

5. Diskussion

Eine Nachstarentwicklung und ein Glaukom stellen häufige Probleme in der Ophthalmologie dar. Ob die medikamentöse Behandlung mit Antiglaukomatosa einen Einfluss auf die Nachstarentwicklung hat, ist unbekannt. Bekannt hingegen ist, dass $\text{PGF}_{2\alpha}$, ein Analogon von Latanoprost, in vitro einen stimulierenden Effekt auf bovine Hornhautendothelzellen hat [47]. Gerade für Patienten mit einer hohen Myopie, bei denen ein Nachstar meist am ehesten operativ, statt mit Hilfe des Nd:YAG-Lasers therapiert wird, ist eine mögliche stimulierende Wirkung von Augentropfen auf die Nachstarentwicklung von Bedeutung. Antiglaukomatosa werden bei Patienten mit einer hohen Myopie oft eingesetzt, da bei dieser Gruppe von Patienten häufiger ein Glaukom besteht [20, 21].

In dieser Studie wurde mittels in vitro-Versuchen der Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und von Dorzolamid auf die Proliferation von Linsenepithelzellen untersucht. Die Studie besteht aus zwei Versuchsreihen. Zu dieser Arbeit zählt eine Versuchsreihe mit humanen Linsenepithelzellen, wobei der Einfluss von 3 verschiedenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen auf die Linsenepithelzellproliferation untersucht wurde, sowie eine zweite Versuchsreihe mit bovinen Linsenepithelzellen, welche auf die erste Versuchsreihe aufbaute und hier zusätzlich der Einfluss von Dorzolamid auf die Proliferation von Linsenepithelzellen getestet wurde. Primäres Ziel dieser Arbeit war die Auswertung der Unterschiede nach 7 Tagen Kultivierung zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen, welche mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ oder Dorzolamid behandelten wurden.

Bezüglich der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration wurde von der Konzentration von Latanoprost in Xalatan[®] Augentropfen ausgegangen. Diese wurde im Kulturmedium 10-fach, 100-fach und 1000-fach verdünnt, um der in vivo Situation am nächsten zu kommen. Die Penetration von Latanoprost durch die Hornhaut beträgt in vivo 1-2%, die gewählte Konzentration einer 1/100-Verdünnung entspricht demnach der Konzentration im Kammerwasser nach lokaler Applikation von Xalatan[®] Augentropfen in vivo [62]. Nach dem Aussäen und in Kultur bringen von 10.000 Linsenepithelzellen wurde durch Zellzählungen der Einfluss auf die Zellproliferation nach den Tagen 1, 3 und 7 bestimmt.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe mit humanen Linseneithelzellen zeigten in den 3 Gruppen mit verschiedenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen und in der Kontrollgruppe eine sinkende Zellzahl im Zeitverlauf. Hierbei zeigte sich bei den PGF-Gruppen im Verlauf eine niedrigere Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein signifikanter Unterschied konnte bei der geringen Fallzahl nicht nachgewiesen werden. Dieser Zellverlust ist möglicherweise auf die Reduktion des FCS-Anteils von 10% auf 5% im Kulturmedium nach der 2. Passage und somit zu Beginn der Versuchsreihe zurück zu führen. Die Vitalität der humanen Zellen könnte weiterhin eine Ursache für den langsam progredienten Abfall der Zelldichte sein. Eine Vitalfärbung wurde aber bei diesen Versuchen nicht durchgeführt.

In der Versuchsreihe mit bovinen Linseneithelzellen wurde die Anzahl an Kulturen pro Gruppe deutlich erhöht. Neben den 3 Gruppen mit verschiedenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen im Kulturmedium wurden 2 Gruppen mit verschiedenen Konzentrationen von Dorzolamid im Kulturmedium angelegt. Die Konzentrationen der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gruppen waren die gleichen wie die im Versuch mit humanen Linseneithelzellen. Die Konzentrationen in den DA-Gruppen waren 1/100 und 1/1000 im Vergleich zu Trusopt[®] Augentropfen. Die Ergebnisse der Zellzählungen sämtlicher Gruppen zeigten nach 1 Tag einen massiven Zellverlust bis durchschnittlich unter 2000 Zellen pro Kultur. Diese Abnahme der Zelldichte ist möglicherweise durch die Reduktion des FCS-Anteils von 10% auf 5% im Kulturmedium bedingt. In allen Gruppen zeigte sich im weiteren Verlauf eine zunehmende Proliferation mit einer Zunahme der gemessenen Zellzahlen, die nach 7 Tagen durchschnittlich zwischen 3972 (DA-1/100-Gruppe) und 5198 (PGF-1/100-Gruppe) Zellen pro Kultur lagen.

Bei den Versuchen mit bovinen Linseneithelzellen wurden die Zellzählungen pro Zellkultur jeweils 2-fach durchgeführt. Hier zeigte sich eine konstant geringere Zellzahl in der Zellzählung der 2. Gruppe bei allen verschiedenen Gruppen. Für jede Zellzählung wurden die Zellen mittels einer PBS/EDTA/Trypsin-Lösung in Suspension gebracht. Es erfolgten dann die beiden Zellzählungen, wobei die Zellen für die zweite Zählung länger in dieser Lösung verblieben. Demnach ist dieser Unterschied in der Zellzahl möglicherweise auf die Toxizität von Trypsin in der verwendeten Lösung zurück zu führen.

Die Kulturzeit wurde bei den Versuchen mit bovinen Linseneithelzellen bis auf 5 Minuten genau gemessen. Durch optimale Verteilung der Kulturen pro Kulturplatte

wurden nach 3 und 7 Tagen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Kulturzeit festgestellt.

5.1. Einfluss von Dorzolamid auf die Proliferation von Linsenepithelzellen

In den Versuchen mit bovinen Linsenepithelzellen zeigte sich in der 1/100-Konzentration eine signifikante proliferationshemmende Wirkung des Dorzolamids im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ($p=0,0012$). Diese Beobachtung konnte bei einer 1/1000-Konzentration nicht gemacht werden ($p=0,1501$). Dieses Ergebnis bei einer Konzentration von 1/100 ist in sofern interessant, als dass diese Konzentration der bei lokaler Applikation in vivo erreichten intraokularen Konzentration vermutlich am nahesten kommt. Diese Annahme stützt sich auf ein ähnliches Penetrationsverhalten von Latanoprost [62]. Eine antiproliferative Wirkung von Dorzolamid bei Linsenepithelzellen ist nicht überraschend, da eine ähnliche Wirkung auch bei humanen Hornhautepithelzellen gezeigt werden konnte [58]. Versuche mit Dorzolamid in einer 1/10-Konzentration konnten in dieser Arbeit leider nicht durchgeführt werden, da die Menge an zur Verfügung gestelltem Dorzolamid-Hydrochlorid nicht ausreichend war. Eine Erweiterung dieser Studie ist sicherlich sinnvoll, da das Penetrationsverhalten von Dorzolamid durch die Hornhaut bisher nicht untersucht wurde. Möglicherweise ist diese Penetration größer als die Hornhautpenetration von $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Die Beobachtung einer antiproliferativen Wirkung von Dorzolamid zeigt sich auch, wenn die Ergebnisse von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und Dorzolamid direkt statistisch verglichen werden. In der DA-1/100-Gruppe konnte eine signifikant geringere Zellzahl gemessen werden im Vergleich zu der PGF -1/10-Gruppe ($p=0,0079$), der PGF -1/100-Gruppe ($p=0,0003$) und der PGF -1/1000-Gruppe ($p=0,0455$).

Würde man diese in vitro-Ergebnisse in die in vivo-Situation übertragen, könnte daraus eine Reduktion einer Nachstarbildung durch topische Applikation von Dorzolamid resultieren. Ob die Nachstarinzidenz nach einer Kataraktoperation durch topische Applikation von Dorzolamid tatsächlich reduziert wird, müsste durch eine entsprechende klinische Studie gezeigt werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass

das Proliferationsverhalten von in vitro kultivierten Zellen nicht auf die in vivo Situation übertragbar ist.

Der Einfluss von Dorzolamid auf die Zellproliferation von humanen Linseneithelzellen konnte leider in dieser Studie nicht untersucht werden, da zum Zeitpunkt der Versuche mit humanen Linseneithelzellen noch kein Dorzolamid-Hydrochlorid zur Verfügung stand. Auf Grund der interessanten Ergebnisse in den bovinen Zellkulturen ist eine Wiederholung der Versuchsreihe mit humanen Zelllinien erstrebenswert.

5.2. Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Proliferation von Linseneithelzellen

Die auf Grund der Ergebnisse bei bovinen kornealen Endothelzellen angenommene proliferationsfördernde Wirkung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ [47] konnte in dieser Studie an bovinen Linseneithelzellen nicht nachgewiesen werden. Als Ursache hierfür könnte angesehen werden, dass Prostaglandine allgemein in verschiedenen Geweben unterschiedliche, teils proliferative, teils hemmende Wirkungen entfalten und deshalb eine direkte Übertragung der Wirkung eines Prostaglandins ($\text{PGF}_{2\alpha}$) auf verschiedene okuläre Gewebe nicht möglich ist. Eine proliferationsstimulierende Wirkung ist von $\text{PGF}_{2\alpha}$ bekannt [47, 63] jedoch wurde ebenso eine hemmende Wirkung verschiedener Prostaglandine auf verschiedene Zellarten nachgewiesen [64, 65]. Solch eine hemmende Wirkung auf verschiedene Zellarten ist allerdings im Vergleich zu verschiedenen anderen Prostaglandinen bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ meist geringer ausgeprägt (PGA_2 , PGB_2 , PGD_2 , PGE_1 und PGE_2) [66]. In diesem Vergleich zeigt sich, dass $\text{PGF}_{2\alpha}$ eine nur geringe hemmende Wirkung bzw. keinen Einfluss auf die Proliferation hat [67-71].

Eine weitere Rolle in der Interpretation unserer Ergebnisse könnten die Kultivierungsbedingungen spielen. In einer Arbeit von Conconi et al. wird beschrieben, dass $\text{PGF}_{2\alpha}$ eine antiproliferative Wirkung auf bovine Hornhautepithelzellen hat. In Cokultivierung mit Keratozyten wird allerdings eine wachstumsstimulierende Wirkung auf die Hornhautepithelzellen erreicht. Die Autoren nehmen an, dass $\text{PGF}_{2\alpha}$ über die Keratozyten eine entgegengesetzte Wirkung auf das Proliferationsverhalten ausübt [72]. Genaueres zu den molekularen Mechanismen dieses Zusammenhangs ist nicht beschrieben. Möglicherweise werden in unserem Zellkulturmodell ähnliche, nicht bekannte Cofaktoren in der Wirkung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ nicht ausreichend berücksichtigt. Dass

das Wirkungsspektrum von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf verschiedene Gewebearten unterschiedlich ist, wurde durch diese Studie ergänzend nachgewiesen: es besteht kein direkter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf das Wachstumsverhalten boviner Linseneithelzellen.

In den Versuchen, in denen der Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf das Proliferationsverhalten von humanen Linseneithelzellen getestet wurde, konnte wie bei den bovinen Linseneithelzellen kein signifikanter Einfluss gezeigt werden, ebenso wie auch bei den Versuchen mit bovinen Linseneithelzellen. Obwohl sich eine hemmende Tendenz von $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte, ist bei der geringen Anzahl von Kulturen ($n=4$ bis 6) keine sichere Aussage möglich. Eine Wiederholung der Versuche mit einer höheren Anzahl an Kulturen ist notwendig, um eine mögliche Tendenz auswerten zu können.

5.3. Klinische Auswirkungen

Auf Grund der Ergebnisse dieser Studie dürften sowohl Dorzolamid als auch $\text{PGF}_{2\alpha}$ keine Förderung des regenerativen Nachstars bedingen. In vitro zeigte sich von beiden Substanzen keine proliferationsstimulierende Wirkung auf Linseneithelzellen. Dorzolamid in einer 1/100-Konzentration zeigte eine wachstumshemmende Wirkung. Bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ war eher eine Tendenz zur Hemmung der Proliferation zu erkennen. Die 1/100-Konzentration entspricht vermutlich am ehesten der Konzentration in der Vorderkammer nach topischer Applikation.

Eine klinische Studie wäre notwendig, um eine antiproliferative Wirkung von Dorzolamid und $\text{PGF}_{2\alpha}$ in antiglaukomatösen Augentropfen auf Linseneithelzellen in vivo zu untersuchen. Da die Kulturbedingungen nicht der in vivo-Situation entsprechen und keine weitere Substanzen in den Handelspräparaten (Xalatan[®] und Trusopt[®] Augentropfen) in dieser in vitro-Studie berücksichtigt wurden, ist eine Übertragung auf die in vivo-Situation nicht ohne weiteres möglich.

5.4. Fazit

- Unter Inkubation mit Dorzolamid zeigte sich eine signifikante Hemmung der Proliferation boviner Linseneithelzellen.
- Es konnte kein direkter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf das Wachstumsverhalten von humanen und bovinen Linseneithelzellen gezeigt werden.