

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

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

Kapitel 6. Zusammenfassung und Ergebnis

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

Vernarbungsreaktion führen. Es wurden daher neben normalen Fibroblastenkulturen auch solche aus Operations-Risikogruppen angelegt, um die Frage zu klären, ob vorstimulierte Tenonfibroblastenpopulationen existieren und wie sie ggf. auf die verwendeten Medikamente reagieren.

Migrationsassay: Tenonfibroblasten wurden im Transwell Assay System in der oberen Kammer ausgesät. In die untere Kammer wurden Serum und das zu untersuchende Medikament (Genistein, Suramin, 5-FU) für eine Inkubationszeit von 16h gegeben. Nach Fixierung und Anfärbung der gewanderten Zellen erfolgte die Auswertung durch Auszählung der gewanderten Zellen mit dem Lichtmikroskop

Proliferationsassay: 24 h nach Aussaat einer definierten Zellzahl wurden die zu untersuchenden Substanzen für 3 Tage zu den Zellen gegeben. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der Zellen und endete nach 28 Tagen.

*Fibronektinexpression:*Die Überstände der behandelten Zellen wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen gesammelt und ihr Fibronektin Gehalt ausgewertet

Transformationsverhalten in der Immunzytochemie: Tenonfibroblasten wurden auf beschichteten Objektträgern ausgesät und mit 2ng/ml TGFβ-1 supplementiertem Serum und dem jeweiligen Medikament in Myofibroblasten umgewandelt. Die Bestimmung der Transformationsrate erfolgte anhand der Auswertung einer doppelten Fluoreszenzfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Ergebnisse: Alle verwendeten Medikamente waren in der Lage, die Migration von Tenonfibroblasten sowie die Transformation in Myofibroblasten um etwa 50% zu inhibieren. Die Proliferation wurde durch Suramin erst an den letzten beiden Untersuchungstagen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gehemmt. Dagegen lagen die Proliferationswerte von Genistein und 5-FU zu allen Untersuchungszeitpunkten im Bereich des Ausgangswertes. Die Zellmorphologie war in der mit 5-FU behandelten Gruppe im Vergleich zu Genistein, Suramin und der Kontrollgruppe verändert. Alle untersuchten Medikamente unterdrückten die Fibronektinexpression der Tenonfibroblasten um ca. 50% im Vergleich zur

Kontrollgruppe. 5-FU unterdrückte die Fibronectinexpression ab Tag 15 signifikant besser als Genistein oder Suramin.

Unterschiede zwischen aktivierten und nicht-aktiviert Tenonfibroblastenpopulationen konnten mit statistischer Signifikanz lediglich in der Fibronectinexpression festgestellt werden. Diese Unterschiede wurden durch die medikamentöse Behandlung, unabhängig davon mit welchem Medikament sie erfolgte, unterdrückt.

Zusammenfassend hemmen sowohl Genistein als auch Suramin die einzelnen Funktionen des Tenonfibroblasten signifikant. Diese Hemmung erstreckt sich über einen mindestens vier Wochen dauernden Zeitraum. Genistein hat dabei in einzelnen Zellfunktionen zeitweise eine stärkere Wirkung als das etablierte 5-FU und ist in seiner Wirkung mit 5-FU vergleichbar. Suramin hatte einen schwächeren Effekt auf die Fibroblastenfunktionen als 5-FU.

Kapitel 7: Bibliographie

1. **Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y.** (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* **262**, 5592-5.
2. **Akman A., Bilezikci B., Kucukerdonmez C., Demirhan B., Aydin P.** (2003) Suramin modulates wound healing of rabbit conjunctiva after trabeculectomy: comparison with mitomycin C. *Curr Eye Res.* **26**, 37-43.
3. **Atreides S.P., Skuta G.L., Reynolds A.C.** (2004) Wound healing modulation in glaucoma filtering surgery. *Int. Ophthalmol. Clin.* **44**, 61-106.
4. **Azuma Y., Onishi Y., Sato Y., Kizaki H.** (1995) Effects of protein tyrosine kinase inhibitors with different modes of action on topoisomerase activity and death of IL-2-dependent CTLL-2 cells. *J Biochem* **118**, 312-8.
5. **Bastian S.E., Dunbar A.J., Priebe I.K., Owens P.C., Goddard C.** (2001) Measurement of betacellulin levels in bovine serum, colostrum and milk. *J Endocrinol.* **168**, 203-12.