

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Verwendete Materialien

##### 3.1.1. Verwendete Geräte

Clean Air CBC 6E LaminafLOW	Thermo Life Science, Egelsbach, Deutschland
Brutschrank BB16 Function Line	Hereaus Instruments, Hanau, Deutschland
Casy <sup>®</sup> 1 TTC Cell Counter	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Unimax 1010 Schüttelgerät	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Tuttnauer/Systemec 2540 EL Electronic Table-top Autoklav	Tuttnauer Europe b. v., Breda, Niederlande und Systemec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Inverser Lichtmikroskop 'Sedival'	Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland
Nikon E995 Digitalkamera mit Okular-Adapter	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Liebherr Premium Kühlschrank	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Privileg de luxe Gefrierschrank	Privileg, Fürth, Deutschland

##### 3.1.2. Verwendete Labormaterialien

Falcon <sup>®</sup> Multiwell <sup>™</sup> Kulturplatten	Becton Dickinson Labware Europe, Becton Dickinson France S. A., Le Pont de Claix, Frankreich
Falcon <sup>®</sup> Zellkulturflaschen 250 ml Blue Plug Seal Cap	

	Becton Dickinson Labware Europe, Becton Dickinson France S. A., Le Pont de Claix, Frankreich
Falcon® Blue Max™ 14 und 50 ml Polypropylene Conical Tubes	Becton Dickinson Labware Europe, Becton Dickinson France S. A., Le Pont de Claix, Frankreich
Safe-lock-tubes 0,5 und 2,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einweg Pipettenspitzen 20, 200 und 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf 1000 µl Pipet	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gilson P200 200 µl Pipet	Gilson, Middleton, Wisconsin , USA
Eppendorf 20 µl Pipet	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon® 1 ml Serological Pipet	Becton Dickinson Labware Europe, Becton Dickinson France S. A., Le Pont de Claix, Frankreich
Einweg Transfer-Pipette 3,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Costar® Stripette 5 und 10 ml Pipette	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Sterilin short 10 ml Pipette	Bibby Sterilin Ltd., Stone, UK
Falcon® Spacesaver™ 25 ml Serological Pipet	Becton Dickinson Labware Europe, Becton Dickinson France S. A., Le Pont de Claix, Frankreich
Costar® Cell-scraper	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Einweg-Filter 5 µm	Hergestellt für NeXstar Pharmaceuticals Incorporated, San Dimas, California, USA

### 3.1.3. Verwendete Medien und Zusatzsubstanzen

Gibco® Invitrogen™ DMEM	Invitrogen Corporation, Paisley, UK
Fetales bovines Kälberserum 500 ml	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Trypsin 0,5%/EDTA0,2% (10x)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Gibco® Invitrogen™ Gentamycin 50 mg/ml	

	Invitrogen Corporation, Paisley, UK
L-Glutamin 200 mM (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/10.000 µg/ml	
	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
HEPES Dry Substance	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Casy <sup>®</sup> ton Isotone Salzlösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Casy <sup>®</sup> clean Capillar- und Systemreiniger	
	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Casy <sup>®</sup> cups Messgefäße	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

### 3.1.4. Verwendete Testsubstanzen

Dorzolamid Hydrochlorid Trockensubstanz

Merck & Co. Incorporated, Research  
Laboratories, Rahway, New Jersey, USA,  
hergestellt für MSD Sharp & Dohme GmbH,  
Haar, Deutschland

Prostaglandin F<sub>2α</sub> tris salt

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,  
Deutschland

### 3.1.5. Verwendete Software

Acrobat<sup>®</sup> 7.0.0 Professional

Adobe Systems Incorporated, San Jose,  
California, USA

Casy<sup>®</sup> stat Analyse System, Version 4.0

Schärfe System GmbH, Reutlingen,  
Deutschland

EndNote 5.0.2

ISI ResearchSoft, Berkeley, California, USA

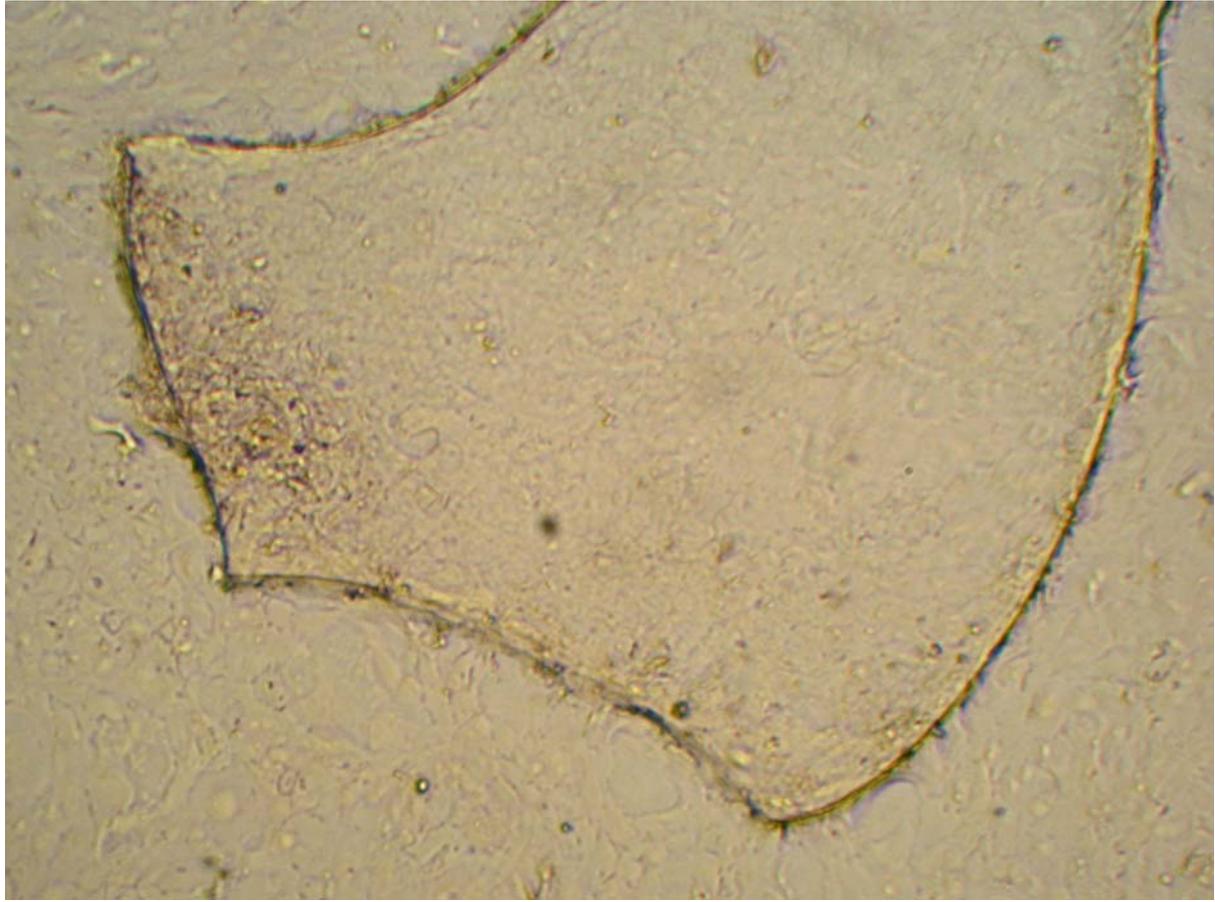
Excel 2002	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Firefox™ 2.0.0.3	Mozilla Foundation, Mountain View, California, USA
Photoshop® 7.0.1	Adobe Systems Incorporated, San Jose, California, USA
Prism® 3.03 for Windows	GraphPad Software Incorporated, San Diego, California, USA
SPSS® 12.0 for Windows	SPSS Incorporated, Chicago, Washington, USA
Van Dale pocketwoordenboeken NL/D en D/NL, Version 1.01	Van Dale Lexicografie b. v., Antwerpen/Utrecht, Belgien/Niederlande und C-Content bv, Den Bosch, Niederlande
Windows 3.11	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Windows Millenium Edition 4.90.3000	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Windows XP Home Edition Version 5.1.2600, Service Pack 2, Build 2600	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Word 2002	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

## **3.2. Etablierung humaner und boviner Epithelzellkulturen**

### **3.2.1. Probengewinnung humaner Linsenepithelzellen**

Die Vorderkapsel wurde bei Kataraktoperationen in klassischer Weise nach Kapsulorhexis asserviert. Die eingeschlossenen Kapselteile stammen von Patienten, die wegen einer Sehverschlechterung, welche ausschließlich durch eine senile Katarakt verursacht wurde, mittels eines Standardverfahren operiert wurden. Voraussetzung für den Einschluß in die Studie war, daß die Patienten keine weiteren ophthalmologischen

Erkrankungen hatten. Zum Transport in das Labor wurden die Kapselteile in einen sterilen 2,5 ml verschließbaren Behälter mit 2 ml Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum) gegeben. Die Linsenkapselfragmente mit den Linsenepithelzellen wurden kultiviert und nach der Proliferation wurden die Kapselteile aus der Kultur entfernt. Die Linsenepithelzellen, welche proliferierten, wurden für die Experimente weiter kultiviert.



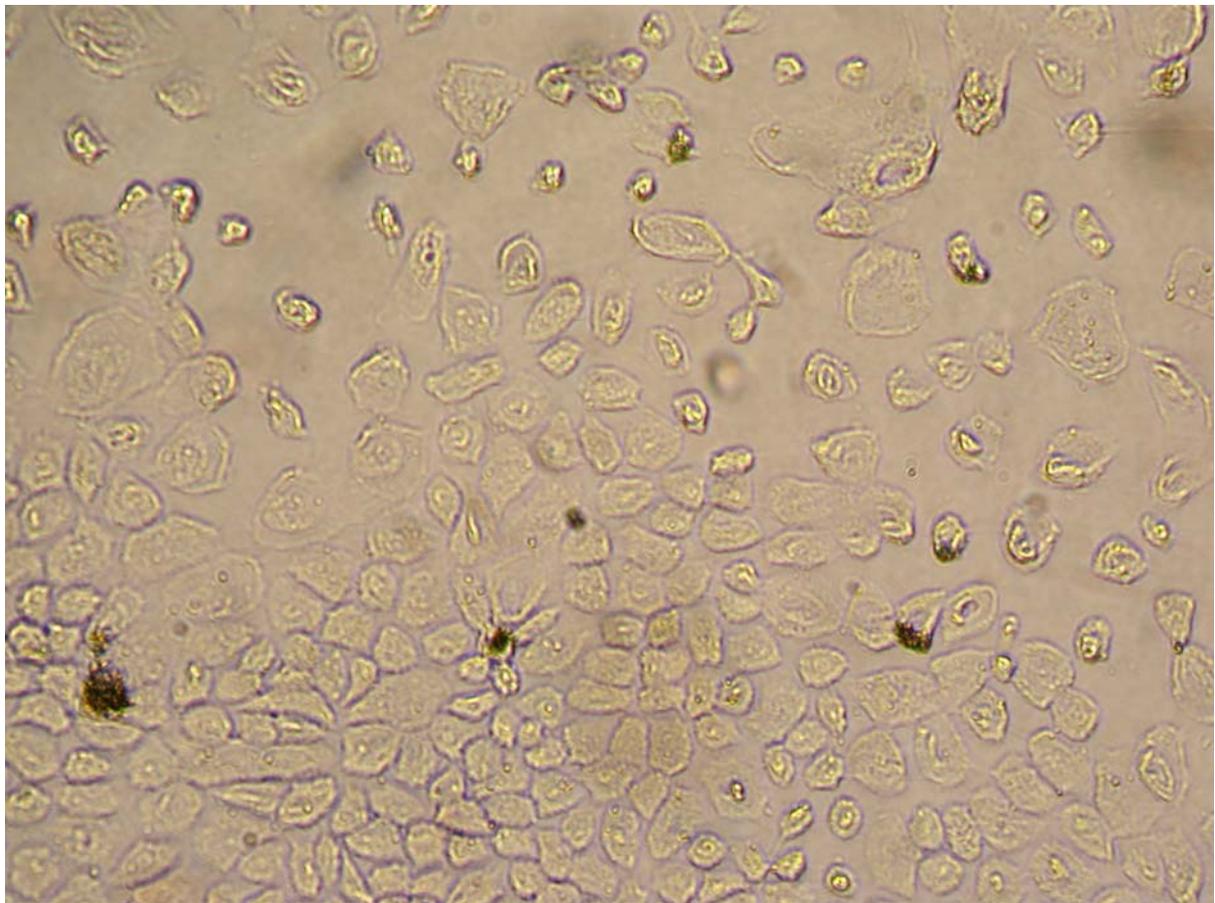
**Abb. 3.1** Lichtmikroskopische Aufnahme von einem Zellrasen mit einem Teil der Linsenkapselfragmente (bovine Linsenepithelzellen, 20-fache Vergrößerung).

### **3.2.2. Probengewinnung boviner Linsenepithelzellen**

Bovine Bulbi wurden präpariert und die Linsenkapselfragmente entnommen. Die Linsenkapselfragmente mit den Linsenepithelzellen wurden hiernach in einer Kultur angelegt. Nach Proliferation der Zellen wurden die Kapselreste aus der Kultur entfernt. Die Linsenepithelzellkulturen, welche eine Proliferation zeigten, wurden für die Experimente weiter kultiviert.

### 3.2.3. Etablierung der Zellkulturen

Durch Einbringen des gewonnenen Materials (humane und bovine Linsene­pithelzellen) in 2 ml des Standard-Zellkulturmedium (DMEM, supplementiert mit 10% FCS) wurden primäre Zellkulturen angelegt. Hierfür wurden spezielle Zellkulturschalen mit unterschiedlich starken Kulturwells und beschichtetem Boden verwendet. Die Kulturen wurden bis zur Konfluenz in diesen Zellkulturplatten bei 32°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank gelagert.



**Abb. 3.2** Lichtmikroskopische Aufnahme während einer Passage von bovinen Linsene­pithelzellen. Beim Abtrypsinieren werden die Zellbegrenzungen deutlich sichtbar und die Zellen werden runder (50-fache Vergrößerung).

### **3.2.4. Zellpassage**

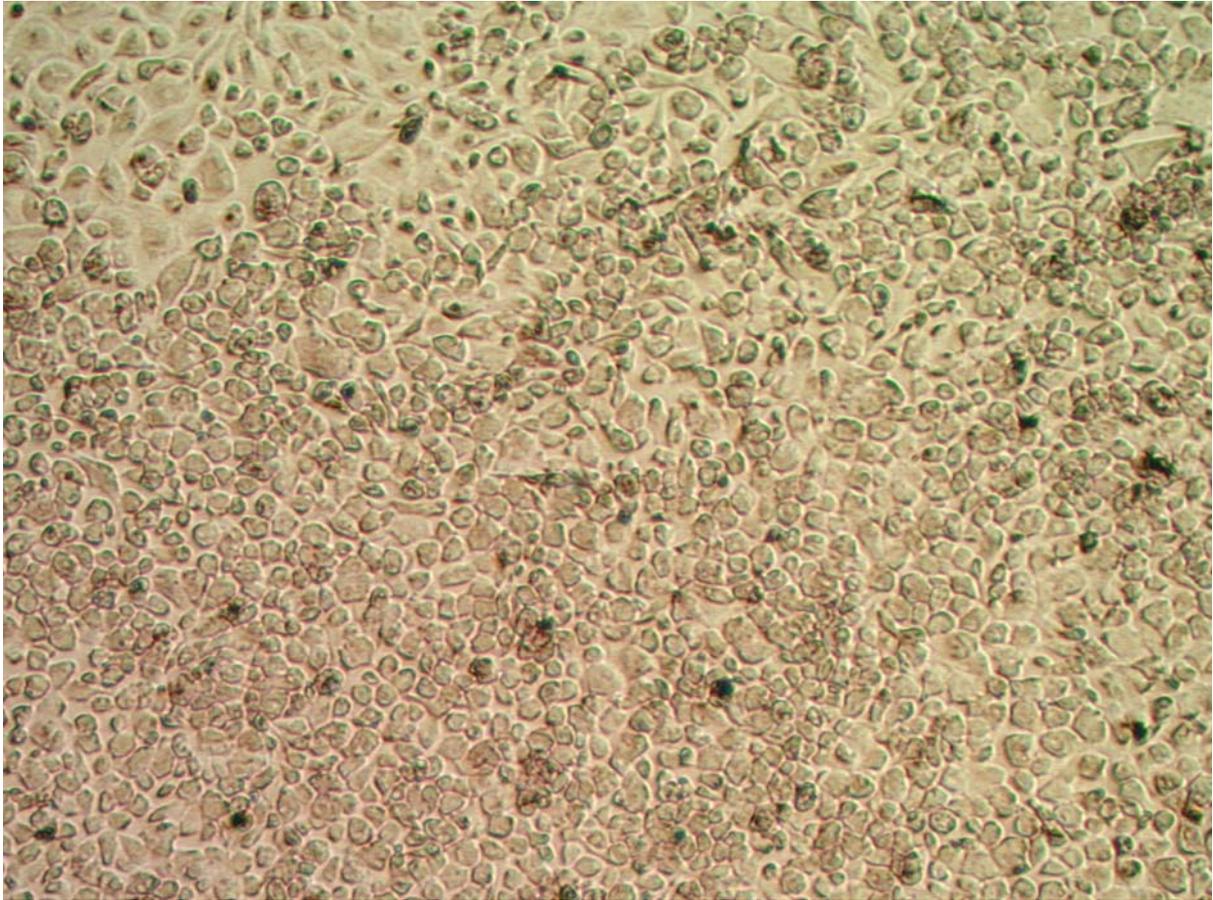
Bei einer Passage werden die kultivierten adhärenenten Zellen mittels Trypsin von der Unterlage und voneinander gelöst und in eine neue Zellkultur ausgesät. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden die Linsenepithelzellkulturen insgesamt zweimal passagiert und am Ende des Experiments (nach 1, 3 oder 7 Tagen) zum 3. Mal suspendiert.

Bei der 1. und 2. Passage wurde zunächst das Medium mit einer Pipette entfernt und die Zellen mit ca. 1 ml PBS-Lösung gewaschen. Danach erfolgte ein erneutes Waschen mit ca. 1 ml PBS/EDTA(0,02%)-Lösung. Bei diesen Spülungen wird das restliche Medium entfernt. Danach wurde bis ca. 1 ml 10-fach verdünnte PBS/EDTA(0,2%)/Trypsin(0,5%)-Lösung auf die Zellen gegeben; mit einer Einwirkzeit von maximal 7 Minuten und unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Bei dieser Behandlung lösen sich die Linsenepithelzellen vom Boden der Kulturwells und es entsteht eine Suspension. Das Lösen der Zellen wird beim Passagieren durch sanftes Klopfen und leichtes Schütteln der Kulturschale oder durch vorsichtiges Abreiben der Zellen vom Boden der Wells mittels eines speziell zu diesem Zweck entwickelten Cell-scrapers unterstützt. Die gelösten Zellen in der PBS/EDTA(0,2%)/Trypsin(0,5%)-Lösung werden in ca. 10 ml Medium mit 10% FCS suspendiert und für 10 Minuten bei 1000 U/Min und 15°C zentrifugiert. Die Zellen befinden sich jetzt auf dem Boden des Gefäßes und der Überstand an Medium wird verworfen. Die Zellen werden in 1 ml Medium mit der Pipette suspendiert und erneut ausgesät. Das Medium wird bis 2 ml/Well dazu gegeben und nach einer optischen Kontrolle am inversen Lichtmikroskop werden die Zellen im Brutschrank bei 32°C und 5% CO<sub>2</sub> weiter kultiviert.

### **3.2.5. Kulturmedium**

Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen FCS verwendet. Supplementiert wurde das Medium mit HEPES und L-Glutamin. Zur bakteriellen Infektionsprophylaxe wurden Penicillin, Streptomycin und Gentamycin hinzugefügt. Die genaue Zusammensetzung des verwendeten

Kulturmediums ist in Tabelle 3.1 aufgelistet. Gegen die Testsubstanzen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und Dorzolamid wurde ein für die Versuchsreihen fertig zubereitetes Medium für die verschiedenen Zielkonzentrationen entsprechend ausgetauscht.



**Abb. 3.3** Lichtmikroskopische Aufnahme von einem konfluenten Zellrasen (bovine Linseneithelzellen, 20-fache Vergrößerung).

**Tabelle 3.1** Zusammenstellung der verwendeten Kulturmedien (100 ml) mit 10%, 5% bzw. 2% fetalem Kälberserum

Substanz	10% FCS	5% FCS	2% FCS
HEPES	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
L-Glutamin (200 mM)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Penicillin/Streptomycin (10.000 U / 10.000 µg/ml)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Gentamycin (50 mg/ml)	100 µl	100 µl	100 µl
DMEM	85,4 ml	90,4 ml	93,4 ml
FCS	10 ml	5 ml	2 ml

### 3.2.5.1. Fetales Kälberserum

Ein Zusatz von Seren an Zellkulturmedien bedeutet ein Zusatz von unbekanntem Komponenten wie Hormonen, Bindungsproteinen, Aminosäuren, anorganischen Salzen, Spurenelementen sowie Puffer- ( $\text{NaHCO}_3$ ) und Neutralisationssystemen (u. a. Albumin, Immunglobuline), welche eine unbekannte Wirkung auf das Proliferationsverhalten von Linsenepithelzellen haben. Ein serumfreies Medium ist deshalb grundsätzlich vorteilhaft. Bei den meisten Zelllinien zeigt sich aber einige Zeit nach der primären Adaptation an serumfreie Medien eine Stagnierung in der Proliferation. Dieses Verhalten ist je nach Zelllinie unterschiedlich und die genauen Gründe für dieses Phänomen sind nicht bekannt [59].

In dieser Arbeit wurde deshalb soweit wie möglich der unbekannte Einfluss von Serum verringert. Daher wurde eine Versuchsreihe mit bovinen Linsenepithelzellen im Vorfeld durchgeführt, in der das Wachstumsverhalten in Kulturmedien mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen beobachtet wurde. Auf Grund der Ergebnisse dieser Testkultur, welche hier nicht näher ausgeführt werden sollen, wurden die FCS-Konzentrationen der eigentlichen Versuche festgelegt.

Bei den primären Kulturen wurde das Medium mit 10% FCS versetzt. Nach der 2. Passage und Beginn der Proliferationsversuche wurde die Konzentration auf 5% FCS reduziert und bei den Versuchen mit bovinen Linsenepithelzellen nach einem Tag durch einen Mediumwechsel weiter auf 2% reduziert. Ein serumfreies Medium mit nur biochemisch definierten Zusätzen wurde in dieser Arbeit nicht verwendet.

Für die Versuche in dieser Studie wurde als Serumsupplement das fetale Kälberserum gewählt. Dieses Serum wird aus Blut von Rinderfeten zwischen dem 3. und ca. 7. Trächtigkeitsmonat nach der Schlachtung gewonnen und nach der Gerinnung zentrifugiert. Durch diese natürliche Gerinnungsweise werden Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten in das Serum abgegeben. Dies ist die einzige Einflussmöglichkeit vom Hersteller auf die Inhaltsstoffe im Serum. Der Anteil an Fruktose im Serum von fetalen Kälbern ist im Vergleich zum Serum von neugeborenen Kälbern auffallend hoch. Ein weiterer Aspekt ist, dass im fetalen Kälberserum im Vergleich zu allen anderen Seren relativ wenige Komponenten des Komplements aktiv sind oder fehlen. Dieses geht mit einer Abnahme wachstumsfördernder Eigenschaften einher [59].

### 3.2.5.2. HEPES

Der pK-Wert des Puffers HEPES liegt mit 7,31 sehr nah am physiologischen pH-Wert in einer Zellkultur (6,8-7,2). Bei schnell wachsenden Kulturen mit starker Ansäuerung ist deswegen speziell in diesem pH-Bereich HEPES als Puffer etabliert [59].

### 3.2.5.3. L-Glutamin

Glutamin ist bekannt als wichtigste wachstumsbegrenzende Aminosäure und wird daher supplementiert [60]. Die empfohlene Menge an hinzu zuzufügendem L-Glutamin (200 mM) ist pro Medium unterschiedlich. In dieser Studie wurde eine Supplementierung von 10,0 mg/L gewählt, was einer Endkonzentration von 292,3 mg/L entspricht. Glutamin wird für den Stoffwechsel benötigt und wird enzymatisch durch Glutaminase zu Glutaminsäure und Ammoniak verstoffwechselt. Nichtenzymatisch wird Glutamin zu Pyrrolidon-Carbonsäure und Ammoniak abgebaut. Dieser Metabolismus ist maximal bei einer Temperatur von 37°C, welche auch im Brutschrank zu generieren ist. Aus diesem Grund sind regelmäßige Medienwechsel notwendig [59].

### 3.2.5.4. PGF<sub>2α</sub>

Da der Wirkstoff Latanoprost nicht kommerziell erhältlich ist, wurden die Experimente mit PGF<sub>2α</sub> durchgeführt. Die Konzentration von Latanoprost in Xalatan® Augentropfen beträgt 0,005%, was 0,05 mg/ml PGF<sub>2α</sub> entspricht. Ein Wirkstoff in Augentropfen, wie Latanoprost in Xalatan® Augentropfen, muss die Hornhaut penetrieren, um seine Wirkung im Augeninneren entfalten zu können. Ist die Fähigkeit eines Wirkstoffs nur gering, das Hornhautgewebe zu durchdringen, so kann ein Transportmolekül, ein sog. 'Carrier', genutzt werden, um die Penetration zu verbessern. Eine solche Carrierfunktion hat z. B. Cyclodextrin [61]. Die Permeabilität der Hornhaut ist bei lipophilen Molekülen, wie Latanoprost, geringer. Die Konzentration von Latanoprost in der Vorderkammer ist ca. 2,5 Stunden nach Applikation der Augentropfen maximal mit 1-2% [62]. Das bedeutet, dass die Konzentration von Latanoprost in der Vorderkammer nach 2,5 Stunden ca. 1/100 der Konzentration in Xalatan® Augentropfen entspricht.

Deshalb wurden die Versuche mit einer 10-, 100- und 1000-fachen Verdünnungskonzentration in den verwendeten Kulturmedien durchgeführt, um der in vivo Situation am nächsten zu kommen. Diese Verdünnung entspricht einer Hornhautpenetration von 10, 1 und 0,1%. Bekannt ist auch, dass nach topischer Applikation von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  die Hornhaut als Depot für  $\text{PGF}_{2\alpha}$  wirkt und sich dadurch die Penetration und die Halbwertszeit verringert [48].

### **3.2.5.5. Dorzolamid**

Die Konzentration von Dorzolamid in Trusopt® Augentropfen beträgt 2% und entspricht damit 20 mg/ml Dorzolamid bzw. 22,26 mg/ml Dorzolamid-Hydrochlorid. Auch hier wird davon ausgegangen, dass bei topischer Applikation von Trusopt® Augentropfen die intraokular wirksame Menge Dorzolamid deutlich geringer ist. Demnach wurden zwei verschiedene Konzentrationen Dorzolamid im Medium bei den Versuchen verwendet: 1/100 und 1/1000. Für diese Versuchsreihen konnten leider keine Zellkulturen in einem Medium mit einer 1/10-Konzentration angelegt werden, da die gelieferte Menge an Dorzolamid-Hydrochlorid hierfür nicht ausreichend war.

### **3.2.6. Proliferationsbestimmung**

Das Proliferationsverhalten wurde mittels Zelldichtebestimmung vor und nach der entsprechenden Versuchsreihe untersucht. Hierzu wurden die Zellkulturen wie bei einer Passage abtrypsiniert und eine semiautomatische Zellzählung mit einem CASY® 1 Cell Counter durchgeführt. Bei allen Zählungen wurde jeder Ansatz in 2 Proben geteilt, aus denen die Zelldichte bestimmt wurde.

#### **3.2.6.1. Ablauf der Zellzählung**

In dieser Studie zur Bestimmung der Zellproliferation spielt die Zellzählung eine zentrale Rolle. Zu Beginn des Experiments wird mittels Zellzählung die Anzahl an Zellen bestimmt, damit pro Kulturwell 10.000 einzelne Zellen kultiviert werden können. Nach 1, 3 und 7 Tagen wird dann eine erneute Zellzählung zur Proliferationsbestimmung durchgeführt.

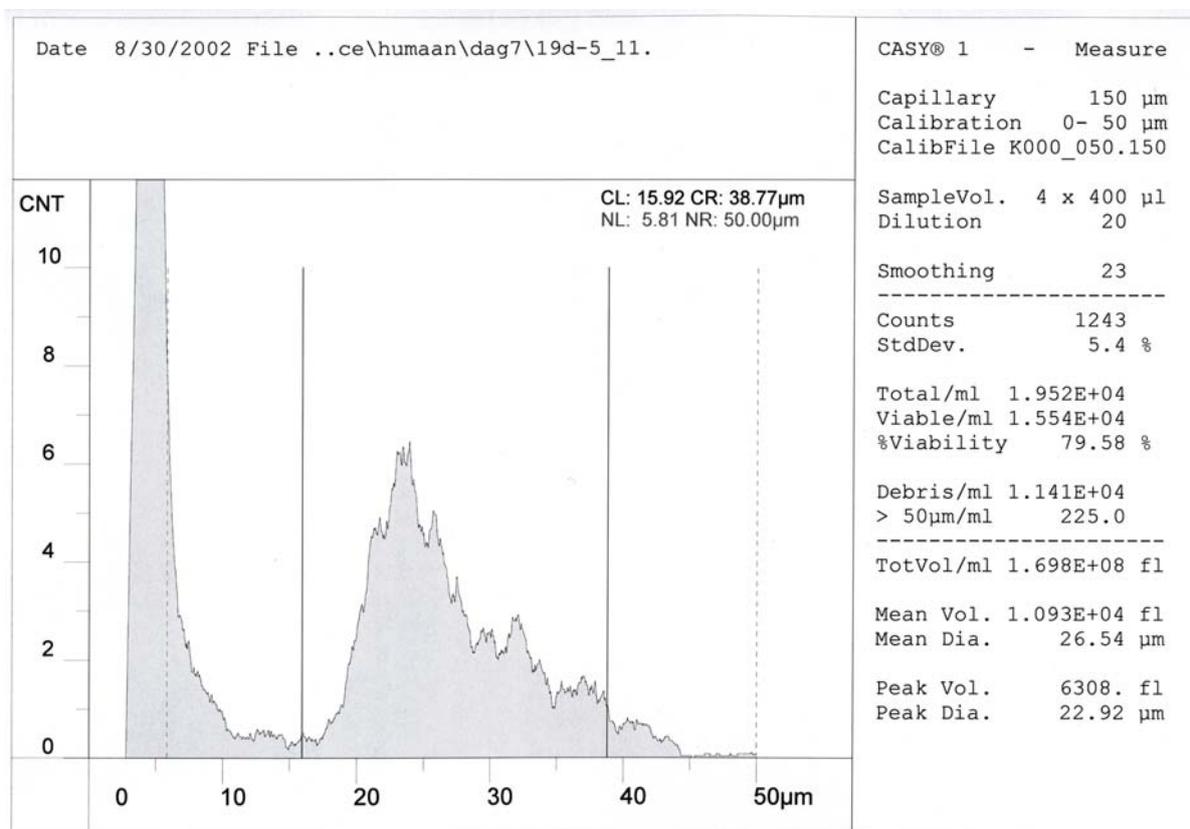
Zur Aussaat von 10.000 Zellen werden die Zellen wie bei einer Passage in ca. 10 ml suspendiert. Von dieser Suspension werden 4 ml pipettiert und in einem Casy<sup>®</sup> cup verschließbaren Probenbecher mit Casy<sup>®</sup> ton isotoner Salzlösung bis 10 ml weiter verdünnt. Aus diesem Probenbecher werden vom CASY<sup>®</sup> 1 Cell Counter 4 mal 400 µl in eine Messkapillare eingesaugt und die Anzahl an vitalen Zellen in diesen jeweils 400 µl bestimmt. Nach 4 Messungen wird ein Mittelwert berechnet, wobei die Zellzahl pro ml in der eigentlichen Zellsuspension zurück zu rechnen ist. Aus dieser Suspension werden genau 10.000 Zellen pipettiert und ausgesät. Pro Well wird Medium dazu gegeben, bis genau 2 ml Medium die Zellen bedeckt. Zu den Dorzolamid- oder PGF<sub>2α</sub>-Kulturen wird eine genau berechnete Menge an Testsubstanz hinzugefügt, damit die Zielkonzentrationen erreicht werden und ebenfalls genau 2 ml Medium die Zellen bedecken.

Nach 1, 3 oder 7 Tagen erfolgt erneut eine Zellzählung nach dem gleichen Prinzip. Die Zellzahl wird aus jedem Well zweimal bestimmt und der Mittelwert berechnet. Diese Gruppen wurden als Gruppe 1 (erste Zellzählungen) bzw. als Gruppe 2 (zweite Zellzählungen) bezeichnet. Das Abtrypsinieren erfolgt mit genau 1 ml PBS/EDTA(0,2%)/Trypsin(0,5%)-Lösung. Nach der Einwirkzeit (bis zu 7 Minuten) werden 500 µl Suspension pipettiert und in 9,5 ml Medium suspendiert (Gruppe 1-Messungen). Dann werden aus der PBS/EDTA(0,2%)/Trypsin(0,5%)-Suspension 400 µl pipettiert und in 9,6 ml Medium suspendiert (Gruppe 2-Messungen). Aus den beiden Suspensionen wird dann mit dem CASY<sup>®</sup> 1 Cell Counter nach weiterer Verdünnung mit CASY<sup>®</sup> ton eine Zellzählung durchgeführt. Anhand der beiden Mittelwerte (Gruppe 1 und Gruppe 2) wird nun die ursprüngliche Zellzahl berechnet.

### **3.2.6.2. Prinzip der Zelldichtebestimmung mit dem CASY<sup>®</sup> 1-Zellzähler**

Der CASY<sup>®</sup> 1 Cell Counter ist ein elektronischer Zellzähler, welcher nach dem Widerstandsmessprinzip arbeitet. Bei jeder Messung werden aus dem Probenbecher mit isotoner Elektrolytlösungs-Suspension (Zellsuspension in CASY<sup>®</sup> ton) 400 µl in eine Kapillare eingesaugt. Diese Messkapillare hat einen Innendurchmesser von 150 µm. Über zwei Platinelektroden ist eine elektrische Spannung angelegt und sobald eine Zelle in die Messkapillare eindringt, entsteht durch eine Änderung des elektrischen Widerstands ein elektrischer Puls. Diese Widerstandsänderung kann entstehen, da eine

Zelle wie ein Isolator in einer Säule mit Elektrolytlösung wirkt. Diese Säule wird durch die Messkapillare begrenzt und stellt einen definierten Widerstand dar. Werden mehrere



**Abb. 3.4** Screenshot von einem Beispiel im Casy® 1 Measure Modus. Die Grafik zeigt die Anzahl gemessener Partikel in 400 µl (Y-Achse) mit einer Größe bis 50 µm (X-Achse); die Anzahl als vitale Zellen gewerteter Partikel befinden sich alle zwischen den definierten Begrenzungen (hier angegeben von 15,92 bis 38,77 µm) und haben in diesem Beispiel einen Gipfel bei ca. 23 µm. Nach 4 Messungen werden u. a. ein Mittelwert und eine Standardabweichung angegeben.

Zellen in die Messkapillare eingesaugt, so entstehen entsprechend mehrere Pulse. Die Anzahl der Pulse stellt dann die Zellzahl in der Probe dar. Der CASY® 1 Cell Counter kann auch die Größe der Pulse unterscheiden und somit eine Größenverteilung darstellen. Die größeren Pulse stellen die vitalen Zellen dar, die kleineren Pulse Zelldebris oder tote Zellen. Avitale Zellen verursachen einen kleineren Puls, da ihre Zellmembran durchgängig ist. Es wird bei diesem Verfahren nur der Zellkern als Puls gewertet [59]. In der Auswertung durch den CASY® 1 Cell Counter hat Zelldebris eine Größe bis ca. 10 µm und avitale Zellen bis ca. 15 µm. Vitale Zellen befinden sich

ungefähr im Bereich zwischen 15 und 40 µm. Vor jedem Experiment sollte einmal eine Kalibrierung durchgeführt werden, sowie vor jeder Messung zur Kontrolle eine Spülung mit reiner Elektrolytlösung. Nach jedem Experiment sollte die Messkapillare mit CASY® clean Reinigungslösung gereinigt werden.

---

CASY® 1	- Measure	File	c:\maurice\humaan\dag7\19d5-42.		
Date	8/30/2002	Time	14:12: 5		
CalibFile	K000_050.150	Scale	0- 50 µm	Aperture	150 µm
Smoothing	3	Cursor Left	16.85 µm	Cursor Right	36.87 µm
		NCurs. Left	5.81 µm	NCurs. Right	50.00 µm

---

Repeats	4	Repeat 1	112	Mean Vol.	9660. fl
Sample Vol.	400 µl	Repeat 2	126	Mean Dia.	25.59 µm
Dilution	20	Repeat 3	120	Med. Vol.	1.106E+04 fl
		Repeat 4	111	Med. Dia.	24.98 µm
		Repeat 5	0		
		Repeat 6	0	Peak Vol.	6308. fl
Total/ml	1.475E+04	Mean Counts	117	Peak Dia.	22.92 µm
Viable/ml	5888.	StdDev.	5.82 %		
%Viability	39.92 %	Sum Counts	471	TotVol/ml	5.687E+07 fl
Debris/ml	3.835E+04 fl				
> 50/ml	112.5				

---

**Abb. 3.5** Screenshot eines Beispiels im Casy® 1 Statistic Modus. In der linken Spalte sind u. a. die Anzahl der Messungen, das Volumen der einzelnen Messung und der Verdünnungsfaktor angegeben. In der mittleren Spalte sind die Werte der einzelnen Messungen, der Mittelwert, die Standardabweichung und die summierte Messzahl zu sehen. Rechts wird u. a. die Partikelgröße mit Mittelwert gezeigt und das Verhältnis zum Messvolumen.

### 3.3. Aufbau der Versuche mit humanen Linsenepithelzellen

Die humanen Linsenepithelzellen wurden bis zur Konfluenz in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Nach der 2. Passage wurden die Zellen in einer Zelldichte von 10.000 Zellen pro Well (kumulativ 30 Ansätze) in DMEM mit 5% FCS ausgesät. Die Kulturen wurden auf 4 Gruppen verteilt. Die Gruppe ohne Zusatzsubstanz im Kulturmedium wurde als Kontrollgruppe bezeichnet. Die 3 Gruppen mit verschiedenen PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen als Zusatz zum Medium wurden als PGF-1/10-, PGF-1/100- und PGF-1/1000-Gruppe bezeichnet. Hierbei befand sich in der PGF-1/10-Gruppe 1/10 der PGF<sub>2α</sub>-Konzentration in Xalatan® Augentropfen im Kulturmedium, dies entspricht 5 µg/ml Kulturmedium. In

der PGF-1/100-Gruppe betrug diese Konzentration entsprechend 1/100, oder 0,5 µg/ml Kulturmedium und in der PGF-1/1000-Gruppe 1/1000 oder 0,05 µg/ml Kulturmedium. Ein Mediumwechsel erfolgte an Tag 3 und 6. Nach 1, 3 und 7 Tagen Inkubationszeit wurden die Kulturen jeder Gruppe abtrypsiniert und zweimal die Zellzahl bestimmt (kumulativ 60 Zelldichtebestimmungen). Aus dem Mittelwert beider Messungen wurde die Zellzahl berechnet. Die Verteilung der Zellkulturen ist in Tabelle 3.2 aufgelistet.

**Tabelle 3.2** Übersicht der Verteilung der Zellkulturen bei dem Versuch mit humanen Linseneithelzellen. Aufgelistet ist die Anzahl von Kulturen pro Gruppe und wieviele Kulturen ausgewertet wurden bei den Zellzählungen nach angegebener Kulturzeit.

Gruppe	Σ	Tag 1	Tag 3	Tag 7
Kontrollgruppe	6	2	2	2
PGF-1/10-Gruppe	8	3	2	3
PGF-1/100-Gruppe	8	3	3	2
PGF-1/100-Gruppe	8	2	3	3
Gesamt	30	10	10	10

### 3.4. Aufbau der Versuche mit bovinen Linseneithelzellen

Nach der Kultivierung bis zur Konfluenz in DMEM mit 10% FCS wurden bovine Linseneithelzellen mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen pro Well ausgesät und auf 6 Gruppen verteilt (kumulativ 225 Ansätze). Die Gruppe ohne Zusatzsubstanz im Kulturmedium wurde als Kontrollgruppe bezeichnet. Wie auch im Versuch mit humanen Linseneithelzellen wurden die 3 Gruppen mit unterschiedlichen PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen als PGF-1/10-, PGF-1/100- und PGF-1/1000-Gruppe bezeichnet. Die PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen in den Medien verhielten sich genauso wie in den Kulturen mit humanen Linseneithelzellen. Weitere zwei Gruppen mit einer Substitution von Dorzolamid-Hydrochlorid wurden als DA-1/100- bzw. DA-1/1000-Gruppe bezeichnet. Hier war die Dorzolamidkonzentration im Kulturmedium entsprechend 1:100 und 1:1000 im Vergleich zu Trusopt<sup>®</sup> Augentropfen, was einer Dorzolamid-Hydrochlorid-

Konzentration im Kulturmedium von 222,6 µg/ml in der DA-1/100-Gruppe und 22,26 µg/ml in der DA-1/1000-Gruppe entspricht.

Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden Kulturzeit und nach 4 Tagen. Bei dem ersten Wechsel wurde die FCS-Konzentration im DMEM auf 2 % reduziert. Ein vorher durchgeführter Versuch mit bovinen Linsenepithelzellen, kultiviert unter serumfreien Bedingungen, zeigte ein zu kurzes Überleben der Zellkulturen, so dass die FCS-Konzentration bei diesen Versuchen auf 2% reduziert wurde.

Eine Zellzählung zur Zelldichtebestimmung erfolgte nach 1, 3 und 7 Tagen. Nach 1 Tag Kulturzeit wurden 36 Kulturen ausgewertet, nach 3 Tagen 72 Kulturen und nach 7 Tagen die restlichen 117 Kulturen. In Tabelle 3.3 ist die Verteilung der Kulturen aufgelistet.

Um möglichst noch genauere Tendenzen beurteilen zu können, wurden die Kulturzeiten der bovinen Linsenepithelzellen bis auf 5 Minuten Kulturzeit genau gemessen.

Bei den vorhergehenden Versuchen hat sich gezeigt, dass eine zweite Zellzahlbestimmung derselben Kultur eine niedrigere Zellzahl ergab. Zwischen der ersten und zweiten Messung befanden sich die zu zählenden Zellen in einer isotonen Lösung mit Trypsin.

Zusätzlich wurden alle ersten und zweiten Zellzahlberechnungen ausgewertet.

**Tabelle 3.3** Übersicht der Verteilung der Zellkulturen bei dem Versuch mit bovinen Linsenepithelzellen. Aufgelistet ist die Anzahl von Kulturen pro Gruppe und wieviele Kulturen ausgewertet wurden bei den Zellzählungen nach angegebener Kulturzeit.

Gruppe	Σ	Tag 1	Tag 3	Tag 7
Kontrollgruppe	58	8	20	30
PGF-1/10-Gruppe	33	6	11	16
PGF-1/100-Gruppe	36	6	11	19
PGF-1/100-Gruppe	34	6	10	18
DA-1/100-Gruppe	33	6	10	17
DA-1/1000-Gruppe	31	4	10	17
Gesamt	225	36	72	117

### **3.5. Verwendete Statistik**

Zum Vergleich der verschiedenen Gruppen innerhalb der Versuchsreihen mit humanen bzw. bovinen Linsenepithelzellen wurden die Ergebnisse mit dem ungepaarten T-Test nach Student-Fischer ausgewertet. Hierbei werden die unterschiedlichen Mittelwerte in Relation zu der Variation betrachtet. Der Alpha-Level wurde bei 5% festgelegt und damit wurden p-Werte  $<0,05$  als signifikant angesehen. Als hochsignifikant wurden p-Werte  $<0,001$  betrachtet. Die Ergebnisse wurden anschließend deskriptiv ausgewertet. Primäres Ziel dieser Arbeit war es, die unterschiedliche Anzahl an proliferierten Linsenepithelzellen nach 7 Tagen Kultivierung zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und den Gruppen, welche mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  oder Dorzolamid behandelten wurden, statistisch auszuwerten.