aktivierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelt werden, wohingegen die Aktivierung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors lediglich eine Kontraktion des Ziliarmuskels auszulösen scheint [91]. So hatte eine Blockierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors eine deutliche Abschwächung der Kontraktionskraft des Trabekelmaschenwerks zur Folge, während die Blockierung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors die Kontraktion nicht inhibieren konnte. Ähnliche Beobachtungen wurden bei dem Endothelin-induzierten Anstieg des intrazellulären Calciums gemacht. Auch dieser wurde hauptsächlich durch Aktivierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors bewirkt. Die funktionelle Bedeutung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors für das Trabekelmaschenwerk ist bis heute noch nicht ausreichend geklärt.

Bei einer bezüglich der Kontraktionskraft unterschiedlich ausgeprägten Endothelinwirkung auf das Trabekelmaschenwerk bzw. den Ziliarmuskel heißt das, dass sich das Gleichgewicht sowohl in Richtung einer IOD-Senkung als auch einer IOD-Erhöhung beeinflussen lässt. Folglich müsste es bei einem Trabekelmaschenwerk-überwiegenden Kontraktions-Effekt von ET-1, wie er von Lepple-Wienhues et al. [39] beschrieben wurde, zu einer Erhöhung des Abflusswiderstands und damit des IOD kommen. Beachtet man dabei noch, welche Bedeutung das Trabekelmaschenwerk für den konventionellen Abflussweg, über den mehr als 80 % des Kammerwassers abfließen, hat, so wird deutlich, dass eine Endothelin-Antagonisierung eine zielgerichtete und äußerst effektive Therapieoption bietet.

#### 4.1.3. Endothelin-Antagonisierung durch Unoprostone

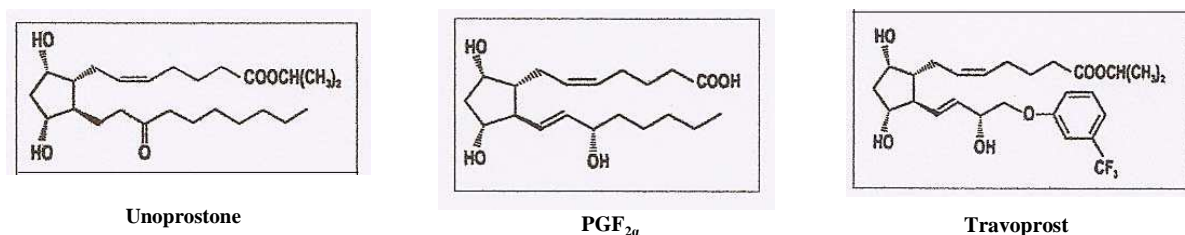
Die Vermutung, dass therapeutisch eingesetzte Antiglaukوماتosa über eine Endothelin-Antagonisierung wirken könnten, wurde im Jahr 2001 von der Arbeitsgruppe um Michael Wiederholt aufgestellt [69]. Sie untersuchte diesbezüglich die Wirkmechanismen von Unoprostone-Isopropyl, einem neueren synthetischen Docosanoid, das bereits seit Jahren erfolgreich in Japan für die Glaukomtherapie genutzt wird. Es ist das einzige bisher bekannte Doco-

sanoid, das über eine IOD-senkende Wirkung und eine Affinität zum FP-Rezeptor verfügt. Welche Wirkmechanismen für die IOD-Senkung verantwortlich sind, blieb jedoch lange unklar.

Docosanoide sind natürliche Derivate der Docosahexaensäure (DHA), einer mehrfach ungesättigten Fettsäure, die zur Klasse der Omega-3-Fettsäuren gehört. Sie verfügen über neuroprotektive Eigenschaften, weshalb sie auch unter der Bezeichnung „Neuroprotectine“ bekannt sind. Für DHA, der „Muttersubstanz“ des Unoprostone-Moleküls, konnte von mehreren Arbeitsgruppen ein vasorelaxierender Effekt nachgewiesen werden [92-94]. Dabei war die vasorelaxierende Wirkung jedoch Endothel-abhängig [95]. Diese Erkenntnisse veranlassten Thieme et al. nachzuprüfen, ob sich mit den bekannten Wirkungen von DHA auch die IOD-senkende Wirkung seines Derivats Unoprostone erklären lässt, welches selbst ebenfalls vasorelaxierend wirkt [96]. Da sich Trabekelmaschenwerkzellen bezüglich ihrer Kontraktilität ähnlich verhalten wie die glatten Muskelzellen der Gefäße, wurde die Wirkung von Unoprostone auf Carbachol- und ET-1-induzierte Kontraktionen am Trabekelmaschenwerk untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass Unoprostone keinerlei Einfluss auf den Basistonus und die durch Carbachol induzierte Kontraktionen hatte, auf ET-induzierte Kontraktionen jedoch einen deutlich inhibierenden Effekt ausübte.

Dies spricht für unterschiedliche Mechanismen, über die muscarinerge und Endothelin-Rezeptoren zu einer Kontraktion des Trabekelmaschenwerks führen. Unoprostone scheint demnach über seinen Effekt auf die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks einen Einfluss auf den konventionellen Kammerwasserabfluss zu haben.

Prostaglandine entstehen aus der Arachidonsäure, einer ebenfalls mehrfach ungesättigten Fettsäure, die sich von der Omega-6-Fettsäure ableitet. Auch die Substanzklasse der Prostaglandine verfügt je nach Unterform über vasodilatierende bzw. muskelrelaxierende Effekte. Beachtet man zusätzlich die chemische Strukturähnlichkeit zwischen Unoprostone und PGF<sub>2α</sub> bzw. seinem Derivat Travoprost® (siehe Abb. 4.1.), so lässt sich auch hier ein ähnlicher Wirkmechanismus am Trabekelmaschenwerk vermuten.



**Abb. 4.1.:** (aus: Nguyen, Q.H. – The Role of Prostaglandin Analogues in the Treatment of Glaucoma in the 21<sup>st</sup> Century [67])

#### 4.2. Prostaglandine und ihre Bedeutung für den IOD

Obwohl Prostaglandin-Derivate schon seit einigen Jahren ihren festen Platz in der Glaukomentherapie haben, ist der genaue Wirkmechanismus dieser äußerst potenten IOD-senkenden Pharmaka noch nicht vollständig aufgeklärt. Bis heute wird überwiegend die Meinung vertreten, dass sie vor allem über eine Steigerung der uveoskleralen Abflussrate eine IOD-Senkung bewirken.

Wie in Kapitel 1.6.3. beschrieben, fließt das Kammerwasser beim uveoskleralen Abflussweg über die Iriswurzel und die interstitiellen Räume des Ziliarmuskels in den Suprachoroidalraum. Den Hauptwiderstand bildet der Ziliarmuskel. Es ist zwar nicht eindeutig aufgeschlüsselt, was genau die Verbesserung des Abflusses bewirkt, doch man geht davon aus, dass vor allem die Prostaglandin-induzierte Steigerung der Biosynthese von bestimmten Metalloproteinasen am Ziliarmuskel die Ursache ist [97-99]. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) bezeichnen eine Familie substratspezifischer Endopeptidasen und sind wichtige Modulatoren im Gewebe-Remodeling. Ihre Aufgabe besteht unter anderem darin, Bestandteile der Extrazellulärmatrix wie Kollagen und Laminin abzubauen. Am Auge führt das wahrscheinlich unter anderem dazu, dass die Bindegewebsspalten zwischen den Ziliarmuskelfasern erweitert werden und der hydraulische Widerstand vom Ziliarmuskel dadurch herabgesetzt wird. Dies wiederum erhöht die Abflussrate, was eine Senkung des IOD nach sich zieht [100].

Der hier beschriebene Prozess bezüglich des Umbaus des Ziliarmuskels mittels der MMP lässt erkennen, dass dies ein Zeit beanspruchender Vorgang ist. Die Wirkung setzt nach der Applikation der Prostaglandin-Analoga jedoch vergleichsweise schnell ein, was unvermeidbar die Frage nach der Beteiligung anderer Mechanismen aufwirft. Einige Autoren gehen von einer Beteiligung von Myosin-Leichtketten-Kinasen (MLCK) an dem IOD-senkenden Effekt der Prostaglandin-Analoga aus, welche über Veränderungen der Kontraktion und Relaxation von glatter Muskulatur in der Vorderkammer für die Wirkung dieser Antiglaukomatosa von Bedeutung sein sollen [101, 102].

Diese Arbeit zeigt, dass Fluprostenol einen Endothelin-Antagonismus am Trabekelmaschenwerk ausübt. Aufgrund dieser und vorausgehender Untersuchungsergebnisse mit anderen Prostaglandin-Analoga vermuten wir deshalb, dass Prostaglandine und deren Analoga ihre Wirkung vor allem durch einen Eingriff in den konventionellen Abflussweg entfalten und über einen Endothelin-Antagonismus verfügen, wie er für das Unoprostone bereits nachgewiesen werden konnte.

#### 4.2.1. Der Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und anderen Prostaglandinen auf die Gefäßmuskulatur

Zahlreiche Untersuchungsergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass Trabekelmaschenwerk und glatte Muskulatur in Morphologie, Ausstattung mit Proteinen der Kontraktionsregulation und funktionellem Verhalten nahezu übereinstimmen [31-33].

Prostaglandine können durch Aktivierung verschiedener Prostaglandin-Rezeptoren sowohl eine Relaxation als auch eine Kontraktion an glattem Muskelgewebe bewirken. Anhand ihrer Signaltransduktion und Wirkung kann man die Prostaglandinrezeptoren in drei Kategorien einteilen: relaxierende, kontraktile und inhibitorische Rezeptoren. Die sogenannten relaxierenden Rezeptoren, zu denen der  $\text{IP}_1$ -,  $\text{EP}_2$ - und  $\text{DP}$ -Rezeptor gehört, bewirken über die Stimulation der Adenylatzyklase eine Erhöhung der cAMP-Konzentration und damit eine Relaxation der glatten Muskelzellen. Dagegen führen die klassischen kontraktile Rezeptoren wie der  $\text{TP}$ -,  $\text{FP}$ - und  $\text{EP}_1$ -Rezeptor über eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer Kontraktion an Glattmuskel-Zellen. Die Erhöhung des intrazellulären Calciums erfolgt dabei über die Stimulation der Phospholipase C mit anschließender Bildung von Inositol-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ). Inhibitorische Rezeptoren, zu denen der  $\text{EP}_3$ -Rezeptor gezählt wird, senken den cAMP-Spiegel und verhindern damit die Relaxation der glatten Muskelzellen [103].

Glatte Muskelzellen bilden unter anderem die kontraktile Wand unserer Blutgefäße, auf welche die Prostaglandine eine Wirkung ausüben, welche auch in der Pathogenese und Therapie des Glaukoms eine Rolle zu spielen scheint.

Den potentesten Vasokonstriktor unter den Prostaglandinen stellt das Thromboxan  $\text{A}_2$  dar, das seine Wirkung über den  $\text{TP}$ -Rezeptor vermittelt. Ein klassischer Vasodilatator dagegen ist das Prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ), das an den  $\text{IP}$ -Rezeptor bindet.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dagegen, obwohl dem klassischen  $\text{FP}$ -Rezeptor zugeschrieben, lässt sich nicht so einfach einer der beiden Kategorien zuordnen. Bisher durchgeführte Untersuchungen zeigten variable Effekte bezüglich seiner Wirkung auf die glatte Muskulatur der Gefäße.

So ergaben Untersuchungen an isolierten Netzhautarterien, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  kontraktil auf das Gefäßsystem wirkt, nach einer Vorkontraktion mit Endothelin-1 jedoch überraschend einen relaxierenden Effekt vorweist [104]. In isolierten Ziliararterien dagegen konnte man unabhängig von einer Vorkontraktion sowohl einen relaxierenden als auch kontrahierenden Effekt von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  beobachten [105]. Die Kontraktionswirkung war dabei stark dosisabhängig. Interessanterweise ließ sich durch gleichzeitige Gabe eines  $\text{TP}$ -Blockers dieser kontraktile Effekt nicht nur komplett aufheben, sondern sogar ins Gegenteil überführen. In Gegenwart des  $\text{TP}$ -Blockers löste  $\text{PGF}_{2\alpha}$  eine deutliche Relaxation des Gefäßes aus. Dies ließ eine  $\text{TP}$ -Rezeptor-



vermittelte Kontraktion durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  vermuten. Die Frage danach, über welchen Rezeptor die relaxierende Wirkung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  vermittelt wird, blieb dabei unbeantwortet, da man eine Beteiligung des FP-Rezeptors an der Relaxation für eher unwahrscheinlich hielt. Versuche an humanen Pulmonalvenen zeigten ebenfalls, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vermittelte Kontraktionen mittels eines Inhibitors des Thromboxan  $\text{A}_2$ -Rezeptors unterdrückt werden können [106]. Das in diesem Versuch verwendete  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogon Fluprostenol hatte als hochselektiver FP-Rezeptor-Agonist keine kontrahierende Wirkung auf das pulmonale Gefäß, was auch in diesem Fall an eine Beteiligung des TP-Rezeptors an der Kontraktion denken lässt.

Die einzelnen Prostaglandin-Analoga sind, wie diese Versuchsreihen verdeutlichen, nicht Rezeptor-spezifisch und können an verschiedenen Prostaglandin-Rezeptoren binden. Die jeweilige Wirkung der Substanzen in den einzelnen Geweben hängt damit vom Rezeptorbesatz dieser Gewebe ab.

Der über  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aktivierte FP-Rezeptor galt lange Zeit als Mediator diverser Kontraktionsvorgänge an glatter Muskulatur wie zum Beispiel am Uterus [107] oder am Kolon [108]. An Gefäßen verschiedener Spezies dagegen ließ sich unter der Voraussetzung eines intakten Endothels neben einem kontraktilem auch ein relaxierender Effekt von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  beschreiben [109, 110]. Die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vermittelte vasorelaxierende Wirkung führte man jedoch nicht auf den FP-Rezeptor zurück, sondern vermutete, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  die für eine Relaxationsvermittlung bekannten Prostanoid-Rezeptoren  $\text{IP}$ -,  $\text{DP}$ - oder  $\text{EP}_2$ -Rezeptor stimuliert. Die Arbeitsgruppe um J. Cheng konnte unter Einsatz des hochselektiven FP-Rezeptors Fluprostenol zeigen, dass die durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ausgelöste Relaxation der Jugularisvene des Kaninchens vornehmlich über den FP-Rezeptor stattfindet [111]. Voraussetzung für diesen relaxierenden Effekt war jedoch wie auch schon in anderen Untersuchungsreihen [112, 113] ein intaktes Gefäßendothel, was die Arbeitsgruppe zu der Annahme verleitete, dass die Relaxation über endotheliale vasoaktive Substanzen wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt wird.

Zusammenfassend kann man sagen, dass viele der durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ausgelösten Kontraktionen an der Gefäßmuskulatur wahrscheinlich zumindest teilweise über den TP-Rezeptor vermittelt werden. Dagegen scheint der relaxierende Effekt dieses Prostaglandins vornehmlich auf einer Aktivierung des FP-Rezeptors zu beruhen, was jedoch an verschiedene Voraussetzung wie ein intaktes Gefäßendothel oder wie beim Trabekelmaschenwerk an eine ET-1-Vorkontraktion gebunden ist. Der genaue Signaltransduktionsweg, über den die FP-Rezeptor-vermittelte Relaxation abläuft, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

#### 4.2.2. Nachweis und Bedeutung des FP-Rezeptors im Trabekelmaschenwerk und anderen okulären Geweben

Überträgt man die unter 4.2.1 dargestellten Erkenntnisse auf das Trabekelmaschenwerk des Auges, so findet man Parallelen zu den von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Versuchen. Auch für das Trabekelmaschenwerk wurde eine durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ausgelöste relaxierende Wirkung auf eine ET-1-induzierte Kontraktion beschrieben, die nachweislich über den FP-Rezeptor vermittelt wird [70]. Im Gegensatz zu den anderen oben aufgeführten Ergebnissen ließ sich für  $\text{PGF}_{2\alpha}$  jedoch kein kontraktiler Effekt auf das Trabekelmaschenwerk nachweisen. Dies zeigt, dass trotz einiger gemeinsamer Effekte von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  auf Trabekelmaschenwerk- und Gefäßmuskelzellen auch Unterschiede bestehen, was für verschiedene Rezeptorenbesetzung und / oder Signaltransduktionswege in beiden Geweben spricht.

Der FP-Rezeptor konnte bereits in verschiedenen okulären Geweben des Menschen nachgewiesen werden [114-116]. So wurde mittels zahlreicher immunhistochemischer und biochemischer Methoden gezeigt, dass unter anderem das Kornea- und Ziliarepithel, der Ziliarmuskel sowie der Iris-Sphinctermuskel über eine hohe Expressionsrate des FP-Rezeptor-Proteins verfügen. Basierend auf diesen Ergebnissen vermuteten die jeweiligen Arbeitsgruppen deshalb, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  über den FP-Rezeptor zu einem gesteigerten uveoskleralen Abfluss und damit zur IOD-Senkung beiträgt.

Und obwohl die Arbeitsgruppe um Anthony T.L. bereits 1998 bewies, dass der FP-Rezeptor auch in humanen Trabekelmaschenwerkzellen anzufinden ist [117], wurde seine Existenz im Trabekelmaschenwerk in vielen Studien kaum erwähnt. Das ist in Anbetracht der Diskussionen um die IOD-senkende Wirkung des  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und seiner Analoga über den FP-Rezeptor jedoch verwunderlich. Spätestens seit der Untersuchung der Effekte von PhXY41, einem  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogon, auf die Kammerwasserdynamik im Jahr 1993 stand fest, dass die Senkung des IOD durch Prostaglandin-Analoga nicht allein mit deren Einfluss auf den uveoskleralen Kammerwasserabfluss begründet werden kann [118]. Schon damals wurde als eine der weiteren Möglichkeiten eine Verbesserung des trabekulären Abflusses angenommen. Diese Idee geriet in den letzten Jahren jedoch in den Hintergrund.

### **4.3. Unterstützung der Hypothese der Endothelin-Antagonisierung durch Prostaglandin-Analoga mittels neuer Forschungsergebnisse dieser Arbeit**

Um zu zeigen, dass der FP-Rezeptor im Trabekelmaschenwerk nicht nur exprimiert wird, sondern dort auch bestimmte Reaktionen vermittelt, wurden funktionelle Untersuchungen mit spezifischen FP-Rezeptor-Agonisten und –antagonisten am Trabekelmaschenwerk durchgeführt. Diese beinhalteten sowohl Kontraktionsmessungen am nativen bovinen Trabekelmaschenwerk als auch Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration an bovinen Trabekelmaschenwerk-Kulturzellen.

Als spezifischer Rezeptoragonist wurde Fluprostenol, ein synthetisches  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogon, das hochselektiv an den FP-Rezeptor bindet, verwendet. Es hat eine sehr hohe Affinität zum FP-Rezeptor und wird therapeutisch unter dem Namen Travoprost® schon seit Jahren in der Glaukombehandlung eingesetzt. AL-8810, ebenfalls ein  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogon, ist ein kompetitiver Antagonist am FP-Rezeptor mit geringer intrinsischer Aktivität, der auch über eine hohe Selektivität und Affinität zum Rezeptor verfügt [119] und damit den idealen Gegenspieler darstellt.

#### **4.3.1. Kontraktionsmessungen**

Die in Kapitel 3.1. dargestellten Versuchsdaten zeigen, dass die Applikation des  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogons Fluprostenol zu einer deutlichen Inhibierung der durch ET-1 ausgelösten Kontraktion führt. Durch Untersuchungen mit dem FP-Rezeptor-Antagonisten AL-8810 konnten wir beweisen, dass dieser Effekt tatsächlich über den FP-Rezeptor vermittelt wird, da die inhibierende Wirkung von Fluprostenol durch die gleichzeitige Applikation von AL-8810 nahezu vollständig aufgehoben werden konnte. AL-8810 alleine hatte keinen Einfluss auf die durch ET-1-induzierte Kontraktionsstärke. Vorversuche unserer Arbeitsgruppe mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  zeigten außerdem, dass der FP-Rezeptor-Agonist bei einer Zugabe nach Beginn der ET-1-induzierten Kontraktion vollkommen wirkungslos ist [70]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Gleiches auch für Fluprostenol gilt. Dies lässt Grund zu der Annahme, dass der FP-Rezeptor noch vor der Bindung von ET-1 an seinen Rezeptor aktiviert sein muss, um eine Endothelin-Antagonisierung bewirken zu können. Obwohl die Versuche deutlich machen, dass die Endothelin-antagonisierende Wirkung über den FP-Rezeptor vermittelt wird, bleibt die Frage nach dem genauen Wirkmechanismus jedoch vorerst offen.

Aus den Daten der Versuche geht weiterhin hervor, dass Fluprostenol selbst keine kontraktile Wirkung auf das Trabekelmaschenwerk hat. Diese Ergebnisse passen gut zu den von Krauss et al. durchgeführten Versuchen, die für  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ebenfalls keinen Kontraktionseffekt auf BTM-Zellen nachweisen konnten [120]. Dies scheint in Anbetracht dessen, dass der FP-Rezeptor im Allgemeinen zu den klassischen „Kontraktionsrezeptoren“ gezählt wird erst einmal ungewöhnlich.

Auch auf die Carbachol-induzierte Kontraktion hatte Fluprostenol in den Versuchen keinerlei Effekt gezeigt. Carbachol, ein Strukturanalogon des Neurotransmitters Acetylcholin, vermittelt seine Wirkung über membranständige Muscarinrezeptoren, die zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. FP-Rezeptor-Agonisten scheinen folglich keinen Einfluss auf über muscarinerge Rezeptoren vermittelte Signalwege zu haben. Bis heute sind fünf Subtypen des Muscarinrezeptors (m1-m5) bekannt, die sich bezüglich ihrer Pharmakodynamik und -kinetik zum Teil deutlich voneinander unterscheiden. Im Trabekelmaschenwerk werden die muscarinergen Rezeptoren des m1-, m2- sowie m3- Subtyps exprimiert und sind nachweislich an Kontraktionsmechanismen beteiligt [32]. Der Reaktionsweg bei Aktivierung der muskari-nergen Rezeptoren läuft je nach Subtyp und Gewebelokalisation entweder über das Phosphoinositid-Phospholipase-C-System oder das Adenylatcyclase-System. So scheint der  $m_3$ -Rezeptor über die Stimulation der Phospholipase-C (PLC) vorrangig für die Kontraktion in der glatten Muskulatur verantwortlich zu sein. In Anbetracht dessen, dass Endothelin seine kontraktile Wirkung ebenfalls über das PLC-System entfaltet, darf man zurecht annehmen, dass hier verschiedene G-Proteine bzw. G-Protein-gekoppelte Kinasen an der Wirkungsvermittlung über den ET- und m-Rezeptor beteiligt sein müssen. Dies würde erklären, warum Fluprostenol nur auf eine der beiden Signalkaskaden eine Wirkung ausübt.

Alle bisher erwähnten Versuche zur Wirkungsermittlung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und seinen Derivaten fanden unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Bedingungen statt. Aus unseren Vorarbeiten wissen wir jedoch, dass Endothelin sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige als auch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktionen induziert [37]. Somit stellte sich die Frage, ob  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und seine Analoga auch eine Wirkung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktion haben. Um dies beantworten zu können, wurden unter Zugabe des Komplexbildners EGTA und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators BAPTA-AM intra- und extrazellulär  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Versuchsbedingungen geschaffen. Unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen wurde dann zuerst  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und anschließend ET-1 zugesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe unterschieden sich nicht von denen der  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Versuche. Auch hier zeigte der FP-Rezeptor-Agonist selbst keinen Einfluss auf den Tonuszustand des Trabekelmaschenwerks, aber bewirkte eine Antagonisierung der ET-1-induzierten Kontraktion. Das bedeutet, dass FP-

Rezeptor-Agonisten sowohl in die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige als auch in die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Endothelin-induzierte Kontraktion eingreifen und somit beide Signaltransduktionswege beeinflussen können.

#### 4.3.1.1. Calcium-abhängige Signaltransduktion

Bei diesem Signaltransduktionsweg binden verschiedene Agonisten an einen G-Proteingekoppelten Rezeptor. Dabei kommt es zur Aktivierung des G-Proteins bzw. seiner  $\alpha$ -Untereinheit, was wiederum zur Stimulation der  $\beta$ -Isoform der PLC führt. Die PLC ihrerseits bewirkt die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in die beiden Second-Messenger Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG).  $\text{IP}_3$  führt durch die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern zu einem Anstieg der freien zytosolischen Calcium-Konzentration. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche ihrerseits die Phosphorylierung von Proteinen und Membrankanälen bewirkt und dadurch zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt.

Aus den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten ist zu entnehmen, dass die Endothelin-induzierte Kontraktion im Trabekelmaschenwerk sich durchaus dieses klassischen und altbekannten Signaltransduktionsweges bedient. An welcher Stelle der Signaltransduktion jedoch die Prostaglandin-Analoga eingreifen und die Endothelin-induzierte Kontraktion nachweislich inhibieren, ist derzeit noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt hierfür mehrere Erklärungsansätze, die weiter unten im Einzelnen diskutiert werden sollen.

#### 4.3.1.2. Calcium-unabhängige Signaltransduktion

Man geht davon aus, dass mindestens zwei verschiedene Signalwege existieren, die ohne intrazellulären Calcium-Anstieg zu einer glattmuskulären Kontraktion führen.

Zum einen geschieht dies über die Aktivierung der  $\epsilon$ -Untereinheit der bereits oben erwähnten Proteinkinase C (PKC- $\epsilon$ ), welche in aktiviertem Zustand die katalytische Einheit der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) direkt inhibiert. Dadurch wird die Dephosphorylierung unterbunden und die Interaktion zwischen Aktin und Myosin bleibt bestehen.

Zum anderen kommt es über die Aktivierung von bestimmten G-Proteinen zur Stimulierung der Rho-A-Kinase, einer Serin-Threonin-Kinase. Die aktivierte Rho-A-Kinase ihrerseits bewirkt über Phosphorylierung der MLCP eine Aktivitäts-Hemmung derselben.

In beiden Fällen führt die Inhibierung der Dephosphorylierung der Myosin-Leichtkette (MLC) alleine ohne intrazellulären Calcium-Anstieg zum Auslösen einer Kontraktion.

Es ist bekannt, dass auch Endothelin in der Lage ist, unter extra- und intrazellulär  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen eine Kontraktion am Trabekelmaschenwerk auszulösen.

Thieme et al. konnten die Beteiligung beider oben genannten Signalwege der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion im bovinen Trabekelmaschenwerk nachweisen [37, 81, 82]. Rao et al. beschrieben in ihrer Arbeit an humanem Trabekelmaschenwerk ebenfalls eine Signaltransduktion über Rho-A, welche über MLC-Phosphorylierung zu einer Kontraktion führte [121]. Darüber hinaus stellten sie einen Zusammenhang zwischen der über die Rho-A induzierten Trabekelmaschenwerk-Kontraktion und dem daraus resultierenden IOD-Anstieg dar. Dies legt nahe, dass eine Beteiligung der hier beschriebenen Signaltransduktionswege an der Regulation des Augeninnendrucks sehr wahrscheinlich ist.

Diese Arbeit belegt erstmals, dass auch die Inhibierung dieser Endothelin-induzierten Kontraktion durch Prostaglandin-Analoga unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen möglich ist. Inwiefern dabei die Signaltransduktionswege über die PKC- $\epsilon$  bzw. Rho-A-Kinase eine Rolle spielen, ist derzeit noch nicht geklärt.

Gong et al. konnten 1992 zeigen, dass auch die Arachidonsäure, von der die Prostaglandine pharmakochemisch abstammen, in der Lage ist, die MLCP zu inhibieren [122]. Fu et al. gelang es später sogar zu beweisen, dass dies zum Teil durch die Aktivierung der Rho-A-Kinase geschieht [123]. Eine Beeinflussung auf dieser Ebene ist demnach denkbar, auch wenn die genaue Interaktion zwischen dem durch Endothelin bzw. Prostaglandin aktiviertem Signalweg noch unklar erscheint.

Interessant ist, dass der beschriebene  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Signalmechanismus nur bei der Kontraktion des Trabekelmaschenwerks vorzufinden ist, die Kontraktionskraft des Ziliarmuskels hingegen vollständig von der Anwesenheit von extrazellulärem Calcium abhängig zu sein scheint [37]. Das bedeutet, dass das Trabekelmaschenwerk und der Ziliarmuskel in Bezug auf ihre Calcium-Abhängigkeit verschiedene Eigenschaften vorweisen. Dies bietet wiederum einen hoffnungsvollen Ansatzpunkt hinsichtlich einer zielgerichteten Beeinflussung des Trabekelmaschenwerks bei der Glaukomtherapie. Substanzen, welche den Tatbestand des unterschiedlichen Verhaltens von Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel ausnutzen, sollten demnach ET-1-induzierte Kontraktionen antagonisieren können, ohne dabei eine Wirkung auf den

Ziliarmuskel zu haben, da beide Strukturen bekanntermaßen in einem funktionellen Antagonismus zueinander stehen.

Da Prostaglandin-Analoga wie oben dargestellt auch unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen wirken, sind sie als postulierte Endothelin-Antagonisten somit Erfolg versprechende Medikamente im gezielten Einsatz gegen die Glaukom-Erkrankung.

#### 4.3.2. Calciummessungen

Die Daten der durchgeführten Calciummessungen zeigen, dass ET-1 in BTM-Zellen einen transienten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Versuchen unserer und anderer Arbeitsgruppen [89, 91]. Eine durch ET-1-Applikation ausgelöste Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration lässt sich auch in einer Vielzahl von anderen Geweben, wie zum Beispiel glatten Muskelzellen beobachten. Vor allem in den glattmuskulären Zellen von Gefäßen konnte ein ET-1-bedingter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, der regelmäßig mit einer Kontraktion der Gefäße einhergeht, nachgewiesen werden [124, 125]. Es ist allgemein bekannt, dass die Kontraktion der glatten Muskulatur zumindest teilweise über eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration vermittelt wird [126]. Geht man nun davon aus, dass auch das Trabekelmaschenwerk über glattmuskelähnliche Eigenschaften verfügt, so erscheint die Vermutung einer ebenfalls durch einen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg ausgelösten Kontraktion nachvollziehbar.

Aus den Ergebnissen der Calciummessungen geht weiterhin hervor, dass der FP-Rezeptor-Agonist Fluprostenol selbst keinen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in den bovinen Trabekelmaschenwerkzellen auslöst, den durch Endothelin-1 induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg jedoch vermindert. Die von uns gezeigte fehlende Wirkung von FP-Rezeptor-Agonisten auf das intrazelluläre Calcium, die an kultivierten bovinen Zellen ermittelt wurde, korreliert damit gut mit dem fehlenden Effekt auf die Basisspannung an nativem Gewebe.

Die Versuchsergebnisse weisen jedoch Unterschiede zu Ergebnissen der Arbeitsgruppe um N.A. Sharif auf. Sharif et al. konnten in ihren Versuchen an humanen Trabekelmaschenwerkzellen zeigen, dass Prostaglandin-Analoga der FP-Rezeptorklasse zu einer intrazellulären Calcium-Mobilisierung über die  $\text{IP}_3$ -Aktivierung führen [127]. Diese Arbeitsgruppe wertete dabei jedoch nur den Fluoreszenzspiegel aus. Eine Angabe über den absoluten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration wurde von ihnen nicht gemacht. Es ist somit nicht bekannt, ob der von Sharif et al. ermittelte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg ausreichen würde, um eine relevante Kontrak-

tion im Trabekelmaschenwerk auslösen zu können. Die unterschiedlichen Ergebnisse können unter anderem auch durch Unterschiede in den technischen Versuchsvoraussetzungen wie zum Beispiel unterschiedlich empfindlichen Messgeräten oder durch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen hervorgerufen sein.

#### **4.4. Mögliche Wirkung der Prostaglandin-Derivate auf die Signaltransduktion im Trabekelmaschenwerk**

Der genaue Mechanismus der relaxierenden Wirkung und damit der Endothelin-Antagonisierung durch FP-Rezeptor-Agonisten im Trabekelmaschenwerk ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt eine Vielzahl von möglichen Erklärungsansätzen. Einige davon stehen zum Teil in Widerspruch zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zu diesem Thema.

So wurde für andere glattmuskuläre Gewebe des Auges wie z.B. den bovinen Iris-Sphincter nachgewiesen, dass FP-Rezeptor-Agonisten (in diesem Fall  $\text{PGF}_{2\alpha}$  selbst) zu einer Phosphorylierung der leichten Ketten der Myosinköpfchen durch die MLCK und damit zu einer Kontraktion der Muskelzelle führt [102]. Für das Trabekelmaschenwerk dagegen konnte für die von uns verwendeten Konzentrationen (für  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und Fluprostenol =  $10^{-6}$  M) keine durch diese FP-Rezeptor-Agonisten induzierte Kontraktion nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund dafür könnte eine im Vergleich zu anderen Glattmuskel-Geweben zu geringe FP-Rezeptordichte des Trabekelmaschenwerks sein, sodass die Aktivierung der vorhandenen Rezeptoren für eine messbare Kontraktionsinduktion nicht ausreichend ist.

Ein anderer Erklärungsansatz wäre das Vorhandensein verschiedener Isoformen des FP-Rezeptors im Trabekelmaschenwerk. Bis heute sind zwei Isoformen des FP-Rezeptors bekannt: der  $\text{FP}_A$ - und  $\text{FP}_B$ -Rezeptor, welche sich bis auf ihre Carboxyl-Endgruppe biochemisch nicht voneinander unterscheiden. Es ist denkbar, dass diese sich unterschiedlicher Signaltransduktionswege bedienen, wodurch verschiedene Endeffekte resultieren. So kann es durch die Aktivierung der einen Isoform zu einer Kontraktion, durch die Aktivierung der anderen zu einer Relaxation des Gewebes kommen. Je nachdem, welche Isoform in der Überzahl vorliegt, kann es demnach entweder zu einer Kontraktion oder Relaxation des Gewebes kommen. Liegen beide Formen zu gleichen Anteilen vor, würde sich die Wirkung aufheben. Eine Reaktion auf die Substanz wäre in diesem Fall nicht nachweisbar.



Nicht zu vergessen ist auch, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  im Gegensatz zu Fluprostenol kein selektiver FP-Rezeptor-Agonist ist, deswegen durchaus widersprüchliche Ergebnisse beim Einsatz beider Substanzen erwartet werden können. Wie in Kapitel 4.2.1. bereits aufgeführt, hat Fluprostenol, ein hochselektiver FP-Rezeptor-Agonist, auch in Versuchen anderer Arbeitsgruppen eine relaxierende Wirkung auf das untersuchte Gewebe gehabt. Damit liegt die Vermutung nah, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  die beschriebene kontrahierende Wirkung wohlmöglich über einen anderen Rezeptor vermittelt. Die meisten Gewebe verfügen über eine heterogene Prostaglandin-Rezeptor-Population, welche sowohl relaxierende als auch kontrahierende Effekte übermitteln. Dabei würde der ausgelöste Effekt vor allem davon abhängen, welcher Rezeptortyp zahlenmäßig im Gewebe überwiegt und wie hoch die Affinität des Substrats zum jeweiligen Rezeptortyp ist.

Wie bereits erwähnt wurde, ist eine Inhibierung der Endothelin-induzierten Kontraktion zudem nur möglich, wenn die Prostaglandin-Analoga vor der Endothelin-Gabe appliziert werden. Die Applikation von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nach ET-1-induzierter Kontraktion hatte keinerlei Effekt. Das heißt, dass der FP-Rezeptor noch vor Bindung von Endothelin an seinen Rezeptor aktiviert werden muss, um eine abschwächende Wirkung auf die Endothelin-induzierte Kontraktion ausüben zu können. Eine Desensitivierung des ET-Rezeptors durch FP-Rezeptoraktivierung oder eine Interaktion intrazellulärer Signalwege wäre ein möglicher Erklärungsansatz.

Eine wechselseitige Wirkung zwischen Endothelin und Prostaglandinen wurde unabhängig vom aktuellen Diskussionsgegenstand schon vor Jahren beobachtet. So bewirkte die intraokuläre Injektion von ET-1 in Kaninchenaugen einen deutlichen Konzentrationsanstieg von Arachidonsäuremetaboliten wie  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$  im Kammerwasser, was auf eine Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  zurückzuführen ist [128, 129]. Das heißt, dass über den ET-1-Rezeptor durch die Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  die vermehrte Freisetzung der Arachidonsäure und ihrer Metaboliten vermittelt wird und damit in den Regelkreis der Prostaglandinsynthese eingegriffen werden kann. Umgekehrt ist demnach auch die Auswirkung der Prostaglandine auf den ET-1-Rezeptor durchaus vorstellbar. Welche Mechanismen dabei im Einzelnen eine Rolle spielen könnten, bleibt auch hier vorerst unbeantwortet.

## 5. Zusammenfassung

Das Glaukom ist eine der häufigsten Erblindungsursachen weltweit. Es ist gekennzeichnet durch eine progrediente Schädigung des Sehnervs mit einhergehendem Verlust visueller Funktionen und charakteristischen Gesichtsfeldausfällen. Als einer der wichtigsten pathogenetischen Faktoren gilt der individuell zu hohe intraokulare Druck (IOD), welcher bisher auch die einzige therapeutisch beeinflussbare Größe darstellt. Der IOD wird hauptsächlich durch den Kammerwasserabflusswiderstand im Kammerwinkel bestimmt. Das Trabekelmaschenwerk, durch das 85 % des Kammerwassers drainiert werden (konventioneller Weg), ist durch kontraktile Elemente aktiv an der Regulation des Abflusswiderstands beteiligt. Eine Beeinflussung der Kontraktilität dieses Gewebes bietet damit einen viel versprechenden Ansatzpunkt für eine drucksenkende Glaukomtherapie.

Die Kontraktion des Trabekelmaschenwerkes führt zu einer Erhöhung des Abflusswiderstands. Sie wird u.a. durch das vasoaktive Peptid Endothelin-1 (ET-1) induziert, welches bei Glaukopatienten in erhöhter Konzentration im Kammerwasser nachgewiesen werden konnte. ET-1 scheint somit bei der Pathogenese des Glaukoms eine wesentliche Rolle zu spielen.

Prostaglandin-Analoga stellen die neueste und potenteste Substanzgruppe der heutigen Antiglaukomatosa dar. Ihre Wirkung wurde bisher durch die Steigerung des uveoskleralen Kammerwasserabflusses erklärt.

Diese Arbeit zeigt, dass Fluprostenol (Travoprost®), ein therapeutisch verwendetes Prostaglandin-Analogon, eine Inhibierung der ET-1-induzierten Kontraktion am bovinen Trabekelmaschenwerk bewirkt. Diese Wirkung wird über den FP-Rezeptor vermittelt. Weiter konnte gezeigt werden, dass Fluprostenol eine Reduktion des ET-1-induzierten Anstiegs der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration hervorruft. Es ist bekannt, dass ET-1 am Trabekelmaschenwerk neben der  $Ca^{2+}$ -abhängigen auch eine  $Ca^{2+}$ -unabhängige Kontraktion auslöst. Auch die  $Ca^{2+}$ -unabhängige Kontraktion wird durch Prostaglandin-Analoga inhibiert.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass Prostaglandin-Analoga, die zu den neuesten und potentesten Antiglaukomatosa gehören, einen Endothelin-antagonisierenden Effekt auf die Kontraktion des Trabekelmaschenwerkes ausüben. Über diesen Effekt üben Prostaglandin-Analoga neben ihrem bereits bekannten Einfluss auf den uveoskleralen Kammerwasserabfluss auch eine Wirkung auf den konventionellen Kammerwasserabfluss aus. Damit werden die Kenntnisse über den bisher angenommenen Wirkmechanismus dieser Substanzgruppe erweitert und es bietet sich ein neuer, potentieller Angriffspunkt für eine zielgerichtete Entwicklung neuer Antiglaukomatosa.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Quigley, H.A. (1996); *Number of people with glaucoma worldwide*. Br. J. Ophthalmol., 80, 389-393
2. Sommer, A., Tielsch, J.M., Quigley, H.A., Gottsch, J.D., Javitt, J.C. et al. (1991); *Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in East Baltimore*. N Engl J Med, 325, 1412-1417
3. Kocur, I. and Resnikoff, S. (2002); *Visual impairment and blindness in Europe and their prevention*. Br J Ophthalmol, 86, 716-722
4. Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G.P., et al. (2004); *Global data on visual impairment in the year 2002*. Bull World Health Organ, 82, 844-851
5. Pfeiffer, N. (2005); *Glaukom und okuläre Hypertension*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
6. Knauer, C. and Pfeiffer, N. (2006); *Blindness in Germany--today and in 2030*. Ophthalmologie, 103, 735-741
7. Flammer, J. et al. (2002); *The impact of ocular blood flow in glaucoma*. Prog Retin Eye Res, 21(4), 359-93 / Review.
8. Mutschler, E., Wiederholt, M., Upmeyer, H.J. (2001); *Regulationsdynamik beim Glaukom*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
9. Kanski, J.J. (2003); *Clinical Ophthalmology – A Systematic Approach*. Elsevier GmbH, München
10. Lütjen-Drecoll, E. (1999); *Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes*. Prog Retin Eye Res, 18, 91-119
11. Schlötzer-Schrehardt, U. (1998); *Pathogenese der Glaukome: Strukturen und Mechanismen*. Online Journals of Ophthalmology – Scientific Communications Articles / [www.onjoph.com](http://www.onjoph.com)
12. Gong, H., Tripathi, R.C., Tripathi, B.J. (1996); *Morphology of the aqueous outflow pathway*. Microsc Res Tech, 33, 336-367
13. Wiederholt, M., Thieme, H., Stumpff, F. (2000); *The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility*. Prog Ret Eye Res, 19, 271-295
14. Brubaker, R.F. (1991); *Flow of aqueous humor in humans; the Friedenwald lecture*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 32, 3143–3166
15. Lütjen-Drecoll, E., Gabelt, B.T., Tian, B. and Kaufman, P.L. (2001); *Outflow of aqueous humor*. J Glaucoma, 10, 42-44

16. Mittag, T.W., Danias, J., Pohorenc, G., Yuan, H.M., Burakgazi, E., Chalmers-Redman, R. et al. (2000); *Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 41, 3451-3459
17. Findl, O., Strenn, K., Wolzt, M., Menapace, R., Vass, C., Eichler, H.G. et al. (1997); *Effects of changes in intraocular pressure on human ocular haemodynamics*. Curr Eye Res, 16, 1024-1029
18. Bellezza, A.J., Rintalan, C.J., Thompson, H.W., Downs, J.C., Hart, R.T. and Burgoyne, C.F. (2003); *Deformation of the lamina cribrosa and anterior scleral canal wall in early experimental glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 44, 623-637
19. Thieme, H. (2006); *Medikamentöse Glaukomtherapie*. Klin Monatsbl Augenheilkd, 223, R73–R83
20. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS, 2000); 7. *The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration*. The AGIS Investigators, 130, 429-440
21. Heijl, A., Leske, M.C., Bengtsson, B., Hyman, L. et al. (2002); *Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: Results from the early manifest glaucoma trial*. Arch Ophthalmol, 120, 1268-1279
22. Collaborative Normal Tension Glaucoma Study Group (1998); *The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma*. Am J Ophthalmol, 126, 498-505
23. Kass, M.A., Heuer, D.K. et al. (2002); *"The Ocular Hypertension Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma"*. Arch Ophtahlmol, 120, 701-713
24. Lütjen-Drecoll, E., Kruse, F.E. (2007); *Primäres Offenwinkelglaukom*. Der Ophthalmologe, 104, 167-179
25. Lepple-Wienhues, A., Stahl, F. and Wiederholt, M. (1991a); *Differential smooth muscle-like contractile properties of trabecular meshwork and ciliary muscle*. Exp Eye Res, 53, 33-38
26. Barany, E.H. (1962); *The mode of action of pilocarpine on outflow resistance in the eye of a primate (Cercopithecus ethiops)*. Invest Ophthalmol, 1, 712-727
27. Grüb, M., Mielke, J. (2004); *Kammerwasserdynamik – Kammerwasserbildung und Kammerwasserabfluss*. Der Ophthalmologe, 101, 357-365

28. Tamura, M., Iwamoto, Y., Nakatsuka, K., Yamanouchi, U. (1989); *Immunofluorescence studies of the cytoskeletal and contractile elements in cultured human trabecular cells*. Jpn J Ophthalmol, 33, 95-102
29. Flügel, C., Tamm, E., Lütjen-Drecoll, E. (1991); *Different cell populations in bovine trabecular meshwork: an ultrastructural and immunocytochemical study*. Exp Eye Res, 52, 681-690
30. Wiederholt, M. (1998); *Direct involvement of trabecular meshwork in the regulation of aqueous humor outflow*. Current Opinion in Ophthalmology, 9, II, 46-49
31. Wiederholt, M. and Stumpff, F. (2000); *Regulation of trabecular meshwork contractility*. Ophthalmologica, 214, 33-53
32. Thieme, H., Hildebrandt, J., Choritz, L., Strauss, O. and Wiederholt, M. (2001a); *Muscarinic receptors of the M2 subtype in human and bovine trabecular meshwork*. Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 239, 310-315
33. Rosenthal, R., Choritz, L., Schlott, S., Bechrakis, N.E., Jaroszewski, J., Wiederholt, M., et al. (2005a); *Effects of ML-7 and Y-27632 on carbachol- and endothelin-1-induced contraction of bovine trabecular meshwork*. Exp Eye Res, 80, 837-45.
34. Wiederholt, M., Schäfer, R., Wagner, U. and Lepple-Wienhues, A. (1996); *Contractile response of the isolated trabecular meshwork and ciliary muscle to cholinergic and adrenergic agents*. Ger J Ophthalmol, 5, 146-153
35. Wiederholt, M., Dörschner, N. and Groth, J. (1997); *Effect of diuretics, channel modulators and signal interceptors on contractility of the trabecular meshwork*. Ophthalmologica, 211, 153-160
36. Wiederholt, M. and Stumpff, F. (1998); *The trabecular meshwork and aqueous humor reabsorption*. In "The Eye's Aqueous Humor: From Secretion to Glaucoma", Current Topics in Membranes, 45 (ed. M. M. Civan) pp. 163-202. Academic Press, San Diego
37. Rosenthal, R., Meissner, S., Choritz, L., Foerster, M.H., Thieme, H. (2005); *Endothelin-1-induced  $Ca^{2+}$ -free contraction in trabecular meshwork: interaction with RhoA*. Invest Ophthalmol Vis Sci, abstract No. 3695
38. Wiederholt, M., Bielka, S., Schweig, F., Lütjen-Drecoll, E. and Lepple-Wienhues, A. (1995); *Regulation of outflow rate and resistance in the perfused anterior segment of the bovine eye*. Exp Eye Res, 61, 223-234
39. Lepple-Wienhues, A., Stahl, F., Willner, U., Schafer, R., Wiederholt, M. (1991b); *Endothelin-evoked contractions in bovine ciliary muscle and trabecular meshwork: interaction with calcium, nifedipine and nickel*. Curr Eye Res, 10, 983-989

40. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y. et al. (1988); *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.* Nature, 332, 411-415
41. Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyachi, T., Goto, K. et al. (1989); *The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.* Proc Natl Acad Sci USA, 86, 2863-2867
42. Luscher, T.F. and Wenzel, R.R. (1995); *Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications.* Agents Actions Suppl, 45, 237-253
43. Ortega Mateo, A. and de Artinano, A.A. (1997); *Highlights on endothelins: a review.* Pharmacol Res, 36, 339-351
44. Sakurai, T., Yanagisawa, M. and Masaki, T. (1992); *Molecular characterization of endothelin receptors.* Trends Pharmacol Sci, 13, 103-108
45. Kaur, S., Frishman, W.H., Singh, I., Tamirisa, P., Kumar, A. (2001); *Endothelin as a therapeutic target in the treatment of cardiovascular disease.* Review. Heart Dis, 3, 176-188
46. Lepple-Wienhues, A. et al. (1992); *Endothelin-like immunoreactivity in the aqueous humour and in conditioned medium from cultured ciliary epithelial cells.* Curr Eye Res., 11, 1041-1046
47. Eichhorn, M. and Lutjen-Drecoll, E. (1993); *Distribution of endothelin-like immunoreactivity in the human ciliary epithelium.* Curr Eye Res, 12, 753-757
48. Prasanna, G., Dibas, A., Finkley, A. and Yorio, T. (1999); *Identification of endothelin converting enzyme-1 in human non-pigmented ciliary epithelial cells.* Exp Eye Res, 69, 175-183
49. Prasanna, G., Narayan, S., Krishnamoorthy, R.R. and Yorio, T. (2003); *Eyeing endothelins: a cellular perspective.* Mol Cell Biochem, 253, 71-88
50. Okada, K., Sugiyama, K., Haque, S.R., Taniguchi, T. and Kitazawa, Y. (1994); *[Biphasic intraocular pressure response to intravitreal injection of endothelin-1].* Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 98, 935-941
51. Okada, K., Sugiyama, K., Haque, M.S., Taniguchi, T. and Kitazawa, Y. (1995); *The effects of endothelin-1 on intraocular pressure and pupillary diameter in rabbits.* Jpn J Ophthalmol, 39, 233-241
52. Taniguchi, T., Okada, K., Haque, M.S., Sugiyama, K. and Kitazawa, Y. (1994); *Effects of endothelin-1 on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in the rabbit eye.* Curr Eye Res, 13, 461-464

53. Granstam, E., Wang, L. and Bill, A. (1992); *Ocular effects of endothelin-1 in the cat*. Curr Eye Res, 11, 325-332
54. Funk, R.H., Wagner, W. and Wild, J. (1992); *Microendoscopic observations of the hemodynamics in the rabbit ciliary processes*. Curr Eye Res, 11, 543-551
55. Orgul, S., Cioffi, G.A., Bacon, D.R. and Van Buskirk, E.M. (1996); *An endothelin-1-induced model of chronic optic nerve ischemia in rhesus monkeys*. J Glaucoma, 5, 135-138
56. Oku, H., Sugiyama, T., Kojima, S., Watanabe, T. and Azuma, I. (1999); *Experimental optic cup enlargement caused by endothelin-1-induced chronic optic nerve head ischemia*. Surv Ophthalmol, 44 (1), 74-84
57. Haefliger, I.O., Flammer, J. and Luscher, T.F. (1993); *Heterogeneity of endothelium-dependent regulation in ophthalmic and ciliary arteries*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 34, 1722-1730
58. Noske, W., Hensen, J., Wiederholt, M. (1997); *Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 235, 551-552
59. Tezel, G., Kass, M.A., Kolker, A.E., Becker, B. and Wax, M.B. (1997); *Plasma and aqueous humor endothelin levels in primary open-angle glaucoma*. J Glaucoma, 6, 83-89
60. Kaiser, H.J., Flammer, J., Wenk, M. and Luscher, T. (1995); *Endothelin-1 plasma levels in normal-tension glaucoma: abnormal response to postural changes*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 233, 484-488
61. Sugiyama, T., Moriya, S., Oku, H. and Azuma, I. (1995b); *Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma: clinical and fundamental studies*. Surv Ophthalmol, 39 (1), 49-56
62. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2003); *Biochemie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
63. Löffler, G., Petrides, P.E., Heinrich, P.C. (2006); *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer Verlag Berlin
64. Camras, C.B., Bito, L.Z., Eakins, K.E. (1977); *Reduction of intraocular pressure by prostaglandins applied topically to the eyes of conscious rabbits*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 16, 1125-1134
65. Al-Jazzaf, A.M., DeSantis, L., Netland, P.A. (2003); *Travoprost: a potent ocular hypotensive agent*. Drugs Today (Barc), 39, 61-74

66. Hylton, C., Robin, A.L. (2003); *Update on prostaglandin analogs*. Curr Opin Ophthalmol, 14, 65-69
67. Nguyen, Q.H. (2004); *The role of prostaglandin analogues in the treatment of glaucoma in the 21st century*. Int Ophthalmol Clin, 44, 15-27
68. Perry, C.M., McGavin, J.K., Culy, C.R., Ibbotson, T. (2003); *Latanoprost : an update of its use in glaucoma and ocular hypertension*. Drugs Aging, 20, 597-630
69. Thieme, H., Stumpff, F., Ottlecz, A., Percicot, C.L., Lambrou, G.N., Wiederholt, M. (2001); *Mechanisms of action of unoprostone on trabecular meshwork contractility*. Invest Ophthalmol Vis Sci., 42(13), 3193-3201
70. Thieme, H., Schimmat, C., Münzer, G., Boxberger, M., Fromm, M., Pfeiffer, N. et al. (2006); *Endothelin antagonism: effects of FP receptor agonists prostaglandin F2alpha and fluprostenol on trabecular meshwork contractility*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 47, 938-945
71. Lograno, M.D., Reibaldi, A. (1986); *Receptor-responses in fresh human ciliary muscle*. Br J Pharmacol, 87, 379-385
72. Ito, Y., Yoshitomi, T. (1986); *Membrane and contractile properties of the dog ciliary muscle*. Br J Pharmacol, 88, 629-38
73. Rohen, J.W., Voth, D. (1964); *On the Comparative Anatomy and Histochemistry of the Primate Eye*. Verh Anat Ges, 58, 418
74. Tripathi, R.C. (1974); *Fine structure of mesodermal tissues of the human eye*. Trans Ophthalmol Soc U K, 94, 663-695
75. Brutsaert, D.L., Meulemans, A.L., Sipido, K.R., Sys, S.U. (1988); *Effects of damaging the endocardial surface on the mechanical performance of isolated cardiac muscle*. Circ Res, 62, 358-366
76. Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985); *A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties*. Journal of Biological Chemistry, 260, 3440-3450
77. Wohlleben, H. (2005); *Der Einfluss von AGEs und der Wachstumsfaktoren IGF-1 und bFGF auf die freie intrazelluläre Calcium-Konzentration in retinalen Pigmentepithelzellen*. Aus „Institut für klinische Physiologie“ pp. 90. Freie Universität Berlin: Berlin.
78. Nilsson, S.F., Sperber, G.O., Bill, A. (1989); *The effect of prostaglandin F2alpha-1-isopropylester (PGF2 alpha-IE) on uveoscleral outflow*. Prog Clin Biol Res, 312, 429-436



79. Alajuuma, P., Oksala, O., Alaranta, S., Palkama, A., Uusitalo, H. (2002); *Effect of simultaneous CGRP and PGF(2alpha) on the outflow facility in the rabbit eye*. Ophthalmic Res, 34, 309-313
80. Schlott, S. (2005); *Proteinbiochemischer Nachweis der Expressierung von Myosin und Myosin-Light-Chain-Kinase in Trabekelwerkzellen des Auges*. Aus „Institut für klinische Physiologie“ pp. 86. Freie Universität Berlin: Berlin.
81. Thieme, H., Nass, J.U., Nuskovski, M., Bechrakis, N.E., Stumpff, F., Strauss, O., et al. (1999); *The effects of protein kinase C on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 40, 3254-3261
82. Thieme, H., Nuskovski, M., Nass, J.U., Pleyer, U., Strauss, O. & Wiederholt, M. (2000); *Mediation of Calcium-Independent Contraction in Trabecular Meshwork through Protein Kinase C and Rho-A*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 41, 4240-4246
83. Tian, B., Geiger, B., Epstein, D.L. & Kaufman, P.L. (2000b); *Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 41, 619-623
84. Peterson, J.A., Tian, B., Bershadsky, A.D., Volberg, T., Gangnon, R.E., Spector, I., et al. (1999); *Latrunculin-A increases outflow facility in the monkey*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 40, 931-941
85. Koliakos, G.G., Konstas, A.G., Schlötzer-Schrehardt, U. et al. (2004); *Endothelin-1 concentration is increased in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome*. Br J Ophthalmol, 88, 523-527
86. Sokolovsky, M. (1995); *Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms*. Pharmacol Ther, 68, 435-471
87. Hirata, Y., Emori, T., Eguchi, S., Kanno, K., Imai, T., Ohta, K., et al. (1993); *Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells*. J Clin Invest, 91, 1367-1373
88. Mac Cumber, M.W. and D'Anna, S.A. (1994); *Endothelin receptor-binding subtypes in the human retina and choroid*. Arch Ophthalmol, 112, 1231-1235
89. Tao, W., Prasanna, G., Dimitrijevic, S., Yorio, T. (1998); *Endothelin receptor A is expressed and mediates the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mobilization of cells in human ciliary smooth muscle, ciliary nonpigmented epithelium, and trabecular meshwork*. Current Eye Research, 17, 31-38
90. Zhang, X., Clark, A.F., Yorio, T. (2003); *Interactions of endothelin-1 with dexamethasone in primary cultured human trabecular meshwork cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 44, 5301-5308

91. Choritz, L. et al. (2005); *Pharmacological and functional characterization of endothelin receptors in bovine trabecular meshwork and ciliary muscle*. Ophthalmic Res, 37, 179-187
92. Talesnik, J. (1986); *Arachidonic acid induced coronary reactions and their inhibition by docosahexaenoic acid*. Can J Physiol Pharmacol, 64, 77–84
93. Engler, M.B., Karanian, J.W., Salem, N. Jr. (1990); *Docosahexaenoic acid (22:6n3)-induced relaxation of the rat aorta*. Eur J Pharmacol, 185, 223–226
94. Mano, M.T., Bexis, S., Abeywardena, M.Y. et al. (1995); *Fish oils modulate blood pressure and vascular contractility in the rat and vascular contractility in the primate*. Blood Press, 4, 177–186
95. Shimokawa, H., Vanhoutte, P.M. (1989); *Dietary omega-3 fatty acids and endothelium-dependent relaxations in porcine coronary arteries*. Am J Physiol, 256, H968-H973
96. Hayashi, E., Yoshitomi, T., Ishikawa, H., Hayashi, R., Shimizu, K. (2000); *Effects of isopropyl unprostone on rabbit ciliary artery*. Jap J Ophthalmol, 44 (3), 214-220
97. Lindsey, J.D., Kashiwagi, K., Boyle, D., Kashiwagi, F., Firestein, G.S., Weinreb, R. N. (1996); *Prostaglandins increase proMMP-1 and proMMP-3 secretion by human ciliary smooth muscle cells*. Curr Eye Res, 15, 869-875
98. Lindsey, J.D., Kashiwagi, K., Kashiwagi, F., Weinreb, R.N. (1997); *Prostaglandins alter extracellular matrix adjacent to human ciliary muscle cells in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 38, 2214-2223
99. Weinreb, R.N., Kashiwagi, K., Kashiwagi, F., Tsukahara, S., Lindsey, J.D. (1997); *Prostaglandins increase matrix metalloproteinase release from human ciliary smooth muscle cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 38, 2772-2780
100. Schachtschabel, U., Lindsey, J.D. and Weinreb, R.N. (2000); *The mechanism of action of prostaglandins on uveoscleral outflow*. Curr Opin Ophthalmol, 11(2), 112-115
101. Ansari, H.R., Davis, A.M., Kaddour-Djebbar, I., Abdel-Latif, A.A. (2003); *Effects of prostaglandin F2alpha and latanoprost on phosphoinositide turnover, myosin light chain phosphorylation and contraction in cat iris sphincter*. J Ocul Pharmacol Ther, 19, 217-231
102. Ansari, H.R., Kaddour-Djebbar, I., Abdel-Latif, A.A. (2004); *Effects of prostaglandin F2alpha, latanoprost and carbachol on phosphoinositide turnover, MAP kinases, myosin light chain phosphorylation and contraction and functional existence and expression of FP receptors in bovine iris sphincter*. Exp Eye Res, 78, 285-296

103. Narumiya, S., Sugimoto, Y. and Ushikubi, F. (1999); *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions*. *Physiol Rev*, 79, 1193-1226
104. Dao-Yi Yu et al. (2001); *Comparison of the vasoactive effects of the docosanoid uno-prostone and selected prostanoids on isolated perfused retinal arterioles*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 1499-1504
105. Astin, M. (1998); *Effects of prostaglandin E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>alpha and latanoprost acid on isolated ocular blood vessels in vitro*. *J Ocul Pharmacol Ther*, 14(2), 119-128
106. Walch, L., de Montpreville, V., Brink, Ch., Norel, X. (2001); *Prostanoid EP<sub>1</sub>- and TP-receptors involved in the contraction of pulmonary veins*. *Br J Pharmacol*, 134 (8), 1671-1678
107. Senior, J. et al. (1992); *In vitro characterization of prostanoid FP-, DP-, IP- and TP-receptors on the non-pregnant human myometrium*. *Br J Pharmacol*, 107, 215-221
108. Eglen, R.M. and Whiting, R.L. (1988); *The action of prostanoid receptors agonists and antagonists on smooth muscle and platelets*. *Br J Pharmacol*, 94, 591-601
109. Hayashi, S., Park, M.K. and Kuehl, T.J. (1985); *Relaxant and contractile responses to prostaglandins in premature, newborn and adult baboon cerebral arteries*. *J Pharmacol Exp Ther*, 233, 628-635
110. Toda, N. et al. (1988); *Mechanism underlying relaxations caused by prostaglandins and thromboxane A<sub>2</sub> analog in isolated dog arteries*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 11, 354-362
111. Chen, J., Champa-Rodriguez, M.L. and Woodward, D.F. (1995); *Identification of a prostanoid FP-receptor population endothelium-dependent vasorelaxation in the rabbit jugular vein*. *Br J Pharmacol*, 116, 3035-3041
112. Arner, M. Uski, T. and Högestätt, E.D. (1994); *Endothelium dependence of prostanoid-induced relaxation in human hand veins*. *Acta Physiol Scand*, 150, 267-272
113. Kawai, Y. and Ohhashi, T. (1991); *Prostaglandin F<sub>2</sub>alpha-induced endothelium-dependent relaxation in isolated monkey cerebral arteries*. *Am J Physiol*, 260, H1538-H1543
114. Schötzer-Schrehardt, U., Zenkel, M. and Nüsing, R.M. (2002); *Expression and localization of FP and EP prostanoid receptor subtypes in human ocular tissue*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 1475-1487
115. Mukhopadhyay, P., Bian, L., Yin, H., Bhattacharjee, P., Paterson, C. (2001); *Localization of EP(1) and FP receptors in human ocular tissues by in situ hybridisation*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 424-428

116. Matsuo, T. and Cynader M.S. (1992); *Localisation of prostaglandin F2 alpha and E2 binding sites in the human eye*. Br J Ophthalmol, 76, 210-213
117. Anthony, T.L., Pierce, K.L., Stamer W.D., Regan, J.W. (1998); *Prostaglandin F2 alpha receptors in the human trabecular meshwork*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 39, 315-321
118. Ziai, N., Dolan, J.W., Kacere, R.D. and Brubaker R.F. (1993); *The effects on aqueous dynamics of PhXA41, a new prostaglandin F2 alpha analogue, after topical application in normal and ocular hypertensive human eyes*. Arch Ophthalmol, 111, 1351-1358
119. Griffin, B.W., Klimko, P., Crider, J.Y. and Sharif, N.A. (1999); *AL-8810: A novel prostaglandin F2alpha analog with selective antagonist effects at the prostaglandin F2alpha (FP) receptor*. J Pharmacol Exp Ther, 290, 1278-1284
120. Krauss, A.H.-P., Wiederholt, M., Sturm, A., Woodward D.F. (1997); *Prostaglandin effect on the contractility of bovine trabecular meshwork and ciliary muscle*. Exp Eye Res, 64, 447-453
121. Rao, P.V., et al. (2001); *Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho-kinase-specific inhibitor Y-27632*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 42, 1029-1037
122. Gong, M. C., Fuglsang, A., Alessi, D. et al. (1992); *Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium*. Journal of Biological Chemistry, 267, 21492-21498
123. Fu, X., Gong, M. C., Jia, T., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P. (1998); *The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and phorbol ester-induced Ca<sup>2+</sup>-sensitization of smooth muscle*. FEBS Letters, 440, 183-187
124. Ozaki, H., Sato, K., Sakata, K. and Karaki, H. (1989); *Endothelin dissociates muscle tension from cytosolic Ca<sup>2+</sup> in vascular smooth muscle of rat carotid artery*. Jpn J Pharmacol, 50, 521-524
125. Murakawa, K., Kohno, M., Yokokawa, K., Yasunari, K., Horio, T., Kurihara, N. et al. (1990); *Endothelin-induced renal vasoconstriction and increase in cytosolic calcium in renal vascular smooth muscle cells*. Clin Exp Hypertens A, 12, 1037-1048
126. Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (1994); *Signal transduction and regulation of smooth muscle*. Nature, 372, 231-236
127. Sharif, N.A., Kelly, C.R. and Crider, J.Y. (2003); *Human trabecular meshwork cell responses induced by bimatoprost, travoprost, unoprostone and other FP prostaglandin receptor agonist analogues*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 44, 715-721

128. Granstam, E., Wang, L., Bill, A. (1991); *Effects of endothelins (ET-1, ET-2 and ET-3) in the rabbit eye; role of prostaglandins*. European Journal of Pharmacology, 194, 217-223
129. Okada, K., Sugiyama, K., Haque, M.S., Taniguchi, T. & Kitazawa, Y. (1995); *The effects of endothelin-1 on intraocular pressure and pupillary diameter in rabbits*. Jpn J Ophthalmol, 39, 233-241

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

AM	Acyetoxymethyl-Ester
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'- Tetraessigsäure
BTM	bovines Trabekelmaschenwerk
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calcium-Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerin
DHA	Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ET	Endothelin
ET-1 (-2, -3)	Endothelin-1, (Endothelin-2, Endothelin-3)
ET <sub>A</sub> -R	Endothelin-Rezeptor-A
ET <sub>B</sub> -R	Endothelin-Rezeptor-B
FP-R	Prostaglandin F- bindender Rezeptors
IOD	Intraokularer Druck
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
MLC	Myosin-Light-Chain (Myosin-Leichtketten)
MLCK	Myosin-Light-Chain-Kinase (Myosin-Leichtketten-Kinase)
MLCP	Myosin-Light-Chain-Phosphatase (Myosin-Leichtketten-Phosphatase)
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
NO	Stickstoffmonoxid
PG	Prostaglandin(e)
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin-F <sub>2α</sub>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PLC	Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
POWG	primäre chronische Offenwinkelglaukom
SEM	standard error of mean

## 7.2. Danksagung

Ich möchte mich hiermit beim gesamten Institut für Klinische Physiologie und Herrn Prof. Dr. med. Michael Fromm für die freundliche, engagierte und kompetente Unterstützung während meiner Dissertation bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn PD Dr. med. Hagen Thieme für die Überlassung des Themas. Durch seine Arbeiten wurden wesentliche Kenntnisse zu dieser Thematik gewonnen, auf die ich bei meiner Dissertationsarbeit zurückgreifen konnte.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. medic. Rita Rosenthal. Sie hat mich in die Forschungsmethoden und das Forschungsgebiet eingewiesen und mich bei der Versuchsplanung und -durchführung sowie der Erstellung dieser Arbeit begleitet. Als sehr engagierte und kompetente Betreuerin hat sie mir über die Jahre immer geduldig und hilfsbereit bei allen Fragen und Problemen zur Seite gestanden.

Frau Marianne Boxberger danke ich für ihre Hilfe bei den Zellkulturen sowie ihre Unterstützung bei der Bereitstellung der verschiedenen chemischen Reagenzien.

Meinem Kollegen Dr. med. Lars Choritz möchte ich für die fachliche und technische Unterstützung während meiner experimentellen Arbeitszeit sowie für die vielen hilfreichen Gespräche danach danken.

Zuletzt gilt ein herzlicher Dank meinen Eltern, die mir mein Medizinstudium ermöglicht und mich während der gesamten Zeit meiner Dissertationsarbeit in vielerlei Hinsicht mit viel Liebe unterstützt haben.

## 7.3. Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit

Es wurden Teile aus dieser Arbeit bereits mit Genehmigung veröffentlicht:

Thieme, H., Schimmat, C., Münzer, G., Boxberger, M., Fromm, M., Pfeiffer, N. et al. (2006); *Endothelin antagonism: effects of FP receptor agonists prostaglandin F2alpha and fluprostenol on trabecular meshwork contractility*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 47, 938-945

#### **7.4. Lebenslauf**

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**



**Erklärung:**

Ich, Galina Thomasowna Münzer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Endothelin-antagonisierende Effekt von Prostaglandin-Analoga am Trabekelmaschenwerk des Auges“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Ort, Datum

Unterschrift