

Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

Präklinische Evaluation der antifibrotischen Wirkung eines
selektiven $\alpha 5\beta 1$ -Integrininhibitors (CLT-28643) als Adjuvans
bei der filtrierenden Glaukomchirurgie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Konrad, Eva-Maria

2016

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Spitzer
2. Berichterstatter:	Professor Dr. F. Schüttauf
Tag der Disputation:	19.11.2016

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Glaukom	1
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Risikofaktoren	3
1.1.3	Glaukomformen	4
1.1.3.1	Offenwinkelglaukome	5
1.1.3.2	Winkelblockglaukome	7
1.1.4	Die Glaukomchirurgie	8
1.1.4.1	Die Trabekulektomie	9
1.1.4.2	Der Stellenwert der Wundheilung in der Glaukomchirurgie ..	10
1.1.4.3	Antimetabolite in der Glaukomchirurgie	12
1.1.5	Integrine	15
1.1.6	$\alpha 5\beta 1$ Integrine	17
1.2	Fragestellung	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Untersuchungsmaterial	20
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.1.1	Tierversuche	20
2.1.1.2	Histologie	20
2.1.1.3	Zellkulturversuche	21
2.1.2	Tiermodell	23
2.1.3	Geräte und Programme	23
2.1.4	Nährmedien	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Tierversuche	24
2.2.1.1	Vorgehen innerhalb der Versuchsgruppen	24
2.2.1.2	Trabekulektomie	25
2.2.1.3	Postoperative Untersuchungen	26
2.2.1.4	Enukleation und Vorbereitung für die Histologie	28
2.2.2	Histologie	28
2.2.3	Zellkulturversuche	29

2.2.3.1	Zellkultur und Kultivierung	29
2.2.3.2	Aussäen der Zellen in eine 96-Well-Platte	30
2.2.3.3	MTS-Test	31
2.2.3.4	Kristallviolett-Test	32
2.2.3.5	Caspase 3/7-Assay	33
2.2.3.6	Migrations-Assay	34
2.2.3.7	Adhäsions-Assay	37
2.2.4	Statistische Analysen	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Tierversuche	39
3.1.1	Präoperative Beurteilung	39
3.1.2	Intraoperativer Ablauf	39
3.1.3	Postoperative Folgeuntersuchungen	40
3.1.3.1	Augeninnendruckmessungen	40
3.1.3.2	Überlebenszeit des Filterkissens	45
3.1.3.3	Postoperative Entzündung	54
3.2	Histologie	55
3.3	Zellkulturversuche	59
3.3.1	MTS-Test	59
3.3.2	Kristallviolett-Test	63
3.3.3	Caspase 3/7-Assay	69
3.3.4	Migrations-Assay	73
3.3.5	Adhäsions-Assay	78
4	Diskussion	80
5	Zusammenfassung	94
6	Literaturverzeichnis	97
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	103
8	Veröffentlichungen	104
9	Anhang	105
9.1	Abbildungsverzeichnis	105
9.2	Tabellenverzeichnis	109
9.3	Danksagungen	110

9.4	Lebenslauf	111
-----	------------------	-----

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA antibody	anti human smooth muscle actin antibody
5-Fluorouracil	5-FU
α 5 β 1 integrin antibody	mouse anti human integrin α 5 β 1 antibody
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serum-Albumin
BSS	Balanced Salt Solution, Placebo
Calcein-AM	Calcein-Acetoxy-methylester-derivatxxx
CLT+ Gruppe	CLT+ Versuchsgruppe: Trabekulektomie mit intraoperativer CLT-28643-Gabe und postoperativer Applikation von Placebo-Augentropfen
CLT++ Gruppe	CLT++ Versuchsgruppe: Trabekulektomie mit intraoperativer CLT-28643-Gabe und postoperativer Applikation von CLT-28643-Augentropfen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FCS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast growth factor
FN	Fibronectin
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HHS	Harris Hämatoxylin Solution
HTF	Humane Tenonfibroblasten
IOP	intraokulärer Druck (intraocular pressure)
K	Kontrolle
MMC	Mitomycin C (Zytostatikum)
MMC Gruppe	MMC Versuchsgruppe: Trabekulektomie mit intraoperativer MMC-Gabe und postoperativer Applikation von Placebo-Augentropfen
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
P	Placebo

P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PEWG	Primäres Engwinkelglaukom
POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
PFA	Paraformaldehyd
SDS	Sodium dodecyl sulphate
St	Staurosporin
TGF	transforming growth factor
TSA	Trichostatin A
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VE-Wasser	vollentsalztes/destilliertes Wasser
WBCS	Würzburg Bleb Classification Score
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Das Glaukom

Das Glaukom, im Deutschen auch Grüner Star genannt, ist ein Sammelbegriff für ätiologisch unterschiedliche chronische Optikopathien, die mit einem Untergang retinaler Ganglienzellen und einer Optikusatrophie einhergehen [1]. Im Verlauf kommt es häufig zu einem pathognomonischen Papillenbefund (Exkavation) und charakteristischen Gesichtsfeldausfällen, woraus eine vollständige Erblindung resultieren kann.

Schon in der Antike verwendete Hippokrates (460 v. Chr. – 370 v. Chr.) in seinen „Aphorismen“ den Begriff Glaukom für eine fortschreitende Erblindung, die mit einer blausilbrig schimmernden Pupille einherging und seinen Beobachtungen zufolge meist ältere Menschen betraf [2]. Cornelius Celsus (25 v. Chr. – 50 n. Chr.) konnte Pupillenunregelmäßigkeiten und Schmerzen als prognostische Hinweise beobachten. Galen von Pergamon (129 – 199 n. Chr.) hingegen beschrieb eine Ansammlung von harter kristalliner Flüssigkeit im vorderen Augenabschnitt, die das Sehvermögen einschränkte [2]. Arabische Dokumente aus dem 10. Jahrhundert lassen darauf schließen, dass man beim Glaukom außerdem von einer Verhärtung oder Eindickung der intraokularen Flüssigkeit ausging [2].

Charakteristische Sehnervenschädigungen konnten erstmals 1850 dank dem durch Helmholtz erfundenen Ophthalmoskop diagnostiziert werden [3]. Im Jahre 1862 erkannte der niederländische Physiologe Donders die Kausalität zwischen einem erhöhten intraokularen Druck (IOP) und der darauffolgenden Erblindung. Diese Erkrankung nannte er „Glaucoma simplex“ [3]. Durch die Erfindung des Tonometers und der Perimetrie konnte die Glaukomdiagnostik weiterentwickelt werden und der IOP als Risikofaktor für die Entwicklung eines Glaukoms bestätigt werden. 1865 konstruierte der Berliner Augenarzt Professor Albrecht von Graefe das erste Messinstrument für den intraokularen Druck [4]. Von Graefe führte auch bereits im Jahre 1856 die erste operative Therapie des Glaukoms,

die sogenannte Iridektomie, aus [5]. 1875 begann die Ära der medikamentösen Behandlung des Glaukoms mit der Entdeckung des Pilocarpins [3].

Als Grundbaustein der heutigen Glaukomtherapie zählt die medikamentöse Behandlung mit Augentropfen. Hierbei können verschiedene Wirkstoffe einzeln oder als Kombinationstherapie eingesetzt werden. Diese zielen darauf ab, die Kammerwasserproduktion zu verringern oder den Kammerwasserabfluss zu verbessern und dadurch eine Senkung des IOPs zu erreichen. Medikamente, die hierbei den Kammerwasserabfluss verbessern, scheinen zu einem stabileren IOP zu führen als die Medikamente, die die Kammerwasserproduktion hemmen [6].

Prostaglandin-Analoga zählen als Therapie der ersten Wahl und weisen zudem nur geringe Nebenwirkungen auf [7]. Als weitere Substanzen stehen Betablocker, Carboanhydrase-Inhibitoren und alpha-2-agonistisch wirkende Sympathomimetika zur Verfügung. Pilocarpin, Acetazolamid und hyperosmotische Wirkstoffe finden weniger oft Verwendung [7].

Ein operativer Eingriff bei einem Glaukompatienten ist dann indiziert, wenn der IOP durch medikamentöse oder Lasertherapien nicht mehr suffizient eingestellt werden kann oder die Neuropathie des Sehnervs und die Gesichtsfeldausfälle trotz maximal möglicher konservativer Therapie fortschreiten [8].

Alle Therapieansätze können das Fortschreiten des Glaukoms lediglich verlangsamen oder aufhalten; eine Heilung ist derzeit jedoch nicht möglich.

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit gibt es über 60 Mio. Glaukompatienten. Es wird jedoch mit einem Anstieg aufgrund des demographischen Wandels bis zum Jahr 2020 auf 80 Mio. gerechnet [9]. In den Industrienationen leidet bis zu 1 % der Bevölkerung unter einem Glaukom mit bereits eingetretener Papillenschädigung. Wiederum 1/10 davon sind stark in ihrem Sehvermögen beeinträchtigt oder gar erblindet [10]. Bereits 10 % der deutschen Bevölkerung über 40 Jahre weisen einen erhöhten

IOP auf [11]. Die Prävalenz des Glaukoms in europäischen Ländern beträgt 2,42 % und steigt mit fortschreitendem Lebensalter steil an [12].

Im Jahr 2002 schätzte die World Health Organisation (WHO) die Zahl der durch das Glaukom erblindeten Menschen auf 4,4 Mio. weltweit [13]. In den Industriestaaten ist das Glaukom nach der Makuladegeneration und der diabetischen Retinopathie die dritthäufigste Erblindungsursache [10]. Weltweit gesehen ist das Glaukom nach der Cataract sogar die zweithäufigste Erblindungsursache und gilt als häufigste Ursache einer irreversiblen Erblindung [14]. Die Wahrscheinlichkeit, in Folge eines Glaukoms zu erblinden, beträgt zwischen 6,7 – 21 %. Diese Zahl ergab sich durch eine Auswertung in sechs Ländern, die ein Blinden-Register führen (Chile, Dänemark, Deutschland, Island, Vereinigtes Königreich, USA) [15].

Die Krankheit verläuft durch die bis zum Spätstadium häufig asymptomatische Entwicklung für den Patienten meist unbemerkt. Sogar in den Industriestaaten sind sich lediglich etwa 50 % aller Betroffenen ihrer Erkrankung bewusst; in den Entwicklungsländern ist diese Zahl noch niedriger [12, 16, 17]. Eine rechtzeitige Diagnose und Therapie sind aber elementar.

1.1.2 Risikofaktoren

Heutzutage wird die Bedeutung des früher in der Diagnostik alleinig dominierenden erhöhten IOP relativiert, aber dennoch als wesentlicher Risikofaktor für die Pathogenese des Glaukoms angesehen [18, 19]. Der normale IOP liegt bei $15,5 \pm 2,75$ mmHg und unterliegt rhythmischen Schwankungen im Tagesverlauf. Bei einem normalen IOP erwartet man Werte innerhalb von zwei Standardabweichungen, also Werte zwischen 10 und 21 mmHg [10]. Es können sich jedoch auch glaukomspezifische Augenschäden bei einem IOP innerhalb der statistischen Norm ausbilden, so dass der erhöhte IOP als einziges Diagnosekriterium nicht ausreicht [20]. Man geht vielmehr von einem individuell erhöhten IOP als wichtigsten Risikofaktor für die Entstehung eines Glaukoms aus [10].

Über lange Sicht führt der erhöhte IOP meist zu einer pathognomonischen Exkavation der Papille. Diese findet ihre Ursache zum einen in einer erhöhten mechanischen Belastung als auch andererseits in einer Minderperfusion des Sehnervs [10].

In Studien konnte gezeigt werden, dass ein niedriger IOP mit einem geringeren Fortschreiten des Visusverlusts einhergeht [21-23]. Da der IOP zudem der einzige behandelbare Risikofaktor des Glaukoms ist, besteht das primäre Therapieziel in der Senkung des IOPs [14].

Des Weiteren stellen Einflüsse der vaskulären Dysregulation, wie die bereits oben erwähnte Minderperfusion des Sehnervenkopfes, sowie Vasospasmen, Schlaf-Apnoe-Syndrom, Apoptose und eine ausgeprägte Hypo- bzw. Hypertonie entscheidende Risikofaktoren dar [13, 24-26].

1.1.3 Glaukomformen

Die Einteilung der Glaukomformen erfolgt ätiologisch gesehen in primäre und sekundäre Glaukome. Die selteneren sekundären Glaukome treten, im Gegensatz zu den spontan auftretenden primären Glaukomen, als Folge anderer okulärer oder systemischer Grunderkrankungen auf. Hierbei kommen für die Pathogenese unter anderem Traumata, Tumore, Neovaskularisation, Corticosteroidtherapien, intraokulare Entzündungen, Pigmentdispersionen oder Pseudoexfoliation in Frage [14].

Eine weitere Einteilung der Glaukomformen erfolgt nach dem entsprechenden zugrundeliegenden Pathomechanismus. Hierbei lässt sich das Offenwinkelglaukom vom Winkelblock- und kongenitalen Glaukom abgrenzen.

Kongenitale Glaukome, die meist im 1. Lebensjahr und vorwiegend bei Jungen auftreten, sind selten. Auf 10.000 – 18.000 Geburten kommt etwa ein Fall [10]. In der folgenden Tabelle ist eine Einschätzung der Verteilung der verschiedenen Glaukomarten weltweit dargestellt:

Tabelle 1: Epidemiologie der verschiedenen Glaukomarten weltweit. Primäres Offenwinkelglaukom (POWG), Primäres Engwinkelglaukom (PEWG) [27]

	Erkrankt	Erblindet
Kongenital	300.000	200.000
POWG	13,5 Mio.	3,0 Mio.
PEWG	6,0 Mio.	2,0 Mio.
Glaukomverdacht	105 Mio.	

In der folgenden Ausführung werde ich mich auf die Offenwinkel- und Winkelblockglaukome konzentrieren.

1.1.3.1 Offenwinkelglaukome

Das Offenwinkelglaukom (OWG) ist dadurch gekennzeichnet, dass der Kammerwinkel stets offen und nicht verlegt ist. Der Kammerwinkel bezeichnet den Winkel zwischen Irisvorderfläche und Cornea [12, 28]. Zudem verläuft das Offenwinkelglaukom meist schleichend mit progressiver Verschlechterung und hat seinen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr [11].

Das Offenwinkelglaukom ist die häufigste Glaukomform und tritt meist beidseitig auf [10]. Etwa 80 % der Glaukompatienten in den Industrienationen und 90 % aller weißen Glaukompatienten sind von einem Offenwinkelglaukom betroffen [14]. Afrikaner erkranken in der Regel bereits in jüngeren Jahren am Glaukom und weisen eine vierfach höhere Prävalenz für das Offenwinkelglaukom auf als Kaukasier [12, 15].

Für die Pathogenese der Glaukome ist das Verständnis der Kammerwasserphysiologie entscheidend. Das Kammerwasser wird durch das Ziliarepithel in der Hinterkammer gebildet und fließt anschließend durch die Pupille in die Vorderkammer (1. physiologischer Widerstand - relevant für die Pathogenese des Winkelblockglaukoms (s.u.)). Von der Vorderkammer aus gelangt das Kammerwasser zu 85 % durch das Trabekelwerk (2. physiologischer Widerstand) in den Schlemm'schen Kanal und wird in die episkleralen Kammerwasservenolen drai-

niert. Die restlichen 15 % des Kammerwassers werden über uveosklerale Gefäße dem venösen Blutkreislauf zugeführt [11].

Das Kammerwasser ist essentiell für die Ernährung der Linse und Hornhaut. Wird jedoch das Gleichgewicht zwischen Produktion und Abtransport von Kammerwasser zugunsten einer erhöhten Menge an Kammerwasser verschoben, so kommt es zu einem Rückstau des Kammerwassers und damit zu einem ansteigenden IOP [29].

Das Offenwinkelglaukom lässt sich durch einen erhöhten Widerstand im Trabekelwerk (2. physiologischer Widerstand) und einer damit einhergehenden Druckschädigung des Sehnervs erklären.

Risikofaktoren für das primäre Offenwinkelglaukom sind ein Augendruck über der statistischen Norm, eine große Papillenexkavation bzw. eine große Seitendifferenz der Papillenexkavation, eine dünne Hornhautdicke, ein höheres Lebensalter, Myopie, positive Familienanamnese, schwarze Hautfarbe, Hypotonie, schwerwiegende kardiovaskuläre Vorerkrankungen sowie ein Glaukomschaden am anderen Auge [10].

Die meisten OWG-Patienten sind jahrelang frei von Beschwerden. Auch die allmählich entstehenden Gesichtsfelddefekte werden erst dann von den Patienten wahrgenommen, wenn das zentrale Sehen davon betroffen ist. Nur eine geringe Zahl an Patienten nimmt unspezifische Beschwerden wie Kopfschmerzen, Augenrötung oder verschwommenes Sehen wahr. Eine frühe Diagnosestellung ist daher essentiell für das Erhalten der Sehkraft [11].

Zu den sekundären Offenwinkelglaukomen zählen unter anderem das Pseudoexfoliations-, das Pigmentdispersions- sowie das phakolytische Glaukom [29]. Eine Sonderform des Offenwinkelglaukoms, das sogenannte Normaldruckglaukom, liegt dann vor, wenn glaukotypische Schädigungen an der Papille und charakteristische Gesichtsfeldausfälle bei einem normalhohen IOP vorliegen [10].

1.1.3.2 Winkelblockglaukome

Das Winkelblockglaukom entsteht durch eine Verlegung des Kammerwinkels und einem damit verbundenen Anstieg des IOP. Der akute Winkelblock ist vom intermittierenden Winkelblock sowie vom chronischen Winkelblockglaukom zu unterscheiden [10].

Beim akuten Winkelblock, dem sogenannten Glaukomanfall, handelt es sich um einen akuten Kammerwinkelverschluss mit einem auf das Mehrfache der statistischen Norm anfallsweise erhöhten IOP. Die Produktion des Kammerwassers sowie der Widerstand im Trabekelmaschenwerk sind hingegen ungestört [11]. In den meisten Fällen liegt diesem Krankheitsbild ein Pupillarblock zugrunde. Hierbei entsteht durch eine flache Vorderkammer ein hoher Pupillarwiderstand, der den Druck in der Augenhinterkammer ansteigen lässt und für eine Vorwölbung der Iris in das Trabekelmaschenwerk und somit für eine Blockierung desselben sorgt. Der IOP kann hierbei auf bis zu 80 mmHg steigen [29]. Der akute Winkelblock ist als augenärztlicher Notfall anzusehen. Besonders oft entwickelt sich der Winkelblock einseitig unter Mydriasis. Diese kann entweder physiologisch, wie beispielsweise durch emotionalen Stress oder Dunkelheit, oder iatrogen durch lokal applizierte Mydriatika oder systemische Psychopharmaka generiert werden [10]. Als weitere Risikofaktoren seien ein hypermetropes Auge sowie eine große Linse, beispielsweise durch Diabetes oder physiologischerweise im Alter, genannt. In Europa machen die akuten Winkelblockglaukome lediglich 5 % der Glaukomefälle aus, bei Asiaten und Eskimos hingegen bis zu 50 % [10].

Das akute Winkelblockglaukom läuft symptomatisch mit Schmerzen, Rötung des Auges sowie einer plötzlichen Sehverschlechterung ab [29]. Bei der Untersuchung des Patienten lassen sich eine gemischte Injektion mit Hornhautödem sowie eine aufgehobene Vorderkammer, ein positiver Tyndall-Effekt und eine lichtstarre Pupille diagnostizieren [29].

Beim intermittierenden Winkelblock handelt es sich um eine Vorstufe des akuten Winkelblocks. Der Pupillarblock, der transitorische Steigerungen durch die Verlegung des Kammerwinkels bedingt, löst sich hierbei spontan auf [10].

Einem chronischen Winkelblockglaukom liegen irreversible vordere Synechien zugrunde [29]. Diese können durch einen zu spät therapierten Glaukomanfall bedingt sein und führen zu einer chronischen Steigerung des IOP [10].

1.1.4 Die Glaukomchirurgie

Da die medikamentöse Behandlung des Glaukoms in ihrer Wirkung limitiert ist, werden bei therapierefraktär hohen IOPs, mangelnder Compliance der Patienten, bei Nebenwirkungen der lokalen medikamentösen Behandlung oder aber bei Verschlechterung des Papillenbefundes trotz klinisch guter Tensiolage unter Mehrfachtherapie Laserbehandlungen oder chirurgische Therapiemöglichkeiten in Erwägung gezogen [7]. Operative Eingriffe werden jedoch aufgrund der möglichen Komplikationen eher in fortgeschrittenen Stadien des Glaukoms favorisiert. Besonders häufig werden hierbei fistulierende Operationen eingesetzt, die einen neuen, physiologisch nicht vorhandenen, Abflussweg für das Kammerwasser generieren. Durch subkonjunktivale Fibrosierung und Narbenbildung innerhalb der Operationsstelle kann es jedoch bei Glaukomoperationen zu einem raschen Nachlassen des Therapieerfolges kommen [30].

Prinzipiell unterscheidet man heutzutage filtrierende von nicht-filtrierenden Operationen. Bei den filtrierenden Operationsverfahren, wird dem Kammerwasser ein neuer Abflussweg geschaffen, um den IOP zu senken. Das Kammerwasser kann so unter die Bindehaut abfließen und dort von den Venen und Lymphgefäßen resorbiert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Trabekulektomie.

Die nicht-filtrierenden Operationsverfahren haben den Vorteil, dass der Augapfel nicht eröffnet werden muss und sie dadurch mit weniger postoperativen Komplikationen verbunden sind. Allerdings führen sie in der Regel auch zu einer geringeren Drucksenkung als die filtrierenden Eingriffe. Zu den nicht-

filtrierenden Operationen zählen unter anderem die tiefe Sklerektomie und die Viskokanalostomie.

Die operativen Therapiemöglichkeiten führen zu einer stärkeren Drucksenkung als die medikamentöse oder Lasertherapie und dienen daher meist als ultima ratio [10].

Da in der präklinischen Studie dieser Arbeit die Kaninchen trabekulektomiert wurden, werde ich mich im Folgenden auf die Trabekulektomie als Beispiel eines glaukomchirurgischen Eingriffes beschränken.

1.1.4.1 Die Trabekulektomie

Die Trabekulektomie wurde 1968 von Cairns entwickelt [31]. Auch wenn die Trabekulektomie seitdem einigen Änderungen unterlag, ist sie heutzutage immer noch eine der effektivsten Operationen der Glaukomchirurgie und nach wie vor der weitest verbreitete Glaukomeingriff [32, 33].

Das Prinzip der Trabekulektomie ist, dass das Kammerwasser durch einen neuen Abflussweg von der Vorderkammer vorbei am Trabekelwerk unter die Bindehaut geleitet wird. Das operative Procedere verläuft folgendermaßen: Es wird ein limbus- oder fornixständiger Bindehautlappen sowie ein lamellärer Skleradeckel präpariert. Bei der Trabekulektomie wird der Zugang zur Vorderkammer rechteckig präpariert; bei der Goniotrepanation durch einen Trepan rundlich ausgestanzt. Diesem Schritt folgt eine periphere Iridektomie durch die soeben geschaffene Öffnung [11].

Der zuvor präparierte Skleradeckel wird anschließend über der neuen Öffnung fixiert und dient dazu, den Kammerwasserfluss etwas zu reduzieren. Die darüber liegende Bindehaut sorgt für einen wasserdichten Abschluss. Durch das absickerende Kammerwasser bildet sich ein sogenanntes Filterkissen, welches meist unter dem Oberlid liegt [10].

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Trabekulektomie beim Hochdruck-Glaukom mit dem gewünschten Erhalt der visuellen Funktion einhergeht [10, 34].

Der Nachteil der Trabekulektomie ist, dass durch die relativ große Öffnung postoperativ eine okuläre Hypotonie auftreten kann. Diesem wird jedoch dadurch entgegengewirkt, dass der Skleradeckel nach Schaffung des neuen Abflusses wieder gut fixiert wird. Sollte die Gefahr einer Überfiltration bestehen, so kann man dieser rasch durch eine transkonjunktivale Naht entgegenwirken [35].

Liegen sowohl eine Indikation für eine Glaukom-, sowie für eine darauffolgende Cataractoperation vor, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Filterkissen offen bleibt, umso höher, je länger hierbei der Abstand zwischen den beiden Operationen ist [35]. Zudem existiert eine Korrelation zwischen der Anzahl der präoperativ verwendeten Medikamente sowie der Dringlichkeit des operativen Eingriffs und der Wahrscheinlichkeit, dass sich das Filterkissen verschließt [35].

Die Erfolgsquote der Trabekulektomie wird in der Literatur sehr unterschiedlich beschrieben. In einer Studie von Ehnrooth aus dem Jahre 2002 liegt die Erfolgsquote beispielsweise bei 82 % im ersten, bei 70 % im zweiten, bei 64 % im dritten und bei 52 % im vierten postoperativen Jahr [36]. In einem Journalartikel von Gerste aus dem Jahre 2012 wird hingegen von einem vollständigen Erfolg von 57 % in einer Zeitspanne von 20 Jahren gesprochen [37].

1.1.4.2 Der Stellenwert der Wundheilung in der Glaukomchirurgie

In der Chirurgie gilt der wesentliche Grundsatz, dass die Wundheilung und der Wundverschluss so schnell und erfolgreich wie möglich erfolgen sollen, um die Integrität und die Funktion des Gewebes aufrecht zu erhalten. Bei der perforierenden Glaukomchirurgie hingegen gilt, dass zwar einerseits die genähten Schnittländer des Filterkissens an den Konjunktiven verheilen sollen, andererseits jedoch die subkonjunktivale Narbenbildung im Bereich der Tenon und der Sklera verhindert werden soll, so dass die Drucksenkung längerfristig aufrecht

erhalten bleiben kann [10]. Die auf das Filterkissen begrenzte Unterdrückung der Wundheilung ist also ein zentraler Faktor bei der postoperativen Behandlung und der Prognose trabekulektomierter Augen. Die corneosklerale Wunde, die den neuen Abflussweg darstellt, gilt es so lange wie möglich offen zu halten.

Als Risikofaktoren für die Vernarbung und damit für einen postoperativen Funktionsverlust der Filterkissen zählen unter anderem schwarze Hautfarbe, junges Lebensalter, voroperierte Augen, latente konjunktivale Entzündungen, Tenonzysten (eingekapselte Filterkissen), Pseudophakie und Aphakie [38-41].

Die physiologische Wundheilung läuft in mehreren Teilschritten ab. Auf die koagulative und entzündliche Phase folgen die Proliferations-, Reparations- und Umbauphase [33]. Die verschiedenen Phasen und die dort jeweils relevanten Moleküle, wie beispielsweise die Zytokine, sind in Abbildung 1 dargestellt.

Durch das Operationstrauma steigt die Permeabilität der benachbarten Gefäße. Plasmaproteine, wie beispielsweise Fibrinogen und Blutzellen dringen aufgrund der verletzten Blutgefäße in die Operationswunde ein und die koagulative Phase beginnt. Mit Hilfe der Gerinnungsfaktoren und der Thrombozyten wird eine Blutstillung erreicht. Der Blutthrombus besteht im Wesentlichen aus Fibrin, Erythrozyten und Thrombozyten.

In der Entzündungsphase spielen Hormone (Histamin, Leukotriene und Prostaglandin), Wachstumsfaktoren (VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), placental growth factor oder TGF- β (Transforming Growth Factor β)) und Zytokine (Interleukin-1) eine große Rolle (Abbildung 1). Diese locken Makrophagen, Lymphozyten und neutrophile Zellen an [33].

In der Proliferations- und Reparationsphase wandern Fibroblasten in die Operationswunde ein. Des Weiteren wird zum Verschluss der Wunde die Angiogenese und die Ausbildung von Granulationsgewebe angeregt. In der Umbauphase erfolgt schließlich der Umbau des Granulations- in ein Narbengewebe. Im weiteren Verlauf werden die Kollagen Typ I-Fasern und Elastin durch die Fibroblasten vernetzt, so dass ein dichtes Narbengewebe entsteht [33].

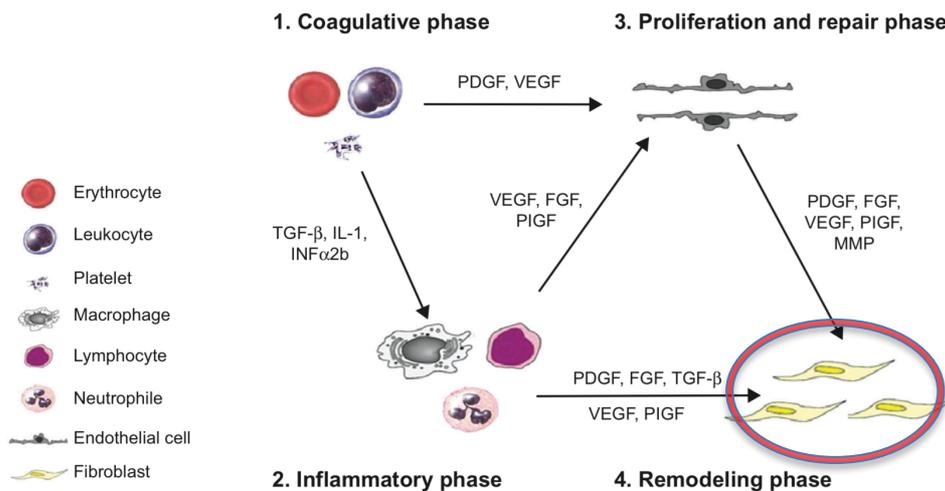


Abbildung 1: Die verschiedenen Phasen der physiologischen Wundheilung [33]

Fibroblasten spielen bei der Wundheilung der Glaukomoperationen eine zentrale Rolle, da sie Kollagen als hauptsächlichen Bestandteil des Granulationsgewebes synthetisieren. Mononukleäre Zellen, wie Lymphozyten, Monozyten oder Makrophagen lösen die Ausschüttung zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise TGF, FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) aus (Abbildung 1). Diese Moleküle wiederum stehen in engem Zusammenhang zu den Fibroblasten der Tenonkapsel, da sie in der Lage sind, deren Aktivität zu verstärken und damit die fibrotische Narbenbildung zu fördern. Aus diesem Grund gilt es, die Fibroblasten und die mononukleären Zellen in der Glaukomchirurgie lokal gezielt zu unterdrücken [8].

Wenn es durch überschießende Wundheilung zu einem Verschluss der Fistulierung kommt, so versagen die Filterkissen meist zwei bis drei Monate nach dem operativen Eingriff. Die Fibroblasten im subkonjunktivalen Wundgebiet fangen jedoch schon ab dem dritten postoperativen Tag an, sich zu vermehren [33].

1.1.4.3 Antimetabolite in der Glaukomchirurgie

Die kurzzeitige intraoperative lokale Anwendung von Steroiden oder antiproliferativen Substanzen wie Mitomycin C (MMC) oder 5-Fluoruracil (5-FU) kann helfen, die Vernarbung und damit das Versagen der Filterkissen zu verhindern [42]. Erst in den frühen achtziger Jahren kam man auf die Idee, Zytostatika wie

MMC oder 5-FU als off-label-Medikation für die Verhinderung der Fibroblastenaktivierung zu verwenden [33].

5-FU wird im Anschluss an den operativen Eingriff subkonjunktival appliziert. Es antagonisiert den Pyrimidin-Metabolismus, so dass durch die Inhibition der DNA-Synthese der Zelltod eintritt. Zudem ist 5-FU in der Lage, das Fibroblastenwachstum langfristig zu hemmen. In Studien konnte gezeigt werden, dass Trabekulektomien mit intraoperativer 5-FU-Applikation weniger Vernarbung und Fibroblastenwachstum zeigten als Trabekulektomien ohne adjuvante Medikation. Da 5-FU jedoch auf alle proliferierenden Gewebe toxisch wirkt, können als Komplikation corneale Toxizität und Apoptose an jedweden Zellen auftreten [33].

MMC wird niedrigkonzentriert mittels getränkter Zelluloseputterschwämmchen für einige Minuten lokal auf die Operationsstelle appliziert. Anschließend wird das Applikationsgebiet gründlich ausgespült, um die starke Toxizität des MMC zu vermindern. MMC hemmt die DNA-Replikation und die Proteinsynthese und kann in jede Zellzyklus-Phase eingreifen. In der Glaukomchirurgie kommt vor allem die Funktion des MMCs als Inhibitor der Fibroblastenproliferation und der Endothelzellen zum Tragen [43]. Somit wird die Narbenbildung abgeschwächt und das Filterkissen bleibt länger funktionsfähig [42, 43].

Studien konnten zeigen, dass eine 2,5-minütige Einwirkungszeit von MMC ebenso gute Ergebnisse hervorbringt wie eine 5-minütige Einwirkungszeit. Des Weiteren zeigte eine Dosis von 0,02 % bessere Effekte als eine niedrigere Konzentration von 0,002 % [33]. MMC hemmt die Vernarbung der Filterkissen zwar stärker als 5-FU, ist jedoch auch zytotoxischer als dieses. Unter der Anwendung von MMC entstehen sehr dünne und avaskuläre Filterkissen. Längerfristig können sich hierbei folgende Probleme ergeben: Hypotonie, Endophthalmitis sowie ein ungewollt starker Abfluss von Kammerwasser durch die Konjunktiva [44, 45].

Diese Komplikationen treten desto häufiger auf, je länger MMC appliziert wurde und desto höher dessen Konzentration war [28].

MMC gilt bei den Antimetaboliten der Trabekulektomie heutzutage als Goldstandard und verbessert die Erfolgsrate des Eingriffs [35]. Im Vergleich dieser beiden am häufigsten verwendeten Antimetaboliten senkt MMC den IOP deutlicher als 5-FU, auch wenn beide Substanzen in der Lage sind, eine langfristige Drucksenkung zu ermöglichen [46]. Während 5-FU das Fibroblastenwachstum lediglich etwa 7 Tage lang hemmt, werden die Fibroblasten durch MMC sogar noch nach einem Monat im Wachstum gehemmt [33]. MMC besitzt zudem den Vorteil, dass es nur einmal für ein paar Minuten intraoperativ appliziert werden muss. 5-FU hingegen erfordert postoperative repetitive subkonjunktivale Injektionen. In manchen Fällen kommen auch beide Substanzen kombiniert zum Einsatz. Wird ein Filterkissen beispielsweise intraoperativ mit MMC behandelt, zeigt postoperativ jedoch beginnende Narbenbildung, so können adjuvant subkonjunktivale 5-FU-Injektionen appliziert werden, um die Funktionsfähigkeit des Filterkissens zu verlängern.

Auch topische Steroide, meist Dexamethason, können die Funktionsfähigkeit der Filterkissen auf eine Dauer von mehreren Monaten aufrechterhalten. Sie reduzieren postoperative Entzündungen und vermindern die lokale Narbenbildung. Auch wenn Steroide stark antifibrotisch wirken, so vernarben trotz allem einige Filterkissen innerhalb weniger Wochen nach der OP, so dass der IOP wieder seinen präoperativen Wert erreicht. Nach längerer Anwendung können Steroide allerdings dazu führen, dass der unerwünschte Vernarbungsprozess gefördert wird. Dies geschieht dadurch, dass Fibroblasten aktiviert werden, die extrazelluläre Matrix produzieren [47].

Die Anwendung der Antimetaboliten kann jedoch keine Garantie für eine langfristige Funktion der Filterkissen geben, da die Wundheilung ein über Wochen bis Monate andauernder Prozess ist.

Da in dieser Arbeit die Wirkung des CLT 28643, eines $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibitors, im Vergleich zu MMC und Placebo untersucht wurde, werde ich mich in der folgenden näheren Ausführung auf die Integrine, als Beispiel eines neuen Therapieansatzes der Fibrosehemmung, beschränken.

1.1.5 Integrine

Integrine sind Transmembranrezeptoren, die von allen Zellen exprimiert werden und zu den Zelladhäsionsmolekülen gezählt werden. Sie spielen bei der Adhäsion, der Organisation der Extrazellulärmatrix, der Apoptose, sowie der Proliferation und Signalgebung der Zellen eine Rolle. Des Weiteren regulieren sie Prozesse des Zytoskeletts wie Kontraktion, Phagozytose und Endozytose. Integrine können zudem mechanische in biochemische Informationen umwandeln und sind somit nicht nur für die Adhäsion, sondern auch für die Kommunikation zwischen Extra- und Intrazellulärraum von Bedeutung. Ihr Name leitet sich von der bei ihrer Entdeckung angenommenen Funktion der Integrine, nämlich der Verbindung zwischen Extrazellulärmatrix und intrazellulärem Zytoskelett, ab [48, 49]. Integrine bestehen aus je einer α - und einer β - Untereinheit, welche nicht konvalent miteinander verbunden sind (Abbildung 2). Beim Menschen sind über 18 verschiedene α - und 8 β -Untereinheiten bekannt. Als Heterodimere sind beim Menschen 24 verschiedene Integrin-Rezeptoren identifiziert worden, da bestimmte α -Untereinheiten nur an bestimmte β -Untereinheiten binden können. Die Integrinuntereinheiten haben ein Molekulargewicht von 80 bis 180 KDa. Ein Integrinmolekül besteht prinzipiell aus drei verschiedenen Domänen: Eine große extrazelluläre, eine transmembranäre, sowie eine kurze intrazelluläre. In der zellulären Matrix dominieren drei Integrinarten: $\alpha1\beta1$, $\alpha5\beta1$ und $\alpha7\beta1$. Diese stellen Rezeptoren für Kollagen, Fibronectin und Laminin dar. $\beta1$ ist in den meisten Integrinen vorhanden, wobei jedoch unterschiedliche Zelltypen auch unterschiedliche Varianten der Integrine mit verschiedenen Bindungsspezifitäten für die Liganden aufweisen [48].

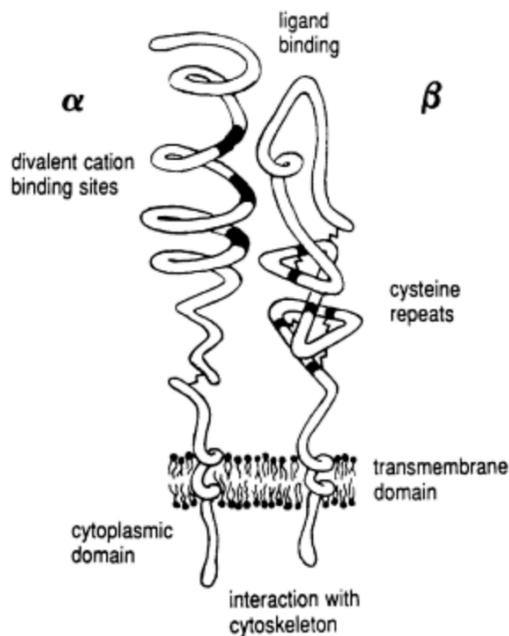


Abbildung 2: Schematisches Modell eines Integrin-Moleküls [50]

Integrine haben zwar keinen eigenen enzymatischen Stoffwechsel, spielen jedoch bei den Signalwegen der Zellen eine große Rolle. Sie können sowohl vom Extra- in den Intrazellularraum Signale abgeben als auch umgekehrt; daher werden die Integrine auch als bidirektional bezeichnet [51]. So können Liganden der Extrazellulärmatrix wie Kollagen oder Fibronectin an die extrazelluläre Domäne der Integrine binden und einen intrazellulären Signalweg in Gang setzen. Die transmembranäre und zytoplasmatische Domäne stehen mit intrazellulären Signalkinasen und Adaptorproteinen in Verbindung, die für die oben genannten Wirkungen der Integrine sorgen [49].

Besonders bei der Fibroseentstehung kommt den Integrinen eine große Bedeutung zu. Bei der Fibrose werden im Rahmen einer Gewebsveränderung die Bestandteile der Extrazellulärmatrix vermehrt sowie deren Zusammensetzung verändert. Integrine sind durch ihre verbindende Funktion zwischen Extrazellulärmatrix, Entzündungszellen, Wachstumsfaktoren und Fibroblasten stark in den Prozess der Entstehung des Fibrosegewebes eingebunden [52]. Um die Gewebsintegrität zu erhalten, differenzieren sich zusätzlich gewebständige Fib-

roblasten in Myofibroblasten um. Diese Differenzierung ist auf die Anwesenheit von TGF β , PDGF und Fibronectinrezeptoren angewiesen [53]. Myofibroblasten sind zusammen mit den Integrinen wesentlich an der Wundheilung und Fibrosierung beteiligt. Sie sind primär für die Sekretion der Extrazellulärmatrix zuständig und ermöglichen durch die Kontraktilität von Narbengewebe einen Wundverschluss [54]. Die Zelladhäsion, die durch die Integrine gewährleistet wird, bildet die Grundlage aller Gewebereparaturen. Sie ermöglicht die Zellmigration, die Proliferation sowie die Proteinproduktion. Die Ausbildung von Granulationsgewebe ist also wesentlich von der Anwesenheit der Integrine abhängig [55].

Aus diesen Gründen stellen Integrine gute Angriffspunkte dar, durch eine Hemmung derselben die Fibrosereaktion in verschiedenen Organen abzuschwächen.

1.1.6 α 5 β 1 Integrine

α 5 β 1-Integrine besitzen die stärkste Bindungsaffinität zu Fibronectin (FN). FN ist ein Bestandteil des primären Blutthrombus und eines der wichtigsten Moleküle der Extrazellulärmatrix, welches bei der Wundheilung beteiligt ist. Es dient als Matrix für die Ablagerung anderer extrazellulärer Proteine und als Gerüst für die Migration von Fibroblasten sowie von epithelialen und endothelialen Zellen, die für den Wundverschluss wichtig sind. Zusätzlich zu dieser elementaren Funktion als Grundlage der Wundheilung lockt FN Fibroblasten, Monozyten und endotheliale Zellen zur Opsonierung der Wundbeläge an [56]. Des Weiteren sind α 5 β 1-Integrine in der Induktion der Prokollagenexpression von Typ I und III beteiligt [57]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in hypertrophierenden Narben und Narbenkeloiden die Expression der α 5 β 1-Integrine im Vergleich zu normaler Haut stark gesteigert war [58]. Daraus folgt, dass ein Mangel an α 5 β 1-Integrinen zu einer verminderten Wundheilung führt.

α 5 β 1-Integrine und ihre Interaktion mit FN werden jedoch nicht nur bei der Wundheilung, sondern auch bei der Embryogenese und der Angiogenese be-

nötigt. In Tumorzellen konnte eine Veränderung der $\alpha 5\beta 1$ -Integrine festgestellt werden. Lag in einem Tierversuch an Mäusen eine Deletion an der $\alpha 5$ -Untereinheit vor, so wurde die Neuralrohrentwicklung gestört und es kam zu einem Blutzellverlust während der Embryogenese. Wurde hingegen die $\beta 1$ -Untereinheit ausgeschaltet, so zeigte sich durch eine veränderte Migration und Adhäsion sowie durch eine verkürzte Lebenszeit der Endothelzellen ein gestörtes vaskuläres Remodelling [59]. Zusätzlich wird den $\alpha 5\beta 1$ -Integrinen eine wichtige Rolle bei der Oberflächenanhaftung und Aufnahme von Viren, bei der Leukozytenadhäsion an Blutgefäßen sowie der Aktivierung und Umgestaltung des Zytoskeletts zugesprochen [59].

Auch in der Prognosebestimmung von Karzinompatienten, können $\alpha 5\beta 1$ -Integrine hilfreich sein. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Anwesenheit von $\alpha 5\beta 1$ -Integrinen, die die Angiogenese fördern, mit einer schlechteren Prognose beim Magenkarzinom einhergeht [60].

1.2 Fragestellung

Auch wenn MMC stark antiproliferativ und toxisch wirkt, so sind die Komplikationen durch die dünnen und avaskulären Filterkissen unter MMC-Therapie, wie zum Beispiel die Endophthalmitis, nicht zu vernachlässigen. Daher besteht der Bedarf nach einem weiteren antiproliferativen Wirkstoff, der eine übermäßige Fibrosierung verhindert, ohne jedoch auf die umgebenden Strukturen zu toxisch zu wirken.

Unsere Forschung beschäftigt sich mit folgender Thematik: Kann bei der Trabekulektomie durch einen $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibitor, wie CLT-28643, eine Fibrosehemmung erreicht werden? Hierbei handelt es sich um ein sogenanntes small molecule, welches aufgrund seiner geringen Größe in Zellen eindringen und chemisch synthetisiert werden kann. $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, welches durch CLT-28643 gehemmt wird, besitzt eine Schlüsselrolle in der Angiogenese, der Entzündungsreaktion sowie der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. CLT-28643 hat bereits antiproliferative Eigenschaften, wie beispielsweise eine Hemmung des Tumorwachstums und der Angiogenese in einigen Xeno- und

Synograft-Tumormodellen gezeigt [61]. CLT-28643 könnte das Vernarben nach filtrierenden Glaukomoperationen hemmen und somit das Überleben der Filterkissen verlängern. Die Untersuchung hinsichtlich Wirkung und Toxizität von CLT-28643 erfolgt im Vergleich zum derzeitigen Goldstandard MMC. Unsere Arbeit stellt die erste Studie dar, in der der antifibrotische Effekt von CLT-28643 bei filtrierenden Glaukomoperationen untersucht wird.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1.1 Tierversuche

- 10.0 Nylon Faden (Ethilon), LOT DM2596, Ethicon, Belgium
- 7.0 Vicryl Faden, LOT DPM333, Ethicon, Belgium
- 8.0 Vicryl Faden, LOT AB8KLXMO, Ethicon, Belgium
- Augentropfenflaschen zum sterilen Befüllen, 10187-R batch record
- CLT-28643 Lösung/Augentropfen, Integrininhibitor, Clanotech Schweden, batch number CS10-046A-1001
- Conjuncaïn EDO, Produktnummer: 07617666 , Bausch& Lomb
- Formaldehyd (Formalin) 4,5 %
- Ketamin 10 % (Ketaminhydrochlorid) 100mg/ml, WDT Deutschland, Bella-Pharm, E1670044WDD
- Mitomycin C, Universitätsapotheke Tübingen
- Operationsbesteck, Geuder, Deutschland
- Placebo (BSS), Universitätsapotheke Tübingen
- Sedaxylan (Xylazin) 20mg/ml, CS70, WDT Deutschland, Eurovet Animal Health B.V., Niederlande
- T61 (Embutramid), 0,3 ml/kg, 15687-14-6, Intervet, Unterschleißheim

2.1.1.2 Histologie

- 99 %-iger, 96 %-iger, 70 %-iger Alkohol
- α -SMA antibody, anti human smooth muscle actin antibody, Dako, #M0851, dilution 1:800
- α 5 β 1 integrin antibody (mouse anti human integrin α 5 β 1 antibody, Millipore, #MAB1969, dilution 1:100)
- aqua dest

- Biebrich scarlet – acid: 1 % Biebrich scarlet (Sigma B6008), 1 % Säurefuchsin (Merck Nr. 7629), Eisessig
- Biotinylated goat anti-mouse, Dako # E0433
- Bouin's Lösung: Pikrinsäure, 37-40 % Formalin, Eisessig, HT 10132 Sigma-Aldrich
- Dako Antibody Diluent # S3022
- Eosin Y Gebrauchslösung Fa. Sigma Aldrich E 6003 25g
- Fixierlösung: Roti-Histofix 4,5 %, Fa. Roth, Artikelnr.: 2213.1
- HHS (Harris Hämatoxylin Solution Fa. Sigma Aldrich HHS 32-11)
- Immun-/Antikörperfärbung: Dako REAL Detection System, Alkalische Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse REF # K5005
- Trichrome Stain (Masson) Kit, HT15, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Phosphomolybdic-Phosphatungsticacid: Molybdätophosphorsäure, Phosphatungsticacid, aqua dest, HT 15-2, HT 15-3, Sigma-Aldrich
- Poly-L-Lysin zur Beschichtung der Objektträger: Sigma P8920 100ml
- Weigerts Hämatoxylin, HT 1079, Sigma-Aldrich

2.1.1.3 Zellkulturversuche

- 6-, 96-well-Platten, Microtest Falcon 353072
- 8 µm pore HTS FluoroBloc Multiwell Inserts System, BD Bioscience Falcon, REF 351158
- 96-well-Platten, Falcon, White Opaque Tissue Culture Plate, Flat Bottom with Low Evaporation Lid, 353296
- Basic fibroblast growth factor (bFGF), Sigma # F3683, 26 µg/ml in 20mM Tris pH7
- Bovine Serum Albumin (BSA) pH 7.0, Fraction V, PAA (the cell culture company), Cat.No. K41-001
- Calcein AM, 4mM in DMSO, Sigma # 17783, 20 µl Aliquots
- Caspase-Glo 3/7 Assay Promega, G8091
- Cell Dissociation Solution, Non-enzymatic, Sigma # SLBH4093V, C5914-100ML
- CLT-28643, Integrininhibitor, Clanotech Schweden

- Crystal Violet Solution, Sigma-Aldrich REF HT901-8FOZ
- DAPI-Färbung: LOT 9Y005147 AppliCh Biochemica
- Fetal Bovine Serum (FCS) gibco, REF 10270-106, GIBCO
- gibco DMEM (Dulbecco's Mod Eagle Medium), 500 ml, REF 31885-023, LOT 1358208, GIBCO
- Humane Tenonfibroblasten (HTF) von verschiedenen Patienten unterschiedlichen Alters nach vorheriger Einwilligung aus der Universitäts-Augenklinik in Tübingen
- Human Fibronectin (FN) 120kDa fragment 1mg/ml, Millipore # F1904
- Kanülen 0,7mm, Sterican
- MTS-Test: Promega CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent, REF G358A, LOT 0000036780
- NaCl 0,9 %, 235-0748, Braun
- Neubauer-Zählkammer
- Paraformaldehyd (PFA), Merck, # 104005
- Penicillin/Streptomycin (P/S) PAA (the cell culture company), Cat No: P11-010
- Phosphate Buffered Saline (PBS) gibco PBS ph 7,4. REF 10010-015, LOT 1423518
- Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml) , Costar
- Pipettenspitzen, 20 µl, 100 µl, 1000 µl, Greiner bio-one
- Pipettierhilfe, accu-jet (Eppendorf)
- Sodium dodecyl sulphate (SDS), Serva, # 20783
- Spritzen (5ml, 10ml), Greiner bio-one
- Staurosporin, S6942, (1mM in DMSO, 100 µg/214 µl), Sigma-Aldrich
- Trichostatin A, Ready Made Solution, Sigma (5mM in DMSO, 0,2 µl-filtered), 1952 200 UL
- Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA), gibco, REF 25200-072
- Zellkulturflaschen steril, Cellstar, Greiner bio-one

2.1.2 Tiermodell

Die Kaninchen der Art Chinchilla Bastard; Crl:CHB (Bezugsquelle: Charles River, Deutschland) werden bevorzugt in Tierversuchen angewendet, da die Größe des Kaninchenauges der Größe eines menschlichen Auges nahe kommt.

2.1.3 Geräte und Programme

- Anova analysis
- ELISA-Reader, SLT 400 ATX
- Fotoapparat, Nikon D100
- Handspaltlampe SL-15, KOWA, Japan
- JMP® (version 9.0.0 oder 10.0.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)
- Kamera am Mikroskop Axiocam MRC Zeiss
- Magnetrührer, Heidolph, Reax 1R
- Magnetrührer, Heidolph; REAX 1R
- Mikroskop Zeiss Axioskop 50
- Operationsmikroskop, Carl Zeiss, OPMI CS-XY
- Schiötz-Tonometer, J. Winter
- Sterile Arbeitsbank, Microflow Biological Safety Cabin, Nunc
- Tonopen XL; Medtronic Solan, Jacksonville, FL Waage, Sartorius LA 120S
- Tukey-Kramer post hoc test
- Wasserbad, GFL
- Zeiss Axiocam
- Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 135, Zeiss
- Zellkulturschrank/CO₂-Inkubator, Heraeus
- Zentrifuge, Heraeus Biofuge fresco

2.1.4 Nährmedien

Das Nährmedium für die Tenonfibroblasten wurde aus 500ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 50 ml fetalem Kälberserum (FCS) und 5 ml einer 1:1 mit 0,9 % NaCl verdünnten Antibiotikallösung aus Penicillin und Streptomycin

cin (P/S) hergestellt. Sowohl dieses als auch das für den Migrationsassay benötigte Assay Medium (DMEM + 0,1 % Bovine Serum Albumine (BSA) + 1 % P/S) wurden als Medium während den Zellkultur-Versuchen verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Der tierexperimentelle Teil der Evaluation zur Hemmung der Narbenbildung nach Trabekulektomie durch CLT-28643 im Vergleich zu MMC und Placebo wurde in einer doppelt-blinden Studie an 24 Kaninchen durchgeführt. Die vier Operationstage wurden an vier aufeinanderfolgenden Montagen durchgeführt. An jedem dieser Tage wurden jeweils zwei Tiere einer Versuchsgruppe, insgesamt also sechs Tiere, operiert. Jedes zweite Tier erhielt die Trabekulektomie-Operation beidseits, wobei das linke Auge keine antifibrotische Therapie erhielt. Sämtliche Operationsschritte wurden von einem einzigen, erfahrenen Operateur (Prof. Dr. med. Martin Spitzer) durchgeführt, der stets vom selben Ophthalmochirurgen (Dr. med. Maximilian Schultheiß) assistiert wurde.

2.2.1.1 Vorgehen innerhalb der Versuchsgruppen

Die rechten Augen der Kaninchen wurden in drei Gruppen à acht Augen unterteilt. An allen rechten Augen wurde eine Trabekulektomie (s. 2.2.1.2) durchgeführt. Hierbei wurde intraoperativ ein mit Placebo bzw. MMC getränktes Schwämmchen für zwei Minuten unter der Bindehaut im Bereich des Filterkissens appliziert und die Bindehauttasche anschließend intensiv gespült. Zudem erfolgte eine subkonjunktivale Placebo- bzw. CLT-28643-Injektion. Anschließend wurden die Augen einen Monat lang viermal täglich mit CLT-28643- bzw. Placebo (BSS)-Augentropfen getropft.

Die rechten Augen erhielten entsprechend ihrer Gruppenzuteilung folgende Behandlungen:

Bei der MMC-Gruppe wurde intraoperativ ein mit 0,04 %-iger MMC-Lösung getränktes Schwämmchen für zwei Minuten unter der Bindehaut im Bereich des

Filterkissens appliziert. Am Ende der Operation erfolgte subkonjunktival eine Placebo-Injektion. Postoperativ wurden viermal täglich Placebo-Augentropfen appliziert.

An den Augen der CLT++ Gruppe erfolgte eine Trabekulektomie mit intraoperativer Applizierung eines mit Placebo getränkten Schwämmchens unter die Bindehaut. Am Ende der Operation erfolgte subkonjunktival eine CLT-28643-Injektion. Postoperativ wurden viermal täglich CLT-28643-Augentropfen verabreicht.

In der CLT+ Gruppe erfolgte eine Trabekulektomie mit intraoperativer Applizierung eines mit Placebo getränkten Schwämmchens unter die Bindehaut. Am Ende der Operation erfolgte subkonjunktival eine CLT-28643-Injektion. Postoperativ wurden viermal täglich Placebo-Augentropfen verabreicht.

Die linken Augen der Kaninchen wurden in zwei Untergruppen à zwölf Augen unterteilt (Kontrolloperations- und unbehandelte Gruppe).

In der Kontroll-OP-Gruppe erfolgte eine Trabekulektomie ohne adjuvante intraoperative Medikation, jedoch mit postoperativer Applikation von Placebo-Augentropfen.

In der unbehandelten Gruppe erfolgte sowohl kein operativer Eingriff als auch keine Tropfenapplikation.

2.2.1.2 Trabekulektomie

Die Trabekulektomie erfolgte am narkotisierten Kaninchen unter Rompun-Ketanest Narkose. Die Spontanatmung blieb dabei erhalten. Hierfür wurde Ketamin und Xylazin intramuskulär in folgender gewichtsadaptierter Dosierung injiziert: Für die Narkose vor der Trabekulektomie und vor der Tötung der Tiere erfolgte die Dosierung mit 25 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 2 mg/kg Körpergewicht Xylazin. Wenn notwendig, wurde nach einer halben Stunde mit der halben Dosis nachgespritzt. Für die Sedation erfolgte die Dosierung mit 12,5

mg/kg Körpergewicht Ketamin und 1 mg/kg Körpergewicht Xylazin. Auch hier erfolgte das Nachspritzen nach einer halben Stunde mit der Hälfte der Dosis. Entsprechend der Operation am menschlichen Auge wurde die Bindehaut mit 5 mm Abstand zum Limbus in Höhe von zwölf Uhr etwa 7 mm weit eröffnet. Die Blutungen wurden mit Hilfe von Diathermie gestoppt. Innerhalb der so geschaffenen Bindehauttasche wurden mit MMC oder Placebo getränkte Schwämmchen für zwei Minuten platziert und anschließend wieder entfernt. Anschließend wurde der Bindehautsack ausgiebig mit PBS gespült. Die Präparation des 3x3 mm Skleraläppchens erfolgte in halber Skleradicke. Daraufhin erfolgten die Trabekulektomie mit Hilfe eines Trepanns mit einem Durchmesser von 1,2 mm sowie die periphere Iridektomie. An den Enden des Skleraläppchens wurden 10.0 Nylonnähte vorgelegt. Anschließend konnten die Nylonnähte geknüpft und die Konjunktiva mit einem 8.0 Vicrylfaden genäht werden. Als letzter Schritt schloss sich je nach Versuchsgruppe eine subkonjunktivale Injektion des Filterkissens mit CLT-28643 oder Placebo an.

2.2.1.3 Postoperative Untersuchungen

Zur Verlaufsbeobachtung und postoperativen Kontrolle wurden sowohl präoperativ als auch postoperativ am 1., 3., 5., 7., 10., 14., 17., 21., 24. und 28. Tag folgende Untersuchungen durchgeführt: Intraokulare Druckmessung mittels dem Tonopen unter vorheriger Applikation von anästhesierenden Augentropfen (Conjuncaïn) sowie die Beurteilung des Filterkissens nach den Kriterien des „Würzburg Bleb Classification Score“ (WBCS) (s. Tabelle 2) [62]. Zudem wurde der vordere Augenabschnitt mit Hilfe einer Handspaltlampe mit besonderem Augenmerk auf die Tiefe und mögliche Entzündungszellen in der Vorderkammer sowie auf das Ausmaß der Vaskularisation und der Abflusszone des Filterkissens hin untersucht.

Tabelle 2: Würzburg Bleb Classification Score zur Beurteilung des Filterkissens nach der Trabekulektomie [62]

Vaskularisation	0 = avaskulär	3 Punkte
	1 = gleich zur Umgebung	2 Punkte
	2 = stärker	1 Punkt
	3 = massiv	0 Punkte
Korkenziehergefäße	0 = keine	3 Punkte
	1 = in einem Drittel	2 Punkte
	2 = in zwei Dritteln	1 Punkt
	3 = im gesamten Filterkissen	0 Punkte
Mikrozysten	0 = keine	0 Punkte
	1 = über dem Skleralflap	1 Punkte
	2 = auf einer Seite des Filterkissens	2 Punkte
	3 = im gesamten Filterkissen	3 Punkte
Einkapselung des Filterkissens	0 = keine	3 Punkte
	1 = in einem Drittel	2 Punkte
	2 = in zwei Dritteln	1 Punkt
	3 = im gesamten Filterkissen	0 Punkte

Die obengenannten Untersuchungen wurden am 3., 7., 14., 21. und 28. postoperativem Tag mit einer genaueren Druckmessung, welche mit einem Schiötz-Tonometer durchgeführt wurde, sowie durch Photographien des Filterkissens zur Dokumentation ergänzt. Für diese zusätzlichen Untersuchungen war eine Sedierung notwendig.

2.2.1.4 E nukleation und Vorbereitung für die Histologie

Nach einem Monat erfolgte die Tötung der zuvor narkotisierten Tiere mit intrakardialer Injektion von T61 und anschließender E nukleation. Um die Präparate in der Histologie besser aufbereiten zu können, wurde eine Stelle in der Cornea, möglichst nahe der Iridektomie, mit einem 7.0 Vicrylfaden markiert. Die Augen wurden in 4,5 %-igem Formaldehyd mindestens 24 Stunden lang fixiert und anschließend histologisch aufbereitet.

2.2.2 Histologie

Die in Formaldehyd gelagerten Augen wurden mittels einem Sagittalschnitt halbiert. Anschließend wurden die Gewebeproben getrocknet, in Paraffin eingebettet und in mehrere aufeinanderfolgende 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden rehydriert und mit Hämatoxylin und Eosin (H&E-Färbung) angefärbt. Hierfür waren mehrere Folgeschnitte notwendig bis die Operationsstelle der Trabekulektomie exakt identifiziert werden konnte. Weitere aufeinanderfolgende Schnitte wurden angefertigt. Diese Schnitte wurden entweder mit der H&E-Färbung, der Masson Trichrom-Färbung oder immunhistochemischen Färbungen analysiert. Die histologischen Präparate wurden anhand des Perkin Scores (s. Tabelle 3) ausgewertet [63].

Tabelle 3: Perkin Score zur Beurteilung der histologischen Präparate [63]

Subkonjunktivale Kollagendichte	0 = keine Veränderung
	1 = minimale Veränderung
	2 = schwache Veränderung
	3 = mäßige Veränderung
	4 = starke Veränderung
Vaskularisation/Gefäßstrukturen	0 = keine Blutgefäße
	1 = ein bis fünf Blutgefäße
	2 = sechs bis zwanzig Blutgefäße
	3 = mehr als zwanzig Blutgefäße

Fibrosierung innerhalb des Skleraspalts durch die Operation	0 = keine Fibrosierung
	1 = schwache Fibrosierung
	2 = mäßige Fibrosierung
	3 = starke Fibrosierung

Zusätzlich wurde die durchschnittliche Anzahl an Becherzellen innerhalb des Bindehautepithels manuell ausgezählt.

Für die Integrin- und SMA-Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und danach erfolgten diverse Vorbehandlungen. Die Präparate wurden für 20 Minuten entweder gekocht oder auf 91 °C erwärmt oder mit Pronase und Proteinase K vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Färbung für 30 Minuten bei Raumtemperatur (Konzentrationen: α -SMA antibody 1:100, 1:500, 1:800 und α 5 β 1-integrin antibody 1:50, 1:100, 1:500). Zum Schluss erfolgte die Kontrastfärbung mit Hämatoxylin III für eine Minute.

Das Kochen der Präparate zur Vorbereitung für die immunhistochemische Färbung zerstörte die Sklera der Operationsstelle. Das Erwärmen der Schnitte auf 91 °C und die Vorbehandlung der Schnitte mit Pronase oder Proteinkinase K führte zwar zu einem besseren Erhalt des Gewebes, die anschließenden Färbungen führten dennoch nicht zu einem zufriedenstellenden Ergebnis. Auch die Verwendung von höheren Konzentrationen der Antikörperlösungen führte zu keiner besseren immunhistochemischen Färbung der Schnitte.

Zur Dokumentation wurden jeweils von der Operationsstelle aller Augen in unterschiedlichen Vergrößerungen repräsentative Photographien in sämtlichen Färbungen angefertigt.

2.2.3 Zellkulturversuche

2.2.3.1 Zellkultur und Kultivierung

Die humanen Tenonfibroblasten wurden von Patienten unterschiedlichen Alters unter vorheriger Zustimmung der Patienten in der Universitätsaugenklinik Tü-

bingen entnommen. Kultiviert wurden die Tenonfibroblasten in dem oben beschriebenen Nährmedium (DMEM, Fetales Kälberserum, Penicillin / Streptomycin) im Zellkulturschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Die bei diversen Operationen gewonnenen Tenonfibroblasten wurden in Zellkulturflaschen im Zellkulturschrank kultiviert. Nach einigen Wochen waren Zellausläufer unter dem Mikroskop ersichtlich und der Boden konfluent bewachsen. Zur Vermehrung und zum Erhalt der Kulturen war es nötig, eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle sowie für optimale Lebensbedingungen einen wöchentlichen Mediumwechsel mit 20 ml frischem Medium durchzuführen. Unter dem Mikroskop waren die Tenonfibroblasten als spindelförmige, längliche Zellen erkennbar. Durch die regelmäßige mikroskopische Kontrolle konnten Zelldichte, Konfluens und Morphologie der Zellen bestimmt werden.

Wurde ein konfluentes Wachstum der Zellen erreicht, so wurden die Zellen gesplittet. Hierbei wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen mit 20 ml sterilem Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen und das PBS anschließend wieder abgesaugt. Durch Hinzugabe und einminütiger Inkubation von 1 ml Trypsin-EDTA Lösung (Trypsin) lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche und konnten vorsichtig abgeklopft werden. Die Lysierung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Die gelösten Zellen wurden mit 19 ml frischem Medium resuspendiert und jeweils 5 ml der so entstandenen Lösungen in vier neue Kulturflaschen gefüllt. In jede der neuen Kulturflaschen wurden anschließend 15 ml frisches Medium hinzugegeben, um die Ursprungsmenge des Nährmediums von 20 ml pro Kulturflasche zu erreichen. Innerhalb von zwei bis drei Wochen waren die Böden der Kulturflaschen erneut konfluent bewachsen, so dass die Zellen für die Versuche verwendet werden konnten bzw. erneut gesplittet werden mussten.

2.2.3.2 Aussäen der Zellen in eine 96-Well-Platte

Für die Versuchsreihen wurden ausschließlich Tenonfibroblasten verwendet, die konfluent gewachsen waren und sich meist zwischen der zweiten und fünften Passage befanden. Die Kultur wurde - wie bereits oben beim Splitten der

Zellen beschrieben - mit PBS gewaschen und mittels Trypsin vom Boden abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit 19 ml frischem Medium resuspendiert und gut gemischt. Mit einer Neubauer-Zählkammer konnte die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt werden. Die Lösung wurde auf eine Konzentration von 10^5 Zellen/ml verdünnt, so dass 10^4 Zellen/Well (100 μ l/Well) auf 96-Well-Platten ausgesät werden konnten. Um Abweichungen durch Verdunstung zu vermeiden, wurden die äußeren Wells der Platten jeweils mit 100 μ l frischem Medium befüllt. Die Platten wurden anschließend im Zellkulturschrank inkubiert und nach 24 Stunden das Anwachsen der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Um verschiedene Konzentrationen des CLT- und Placebo-Wirkstoffes vergleichen zu können, wurde ebenfalls nach 24h jeweils eine Verdünnungsreihe für folgende Konzentrationen erstellt: 1:5, 1:10, 1:15, 1:50 CLT bzw. Placebo. Das Medium vom Vortag wurde unter Beibehalten der Zellen in den Wells vorsichtig abgesaugt. Danach erfolgte die Zugabe von 100 μ l/Well von der jeweiligen verdünnten CLT- bzw. Placebolösung. Dabei wurde jeder Spalte eine separate Konzentration zugewiesen, so dass sechs Wells (n=6) pro Spalte - also pro Konzentration - ausgewertet werden konnten. Eine Spalte der Platte diente als Kontrolle. Hierbei wurde lediglich das Medium abgesaugt und 100 μ l/Well frisches Medium auf die angewachsenen Zellen gegeben.

2.2.3.3 MTS-Test

Die quantitative Analyse des Wachstums und der Vitalität der Tenonfibroblasten erfolgte kolorimetrisch mit einem Dimethylthiazol-carboxymethoxyphenylsulfophenyl-tetrazolium-Assay (MTS-Assay). Hierfür verwendeten wir folgendes Kit: Promega CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent. Die mitochondrialen Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen sind in der Lage, in Anwesenheit eines elektronenbindenden Stoffes wie PES (Phenazin-Ethosulfat) das in der Assaylösung vorhandene MTS-Reagenz in ein Formazan-Produkt zu reduzieren. Durch die Absorption des farbigen Formazans bei 490 nm im ELISA-Reader kann die Zellviabilität indirekt bestimmt werden, da die Umsetzung des MTS nur bei intakter Atmungskette möglich ist. Dazu werden von den bei 490 nm gemessenen Absorptionswerten die speziellen Absorptionswerte von 690

nm (Hintergrundabsorption) subtrahiert. Hierdurch erhält man diejenige Absorption, welche durch die Formazan-Produktion hervorgerufen wird [64]. Das quantitative Ergebnis gibt durch den messbaren Verlust an vitalen Zellen indirekt Auskunft über den zytotoxischen Effekt der untersuchten Substanzen.

Gemäß den Herstellerangaben (www.promega.com) wurden am ersten, dritten und fünften Tag nach Aussäen der Zellen 20 µl der Assaylösung in jedes Well pipettiert. Nach 90 Minuten Inkubationszeit im Zellkulturschrank erfolgte die photometrische Messung bei 490 nm, 690 nm (Hintergrundabsorption) und der Delta OD wurde entsprechend den obigen Angaben berechnet. Pro Konzentration/Kontrolle erfolgte an jedem Tag eine 6-fache Durchführung des Tests, so dass Mittelwert und Standardabweichung berechnet werden konnten. Die Werte der Kontrollgruppe wurden als 100 %-ige Viabilität definiert und die Werte der anderen Gruppen dazu in Relation gesetzt.

Um die Zellen für den darauffolgenden Kristallviolett-Test zu fixieren, wurde im Anschluss an den MTS-Test das Medium von der Platte abgeklopft und 100 µl 4 %-iges Paraformaldehyd (PFA) in jedes Well pipettiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen drei Mal mit 200 µl vollentsalztem Wasser (VE-Wasser)/Well gewaschen. Beim letzten Waschgang wurden 200 µl VE-Wasser in den Wells belassen und die mit Parafilm versiegelten Platten im Kühlschrank aufbewahrt, bis die Kristallviolett-Färbung durchgeführt wurde. Erfolgte die Kristallviolett-Färbung direkt nach dem MTS-Test, so mussten die Zellen lediglich mit VE-Wasser gewaschen, jedoch nicht mit PFA fixiert werden.

2.2.3.4 Kristallviolett-Test

Durch den Kristallviolett-Test kann die Anzahl an adhärent wachsenden Zellen bestimmt werden. Da nur lebende Zellen die Eigenschaft der Adhärenz aufweisen, lösen sich die bereits abgestorbenen Zellen beim Waschgang vor der Kristallviolett-Färbung ab und werden ausgewaschen. Der Kristallviolett-Test gibt also anhand des Ausmaßes der gefärbten Zellen eine quantitative Aussage über die Anzahl der lebenden Zellen. Die Messung erfolgte nach Lyse der Zellen am Photometer [65].

Der Kristallviolett-Test wurde sowohl im Anschluss des MTS- sowie des Adhäsions-Assays durchgeführt.

Für den Kristallviolett-Test wurde das VE-Wasser aus den Platten abgeschüttet und 100 µl Crystal Violet Solution (Kristallviolettlösung) in jedes Well pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgeschüttet und wiederum drei Mal mit 200 µl VE-Wasser/Well gewaschen, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Beim letzten Waschdurchgang wurde das Wasser mittels einer Pumpe vorsichtig abgesaugt. Anschließend erfolgte eine Lyse der Zellen mittels 100 µl 1 %-ige SDS-Lösung pro Well, welches 60 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Dadurch wurde der Farbstoff von den Zellen freigesetzt. Die Absorption wurde danach bei 595 nm am Fotometer gemessen. Aus den sechsfachen Messungen pro Konzentration/Kontrolle wurde der jeweilige Mittelwert inklusive Standardabweichung berechnet und die Kontrolle als 100 % definiert. Um bei der Auswertung die Werte vergleichen zu können, wurden die anderen Mittelwerte dazu in Bezug gesetzt.

2.2.3.5 Caspase 3/7-Assay

Mittels dem Caspase-Assay „Caspase-Glo 3/7 Assay Kit, Promega“ kann die Aktivität der intrazellulären Cystein-Aspartat-Proteasen (Caspasen) 3 und 7 gemessen werden. Diese gehören zu den Effektorcaspasen, deren Vorläufer von den Initiatorcaspasen (2, 8, 9, 10) aktiviert werden [66]. Im Rahmen der physiologisch in den Zellen ablaufenden Apoptose wird eine Kaskade von Caspasen aktiviert, die Zellproteine spalten.

In unserem Versuchsansatz wird durch Zugabe des Caspase-Assays eine Zelllyse initiiert und somit die Caspasen freigesetzt. Basierend auf der Abspaltung des Aminoluciferin von der Tetrapeptidsequenz DEVD (Aspartat-Glutamin-Valin-Aspartat), die einen spezifischen Angriffspunkt für die Caspasen 3 und 7 darstellt, kann die Caspasenaktivität bestimmt werden. Das von den Peptiden getrennte Aminoluciferin kann nun wiederum von der Luciferase als Substrat zur Erzeugung eines Lumineszenzsignals verwendet werden. Die Stärke der erzeugten Lumineszenz steht in Korrelation zur Anzahl der aktivierten Caspa-

sen, so dass eine Aussage über das Ausmaß der Apoptose getroffen werden kann.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 10^4 Zellen/Well auf 96-Well-Platten, wie bereits im Kapitel 2.2.3.2 erläutert, ausgesät. Jede Konzentration bzw. die Kontrolle konnte in sechsfacher Ausführung ($n=6$) getestet werden. Für die Durchführung des Caspaseassays wurden 100 μ l der Caspaseassaylösung in jedes Well pipettiert. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur, bevor die Lumineszenz am Fotometer bei verschiedenen Sensitivitäten (100, 125, 150, 175) gemessen werden konnte. Ausgewertet wurde diejenige Sensitivität, bei der alle Konzentrationen vollständig erfasst wurden. Durch die mehrfache Wertbestimmung pro Konzentration ($n=6$) konnten die Mittelwerte mit Standardabweichungen bestimmt werden. Auch beim Caspase-Assay wurde der Kontrollwert als 100 % definiert und die anderen Werte dazu in Bezug gesetzt.

Um eine Positivkontrolle für den Caspase-Test durchzuführen, wurden in einem neuen Ansatz zusätzlich zur Caspaselösung verschiedene Konzentrationen von Staurosporin bzw. Trichostatin A zugefügt. Staurosporin als Proteinkinaseinhibitor und Trichostatin A als Histon-Deacetylase-Inhibitor induzieren die Apoptose. Staurosporin wurde in einer Verdünnung von 3.000 nM, 900 nM, 600 nM und 300 nM, Trichostatin A in einer Verdünnung von 10.000 nM, 3.000 nM, 2.000 nM und 1.000 nM zugefügt.

2.2.3.6 Migrations-Assay

Der Migrationsassay zeigt den Einfluss von CLT-28643 bzw. Placebo auf die durch basic fibroblast growth factor (bFGF) induzierte Migration der Tenonfibroblasten. Sowohl Migration als auch Adhäsion (s. 2.2.3.7) werden hauptsächlich durch Interaktionen zwischen Fibronectin (FN) und FN-spezifischem $\alpha 5\beta 1$ -Integrin hervorgebracht [67].

Die Migration wurde anhand folgender Gruppen getestet: CLT bzw. Placebo in folgenden Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:15, 1:50, Kontrolle + bFGF, Kontrolle – bFGF und ein background, der weder beschichtet noch geblockt wurde. Die

Durchführung dieses Assays orientiert sich im Wesentlichen an der Veröffentlichung von Zahn et al. [67].

Für den Migrations-Assay wurden folgende Versuchsplatten verwendet: 8 µm pore HTS FluoroBloc Multiwell Inserts System, BD Bioscience Falcon. Zur Vorbereitung wurden 24 Stunden vor Beginn des Assays die Unterseiten der Filter für die Migration der Zellen mit jeweils 20 µl des auf 10 µg/ml verdünnten Fibronectins (FN) beschichtet. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte das Blocken mit jeweils 20 µl des 2 %-igen Bovine Serum Albumine (BSA) in 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Unbeschichtet blieben allerdings die Filter für die background-Gruppe. Aufgrund der Größe der FluoroBloc-Platten konnten jeweils drei Wells einer Gruppe zugeordnet werden (n=3), anhand dessen Mittelwert und Standardabweichung für die jeweilige Gruppe berechnet werden konnte.

Ebenfalls 24 Stunden vor Beginn des Assays ließen wir die Zellen „hungern“. Hierfür wurde in den Kulturflaschen das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 20 ml Assay Medium (DMEM + 0,1 % BSA + 1 % P/S) pro Flasche hinzugegeben.

Zu Beginn des Assays wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und mit normalem Nährmedium versorgt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation unter 800 rpm (Zentrifuge, Heraeus Biofuge fresco) für fünf Minuten, woraufhin der Überstand abgesaugt werden konnte. Nach der Wiederaufnahme der Zellen in PBS wurden die Zellen in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Zelllösung wurde auf eine Zelldichte von $4,1 \times 10^4$ Zellen pro 250 µl, d.h. $1,64 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Es folgte eine erneute Zentrifugation mit anschließendem Absaugen des Überstandes. Die Zellen wurden anschließend in Assay Medium resuspendiert.

Ziel war es, die Inserts mit 500 µl Lösung (Zellen plus die jeweilig verdünnte Substanz von CLT/Placebo) zu füllen. Die Wells selbst sollten mit 1000 µl Lösung (Assay Medium, 10 ng/ml bFGF und die jeweilig verdünnte Substanz) gefüllt werden. Die Wells und die Inserts für die Kontrollgruppe „Kontrolle + bFGF“ wurden wie oben beschrieben befüllt - mit der Ausnahme, dass keine verdünnte CLT/Placebo-Lösung hinzugegeben wurde. Für die Kontrollgruppe „Kontrolle -

bFGF“ wurde zusätzlich zu den verdünnten CLT/Placebo-Lösungen auch der bFGF-Zusatz weggelassen. Für die Background-Gruppe erfolgte die Zusammenstellung der Lösungen entsprechend der Gruppe „Kontrolle + bFGF“. Hierbei wurden jedoch – wie sonst normalerweise bei der Background-Gruppe nicht üblich – Zellen verwendet. Die Migration erfolgte für fünf Stunden im Zellkulturschrank.

Die Immunfluoreszenz wurde mit einer Calcein- und DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)-Färbung durchgeführt. Calcein Acetoxymethylesterderivat (Calcein AM) ist ein Fluoreszin-Derivat, das durch seine lipophilen Eigenschaften durch die Zellmembranen in die Zellen gelangen kann. Dort wird es von Esterasen in Calcein umgewandelt und bildet mit dem intrazellulären Kalzium Komplexe, so dass es membranundurchlässig wird. Erst durch die Hydrolyisierung fluoresziert das Calcein, welches als Calcein-AM als farbloses Reagenz vorlag. Da Esterasen nur in vitalen Zellen synthetisiert werden können, stellt die Calceinfärbung eine Lebendfärbung da.

DAPI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich an die DNA anlagert und somit Zellkerne anfärbt. DAPI besitzt ein Emissionsmaximum von 461 nm und liegt somit im kurzwelligen (blauen) Bereich des sichtbaren Lichts. Dies hat den Vorteil, dass zusätzlich weitere Immunfluoreszenzen verwendet werden können, ohne dass sich die Signale überschneiden.

Für die Calceinfärbung wurden die Lösungen (Assay Medium, mit bzw. ohne bFGF und die jeweilig verdünnte Substanz) abgeschüttet und mit 1 ml Calcein (4 μ M Calcein in PBS) pro Well für 30 Minuten im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend wurde die Calcein-Lösung wieder abgeschüttet, ohne jedoch die Wells zu spülen, und mit 1 ml PFA pro Well für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln für die DAPI-Färbung fixiert. Daraufhin wurde das PFA abgeschüttet, 1 ml PBS in jedes Well gefüllt und wieder abgeschüttet. Von der DAPI-Reagenz wurde 1 ml in jedes Well pipettiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend konnte die Lösung abgeschüttet und die Wells mit PBS befüllt werden, um die Zellen vor Austrocknung zu schützen.

Die Fluoreszenz-Messung konnte nun bei 485 und 538 nm am Fotometer vorgenommen werden. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 135, Zeiss) wurden repräsentative Bilder für die jeweilige Färbung entsprechender Beleuchtung angefertigt. Bei 10-facher Vergrößerung wurde jeweils ein Bild für die DAPI- und eines für die Calceinfärbung aufgenommen, welche anschließend übereinander gelagert wurden.

2.2.3.7 Adhäsions-Assay

Mittels des Adhäsions-Assays kann der Einfluss von Substanzen auf die Adhäsion der Zellen evaluiert werden. Die Durchführung dieses Assays orientiert sich im Wesentlichen an der Veröffentlichung von Zahn et al. [67].

Für den Adhäsions-Assay wurden normale 96-Well-Platten entsprechend dem Migrations-Assay 24 Stunden vorher mit Fibronectin beschichtet und mit BSA geblockt.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, vom Untergrund mit 1 ml cell dissociation solution gelöst und in 20 ml Medium (DMEM + P/S, jedoch ohne FCS) aufgenommen. Nach dem Zählen der Zellen mittels der Neubauer Zählkammer wurden die Zellen unter 800 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert (Zentrifuge, Heraeus Biofuge fresco). Der Überstand an Medium wurde abgesaugt und die Zellen entsprechend der gewünschten Konzentration von 5×10^4 Zellen/Well, bzw. 5×10^5 Zellen/ml erneut in oben beschriebenem Medium dissoziiert. In jedes Well wurden 200 μ l in der jeweiligen Verdünnung der Substanzen gelöste Zellen pipettiert. Die Platten wurden anschließend für 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

Um die Zellzahl der lebenden, adhärenen Zellen zu ermitteln, schloss sich darauf eine Kristallviolett-Färbung an. Die Vorgehensweise hierfür ist im Kapitel „Kristallviolett-Test“ auf S. 32 nachzulesen.

2.2.4 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der durchgeführten Tests berechnet und in ein Diagramm übertragen. Die

computerbasierte Auswertung wurde mit Hilfe von JMP® (version 9.0.0 or version 10.0.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Mittels ANOVA analysis, Dunnett und Tukey-Kramer post hoc test wurden Unterschiede zwischen den Gruppen getestet. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

Für die statistische Auswertung des Überlebens der Filterkissen wurde der Log-Rang-Test verwendet, auf dessen Basis die Kaplan-Meier-Kurven erstellt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Tierversuche

3.1.1 Präoperative Beurteilung

In der präoperativen Untersuchung mittels Handspaltlampe konnte in allen Augen eine regelrechte Vorderkammeranatomie festgestellt werden. Der Befund ergab eine normal tiefe Vorderkammer, reizfreie Konjunktiven, sowie klarbrechende optische Medien. In der Funduskopie waren eine regelrechte Retina, sowie ein gesunder N. opticus nachweisbar. Um den intraokularen Druck (IOP) zu messen, wurden sowohl der Tonopen als auch das Schiötz Tonometer verwendet. Präoperativ waren mit beiden Druckmessmethoden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar. In der MMC-Gruppe wurde ein präoperativer IOP von $16,0 \pm 2,3$, in der CLT+ Gruppe ein IOP von $17,3 \pm 4,0$, in der CLT++ Gruppe ein IOP von $18,9 \pm 2,6$, in der Kontroll-OP-Gruppe von $17,2 \pm 3,6$ und in der unbehandelten Gruppe ein IOP von $17,8 \pm 3,0$ ermittelt (Tabelle 4).

3.1.2 Intraoperativer Ablauf

Ein Tier starb kurz nach Beendigung der Trabekulektomie infolge der injizierten Anästhetika an respiratorischer Insuffizienz. Dieses Tier musste von unserer Studie ausgeschlossen werden. Am entsprechenden Tag erfolgte daher die Operation an sieben Tieren, wobei das siebte Tier nach demselben Protokoll wie das verstorbene Tier operiert und behandelt wurde. So konnte die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe aufrechterhalten werden. An keinem weiteren der Operationstage kam es zu schwerwiegenden Komplikationen. Es traten lediglich zwei kleinere Komplikationen auf: In zwei Augen kam es am Ende des Eingriffs zu einer ausgeprägten Vorderkammerblutung. Die betroffenen Augen resorbierten die Blutungen jedoch ohne erforderliche Behandlung oder weitere Komplikationen innerhalb weniger Tage. An beiden Augen wurde weder ein verfrühtes Versagen noch ein Verstopfen des Filterkissens beobachtet.

3.1.3 Postoperative Folgeuntersuchungen

3.1.3.1 Augeninnendruckmessungen

Beim Vergleich der mittels Schiötz-Tonometrie ermittelten durchschnittlichen Augeninnendruckwerte (IOP) ließ sich innerhalb der einzelnen Gruppen vergleichen mit dem jeweiligen präoperativen Ausgangswert Folgendes ermitteln:

In der unbehandelten Gruppe wurde ein präoperativer IOP von $17,8 \pm 3,0$ gemessen. Am 3. und 21. postoperativen Tag erfolgte ein statistisch signifikanter Werteabfall ($13,3 \pm 4,7$ und $12,6 \pm 2,8$) verglichen mit dem präoperativen IOP-Wert (Abbildung 4). Die IOP-Werte blieben auch an den restlichen Tagen niedriger als der Ausgangswert und bewegten sich zwischen 13,4 und 15,2.

In der MMC-Gruppe wurde an sämtlichen postoperativen Messungen ein statistisch signifikant niedriger IOP als am präoperativen Tag ($16,0 \pm 2,3$ mmHg) ermittelt (Abbildung 4). So schwankten die Werte zwischen dem 3. und 28. postoperativen Tag zwischen 5,9 und 10,2 (Tabelle 4, Abbildung 4).

Bei der CLT++ Gruppe ergab sich ein der MMC-Gruppe ähnlicher Verlauf. Der präoperativ ermittelte IOP lag bei $17,3 \pm 4,0$ (Tabelle 4). An sämtlichen postoperativen Messungen wurde ebenfalls ein zum präoperativen IOP-Wert statistisch signifikanter IOP-Abfall ermittelt (Abbildung 4). Hierbei lagen die Werte ab dem 3. postoperativen Tag zwischen 5,1 und 11,6 (Tabelle 4).

In der CLT+ Gruppe lag der präoperative IOP bei $18,9 \pm 2,6$ (Tabelle 4). Am 3. postoperativen Tag erfolgte ein statistisch signifikanter IOP-Abfall auf $5,1 \pm 3,4$ (Abbildung 4). Die IOP-Werte blieben bis einschließlich dem 21. postoperativen Tag statistisch signifikant niedriger als der Ausgangs-IOP-Wert und schwankten zwischen 5,1 und 9,3 (Abbildung 4). Am 28. postoperativen Tag betrug der IOP-Wert $15,1 \pm 3,8$ und war somit nicht mehr statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber dem präoperativen IOP-Wert (Tabelle 4).

In der Kontroll-OP-Gruppe wurde ein präoperativer IOP von $17,2 \pm 3,6$ gemessen (Tabelle 4). Ähnlich der CLT++ Gruppe lag ein statistisch signifikanter Wertebfall im Vergleich zum präoperativen IOP bis einschließlich dem 21. postoperativen Tag vor (Abbildung 4). Hierbei schwankten die Werte zwischen 7,1 und 13,2 (Tabelle 4). Am 28. postoperativen Tag betrug der gemessene IOP $14,8 \pm 3,2$ und war somit nicht mehr statistisch signifikant niedriger als der präoperativ gemessene IOP (Abbildung 4).

Beim Vergleich der operativen Gruppen mit der unbehandelten Gruppe konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden:

Am präoperativen Tag konnten zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Werte aller Gruppen bewegten sich zwischen 16,0 und 18,9 (Tabelle 4). Am 3. postoperativen Tag wiesen jedoch alle operativen Gruppen (MMC-, CLT+, CLT++, Kontroll-OP-Gruppe) einen statistisch signifikant niedrigeren IOP als die unbehandelte Gruppe auf. Am 7. postoperativen Tag wiesen die MMC-, die CLT+ und die Kontroll-OP-Gruppe einen statistisch signifikant niedrigeren IOP als die unbehandelte Gruppe auf. Während die unbehandelte Gruppe einen IOP von 13,4 hatte, bewegte sich der IOP der operierten Gruppen zwischen 7,3 und 9,5 (Tabelle 4). Am 14. postoperativen Tag erreichten lediglich die MMC- und die CLT+ Gruppe einen statistisch signifikant niedrigeren IOP als die unbehandelte Gruppe (unbehandelte Gruppe: 15,2, MMC-Gruppe: 6,6, CLT+ Gruppe: 9,1) (Abbildung 3). Nach dem 14. postoperativen Tag erreichte jedoch keine der operierten Gruppen einen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Gruppe mehr (Abbildung 3).

Insgesamt gesehen stieg der IOP der Kontroll-OP-Gruppe kontinuierlich schneller an als derjenige der antifibrotisch behandelten Studiengruppen, wenn auch nicht statistisch signifikant. Schon am 14. Tag lag der IOP der Kontroll-OP-Gruppe bei $11,7 \pm 4,0$, wohingegen die anderen operierten Gruppen Werte zwischen 6,6 und 10,1 erreichten (Tabelle 4). Auch am 21. Tag erreichte die Kontroll-OP-Gruppe mit $13,2 \pm 2,4$ den höchsten Wert unter den operativ behandelten Gruppen (Tabelle 4).

Den niedrigsten IOP am Studienende erzielte die MMC-Gruppe mit einem IOP von $10,2 \pm 2,0$ am 28. Tag. Dicht gefolgt vom IOP der CLT++ Gruppe mit $10,8 \pm 4,4$ (Tabelle 4). Der MMC-Wert war sowohl im Vergleich zum IOP der CLT+ Gruppe ($15,1 \pm 3,8$) als auch zum IOP der Kontroll-OP-Gruppe ($14,8 \pm 3,3$) statistisch signifikant niedriger (Tabelle 4). Den höchsten IOP wies die CLT+ Gruppe mit einem IOP von $15,1 \pm 3,8$ auf, der damit statistisch signifikant höher war als der der MMC-Gruppe (Tabelle 4).

Zusammenfassend erfolgte verglichen mit den präoperativen IOP-Werten in sämtlichen Gruppen ein zu Beginn der postoperativen Phase (3. postoperativer Tag) signifikanter Druckabfall (Abbildung 3). Am Ende der Verlaufsbeobachtung erzielten die CLT+ Gruppe, die unbehandelte Gruppe sowie die Kontroll-OP-Gruppe verglichen mit den jeweiligen präoperativen Ausgangswerten keinen signifikanten Druckminderungsunterschied (Abbildung 4). Im Gegensatz dazu erwies sich die Druckminderung in der MMC- und CLT++ Gruppe am 28. Tag immer noch als signifikant (Abbildung 4).

A

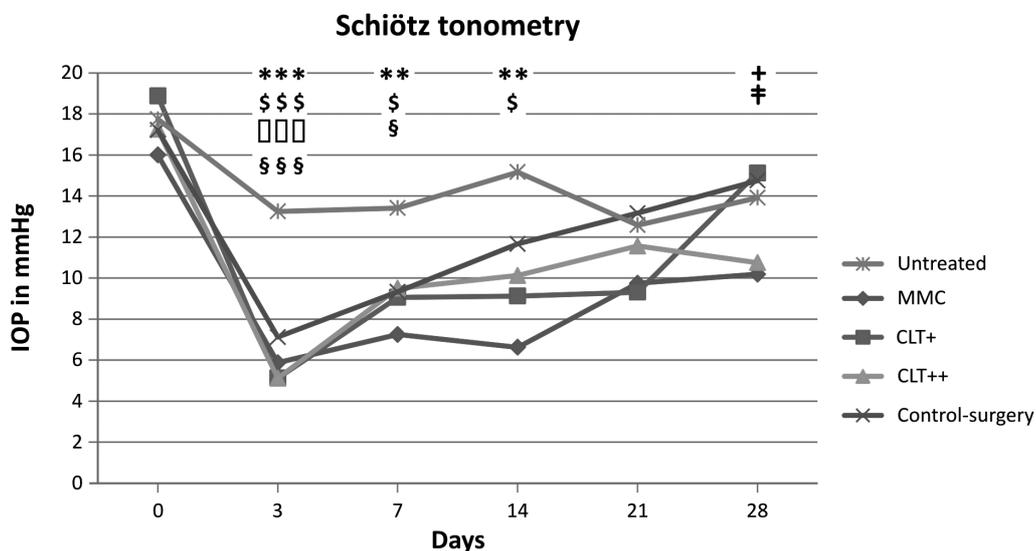


Abbildung 3: Die durchschnittlichen IOP-Werte aller Gruppen mit signifikanten Unterschieden der Werte zwischen den Gruppen an einzelnen Tagen, gemessen mit dem Schiötz Tonometer. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung im Graphen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ der MMC-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe; \$ $p < 0,05$ und \$\$\$ $p < 0,001$ der CLT+ Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe; □□□ $p < 0,001$ der CLT++ Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe; § $p < 0,05$ und §§§ $p < 0,001$ der Kontroll-OP-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe; + $p < 0,05$ der MMC-Gruppe im Vergleich zur CLT++ Gruppe und ‡ $p < 0,05$ der MMC-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe [68].

Tabelle 4: Durchschnitt IOP

Tag	0	3	7	14	21	28
MMC Gruppe	16.0± 2.3	5.9± 3.9	7.3± 3.9	6.6± 4.3	9.8± 4.9	10.2± 2.0
CLT+ Gruppe	18.9± 2.6	5.1± 3.4	9.1± 2.7	9.1± 5.1	9.3± 4.7	15.1± 3.8
CLT++ Gruppe	17.3± 4.0	5.1± 1.0	9.5± 2.4	10.1± 4.5	11.6± 3.0	10.8± 4.4
Kontroll-OP	17.2± 3.6	7.1± 3.5	9.3± 3.4	11.7± 4.0	13.2± 2.4	14.8± 3.2
unbehandelt	17.8± 3.0	13.3± 4.7	13.4± 3.3	15.2± 4.7	12.6± 2.8	13.9± 3.3

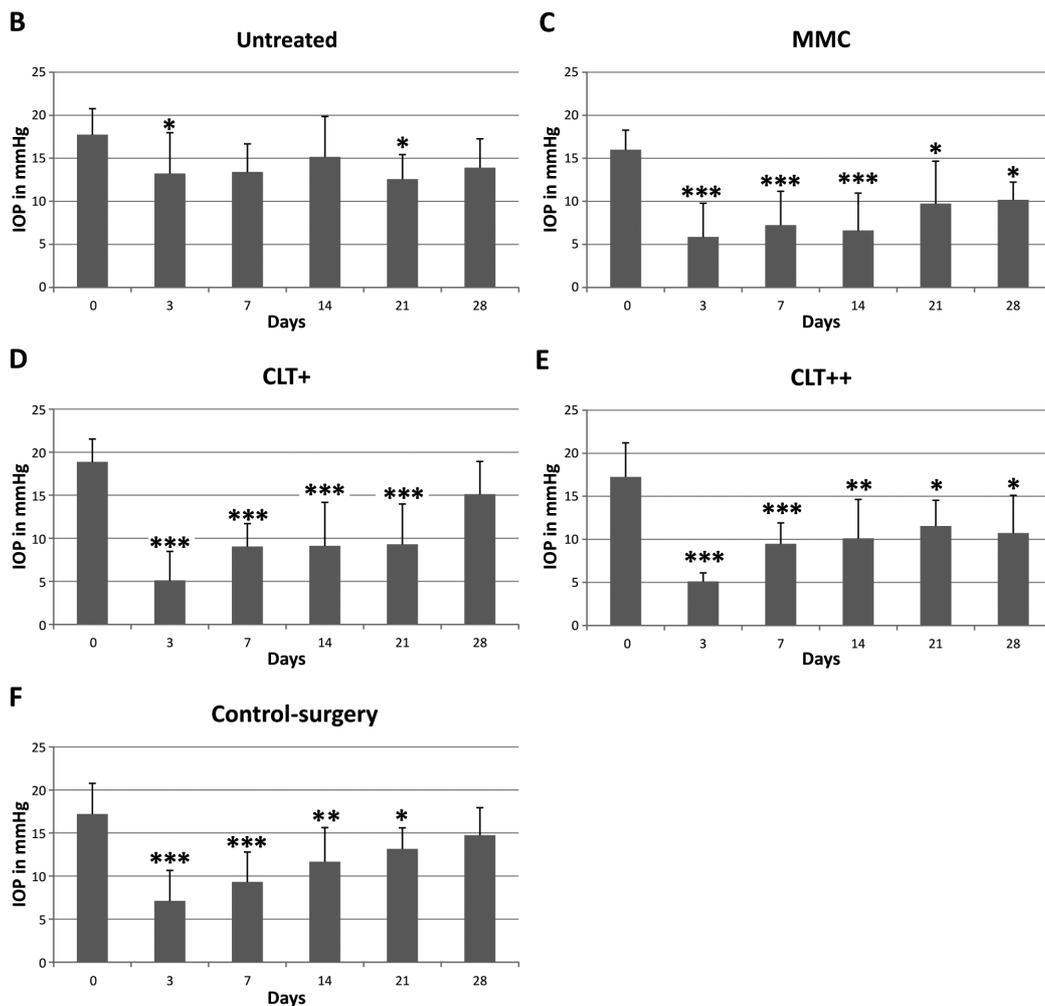


Abbildung 4: Die durchschnittlichen IOP-Werte aller Gruppen mit signifikanten Unterschieden der Werte zwischen den Gruppen im Vergleich zum durchschnittlich gemessenen IOP-Wert an Tag 0. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung in den Graphen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 im Vergleich zum präoperativen Druckwert [68].

Bei einer neuen statistischen Auswertung bestimmten wir den Delta-IOP. Dieser zeigt den Druckabfall als Differenz zwischen dem jeweils präoperativ gemessenen Druck (Nulllinie) und den an den verschiedenen Zeitpunkten gemessenen postoperativen Druckwerten an. Hieraus ergaben sich folgende Änderungen der Ergebnisse:

Der Effekt der Drucksenkung war in allen operativen Gruppen ähnlich. Zu beachten ist allerdings, dass auch die unbehandelte Gruppe ein gemindertetes Druckprofil während der Studie aufwies (Abbildung 5). Zwischen der Kontroll-OP-Gruppe und den anderen operativen Gruppen konnte zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Delta-IOP-Unterschied festgestellt werden. Lediglich am dritten postoperativen Tag zeigte sich ein signifikant niedrigerer Delta-IOP-Wert der unbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe (Abbildung 5).

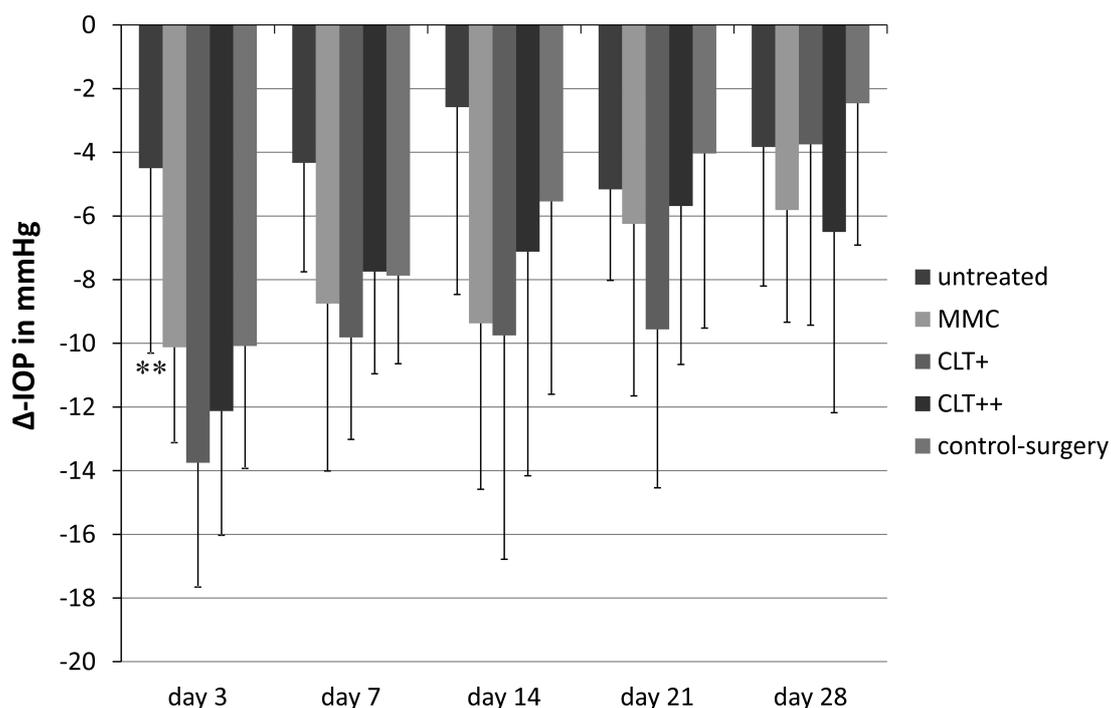


Abbildung 5: Delta-IOP-Levels aller Gruppen verglichen mit den präoperativen bestimmten IOP-Werten als Basislinie. ** $p < 0,01$ beim Vergleich der Kontroll-OP-Gruppe mit der unbehandelten Gruppe [68]

3.1.3.2 Überlebenszeit des Filterkissens

Bei der Analyse der Anzahl der funktionsfähigen Filterkissen über die Zeit zeigte sich, dass bei der Kontroll-OP-Gruppe bereits nach 5 Tagen, bei den beiden CLT-Gruppen nach 14 Tagen und bei der MMC-Gruppe nach 21 Tagen die ersten Sickerkissen verschlossen waren.

Im Detail betrachtet, sank bei der Kontroll-OP-Gruppe der prozentuale Anteil der noch funktionierenden Sickerkissen, der bis zum 3. postoperativen Tag noch bei 100 % lag, schon am 5. postoperativen Tag auf 83 % ab. Am 7. postoperativen Tag lag der Anteil bei 75 % und sank am 10. Tag auf 33 % ab (Abbildung 6). Bereits am 21. Tag war bei der Kontroll-OP-Gruppe keinerlei Filterkissen-Funktion mehr erhalten (Abbildung 6).

In der MMC-Gruppe waren bis einschließlich des 17. post-OP Tages alle Filterkissen funktionsfähig (Abbildung 6). Am 21. Tag verschlossen sich die ersten Filterkissen (87,5 %); am 28. Tag waren jedoch 75 % weiterhin funktionsfähig.

Der Anteil der funktionierenden Filterkissen in der CLT++ Gruppe war bis zum 10. postoperativen Tag 100 %-ig gegeben. Am 14. postoperativen Tag sank dieser auf 75 %, am 21. postoperativen Tag auf 50 % ab (Abbildung 6). Bei der letzten Verlaufskontrolle am 28. postoperativen Tag lag der Anteil nur noch bei 12,5 % (Abbildung 6).

Bei der CLT+ Gruppe war ebenfalls bis zum 10. postoperativen Tag ein 100 %-iger Anteil funktionierender Filterkissen feststellbar. Am 14. Tag sank dieser auf 87,5 %, am 17. Tag auf 75 %, am 21. Tag auf 62,5 % und am 24. Tag auf 50 % ab (Abbildung 6). Am letzten Tag der Verlaufskontrolle betrug der Anteil noch 25 % (Abbildung 6).

Im Vergleich der Gruppen wird ersichtlich, dass in der Kontroll-OP-Gruppe der Anteil funktionierender Filterkissen am schnellsten abnahm. Dieser betrug bereits am 10. postoperativen Tag nur noch 33 %, wohingegen alle anderen

Gruppen noch einen Anteil von 100 % besaßen (Abbildung 6). Die MMC-Gruppe konnte als einzige der Gruppen am letzten Tag der Verlaufsbeobachtung 75 % funktionierende Filterkissen aufweisen. Das zweitbeste Ergebnis an diesem Tag erreichte mit 25 % die CLT+ Gruppe (Abbildung 6).

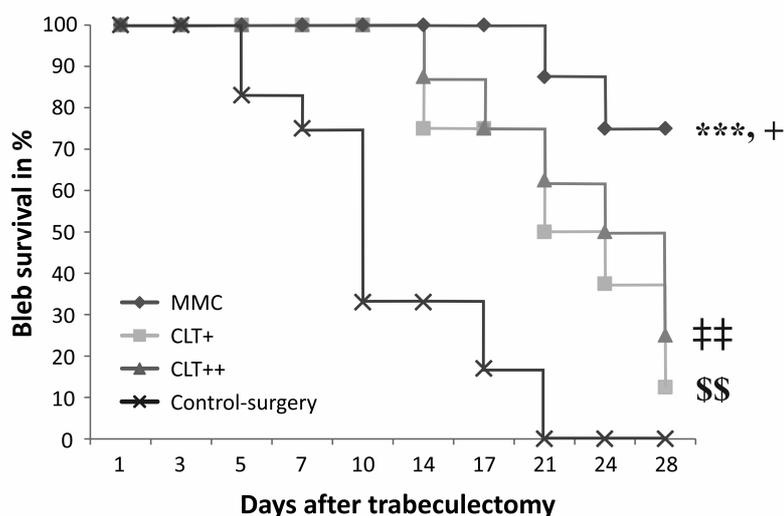


Abbildung 6: Die Kaplan-Meier Kurven zeigen die prozentuale Überlebenszeit der Filterkissen zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden folgendermaßen gekennzeichnet: MMC vs Kontroll-OP-Gruppe *** $p < 0,001$; MMC vs CLT+ Gruppe + $p < 0,05$; CLT+ vs Kontroll-OP-Gruppe \$\$ $p < 0,01$; CLT++ vs Kontroll-OP-Gruppe †† $p < 0,01$ [68].

In der MMC-Gruppe betrug die durchschnittliche Anzahl der Tage, in denen die Filterkissen funktionsfähig waren 25,8 Tage (Abbildung 7). Die CLT++ Gruppe erzielte hingegen nur 18,9 und die CLT+ Gruppe 20,8 Tage (Abbildung 7). Die durchschnittliche Funktionszeit der Filterkissen der Kontroll-OP-Gruppe betrug lediglich 9 Tage (Abbildung 7).

Im Vergleich der Gruppen untereinander konnte gezeigt werden, dass beide CLT-Gruppen ein signifikant längeres Überleben der Filterkissen im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe erreichten. Nichtsdestotrotz erwies die CLT+ Gruppe ein signifikant kürzeres Überleben verglichen mit der MMC-Gruppe (Abbildung 6). Allen Gruppen mit Zusatzmedikation (MMC-, CLT++, CLT+ Gruppe) ist jedoch gemeinsam, dass sie eine signifikant längere Überlebenszeit der Filterkissen als die der Kontroll-OP-Gruppe aufwiesen (Abbildung 6, Abbildung 7). Ein

Versagen der Filterkissen konnte zuerst in der Kontroll-OP-Gruppe (Tag 5), anschließend in den CLT-Gruppen (Tag 14) und zuletzt in der MMC-Gruppe (Tag 21) gesehen werden.

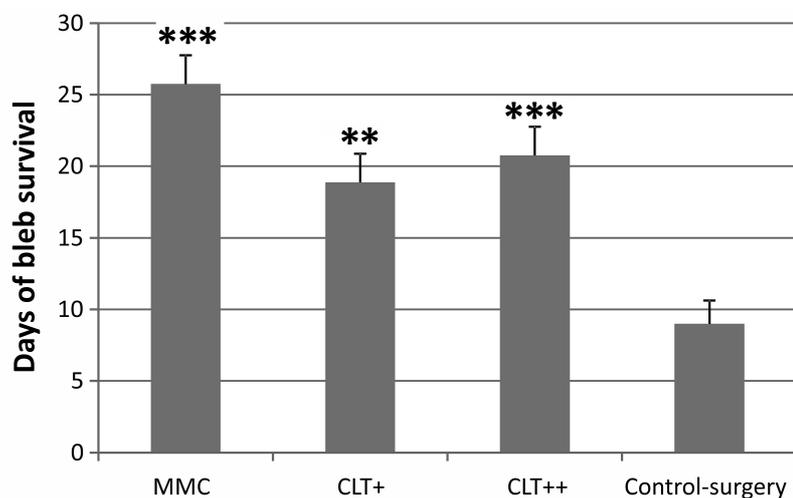


Abbildung 7: Das Säulendiagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl der Tage, in denen die Filterkissen der verschiedenen Gruppen funktionsfähig waren. Als Beobachtungszeitraum diente der gesamte Studienverlauf. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung im Säulendiagramm dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe [68].

Bei der Bewertung der Filterkissen anhand des Bleb Scores fiel auf, dass während der gesamten Versuchsdauer keines der Augen Mikrozysten aufwies.

Aus diesem Grund reduzierten wir die Kriterien des WBCS auf Vaskularisation (0-3 Punkte), Korkenziehergefäße (0-3 Punkte) und Einkapselung (0-3 Punkte). Somit betrug die maximal erreichbare Punktzahl für ein Filterkissen 9 Punkte. Verschloss sich ein Filterkissen frühzeitig, so wurde ein Score von 0 Punkten erteilt.

Die Kontroll-OP-Gruppe wies zu Beginn der Studie einen Blebscore von $6,9 \pm 1,2$ auf. Am dritten postoperativen Tag betrug dieser nur noch $4,4 \pm 2,3$, am fünften postoperativen Tag $2,4 \pm 1,6$ (Tabelle 5). Am 21. Tag waren bereits alle Filterkissen verschlossen, so dass von da an ein Blebscore von 0 bestand (Tabelle 5). Der Wertabfall des Blebscores war in der Kontroll-OP-Gruppe bereits ab dem 5. postoperativen Tag statistisch signifikant im Vergleich zum Ble-

bscore des ersten Tages und blieb dies auch bis zum Ende des Studienverlaufs (Abbildung 9).

In der MMC-Gruppe betrug der Blebscore am ersten postoperativen Tag $7,6 \pm 0,7$, am dritten postoperativen Tag $7,0 \pm 1,4$ (Tabelle 5). Die Werte bis zum 21. postoperativen Tag schwankten zwischen 5,6 und 6,3 (Tabelle 5). Sie sanken erst am 24. postoperativen Tag auf $4,3 \pm 3,1$ ab; stiegen jedoch am Ende der Verlaufsbeobachtung (28. postoperativer Tag) wieder auf $5,0 \pm 3,5$ an (Tabelle 5). In der MMC-Gruppe zeigte sich jedoch zu keinem Zeitpunkt der Blebscore-Beurteilung ein statistisch signifikant unterschiedliches Ergebnis zum Ausgangswert am ersten postoperativen Tag (Abbildung 9).

Die CLT++ Gruppe wies zu Beginn der Studie einen Blebscore von $7,5 \pm 0,5$ auf. Dieser fiel in den ersten Tagen kontinuierlich ab, so dass der Blebscore am 7. postoperativen Tag $4,0 \pm 2,3$ betrug (Tabelle 5). Im weiteren Verlauf stieg der Blebscore jedoch wieder etwas an; auf $4,6 \pm 1,6$ am 10. und auf $5,0 \pm 3,3$ am 17. Tag (Tabelle 5). Am 21. Tag sank der Blebscore auf $2,9 \pm 3,3$ und am 24. Tag auf $2,3 \pm 3,3$ bis er am 28. Tag nur noch $0,4 \pm 1,1$ betrug (Tabelle 5). Diese letzten drei ermittelten Blebscores der CLT++ Gruppe waren jeweils statistisch signifikant niedriger als der Blebscore des ersten postoperativen Tages (Abbildung 9).

In der CLT+ Gruppe betrug der Blebscore am 1. postoperativen Tag $8,1 \pm 0,4$ (Tabelle 5). Dieser sank am 3. Tag auf $5,4 \pm 2,5$ ab. Am 5. Tag lag eine statistisch signifikante Wertminderung auf $4,3 \pm 1,3$ vor (Tabelle 5, Abbildung 9). Auf den statistisch signifikant niedrigen Wert vom 7. Tag mit $3,3 \pm 2,0$ folgte ein Anstieg am 10. Tag auf $5,4 \pm 1,9$ (Tabelle 5). Am 14. Tag sank der Blebscore jedoch wieder statistisch signifikant auf $4,3 \pm 2,3$ (Tabelle 5, Abbildung 9). Die Werte zwischen dem 17. und 24. Tag lagen in der CLT+ Gruppe zwischen 2,9 und 3,6 und waren statistisch signifikant niedriger als der Ausgangswert des Blebscores (Abbildung 9). Am 28. Tag endete die Verlaufsbeobachtung mit ei-

nem statistisch signifikant niedrigen Blebscore von $1,4 \pm 2,7$ (Tabelle 5, Abbildung 9).

Im Vergleich der durchschnittlichen Blebscore-Ergebnisse der Gruppen untereinander zeigte sich Folgendes:

Zu Beginn erwiesen sich am 1. und 3. postoperativen Tag noch keine statistisch signifikanten Unterschiede der Score-Ergebnisse zwischen den Studiengruppen (MMC, CLT++, CLT+) und der Kontroll-OP-Gruppe (Abbildung 8). Ab dem 5. postoperativen Tag erreichte lediglich die MMC-Gruppe signifikant höhere Score-Werte als die Kontroll-OP-Gruppe. Dieses Verhältnis blieb bis zum Ende der Studie bestehen (Abbildung 8). Die CLT++ Gruppe wies am 5. sowie am 17. und die CLT+ Gruppe lediglich am 21. postoperativen Tag ein statistisch signifikant höheres Ergebnis als das der Kontroll-OP-Gruppe auf (Abbildung 8).

Die MMC Gruppe erreichte statistisch signifikant höhere Score-Werte als die CLT++ Gruppe am 1. sowie am 28. Tag und höhere Score-Werte als die CLT+ Gruppe am 7. sowie am 28. Tag (Abbildung 8). Zwischen den beiden CLT-Gruppen untereinander konnten zu keinem Zeitpunkt der Beobachtung statistisch signifikante Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 8).

Tabelle 5: Durchschnittliche „Bleb Scores“

Tage	1	3	5	7	10	14	17	21	24	28
MMC	7.6± 0.7	7.0± 1.4	5.6± 2.0	6.3± 1.7	5.6± 2.7	5.9± 1.6	6.1± 1.5	6.1± 2.6	4.3± 3.1	5.0± 3.5
CLT++	7.5± 0.5	6.20±2.4	5.0± 1.5	4.0± 2.3	4.6± 1.6	3.8± 2.8	5.0± 3.3	2.9± 3.3	2.3±3.3	0.4± 1.1
CLT+	8.1± 0.4	5.4±2.5	4.3± 1.3	3.3± 2.0	5.4± 1.9	4.3± 2.3	3.4± 2.3	3.6± 3.3	2.9± 3.1	1.4± 2.7
Kon-troll-OP	6.9± 1.2	4.4± 2.3	2.4±1.6	1.9± 1.8	2.2± 3.4	1.6± 2.5	1.1± 2.5	0.0± 0	0.0± 0	0.0± 0

A

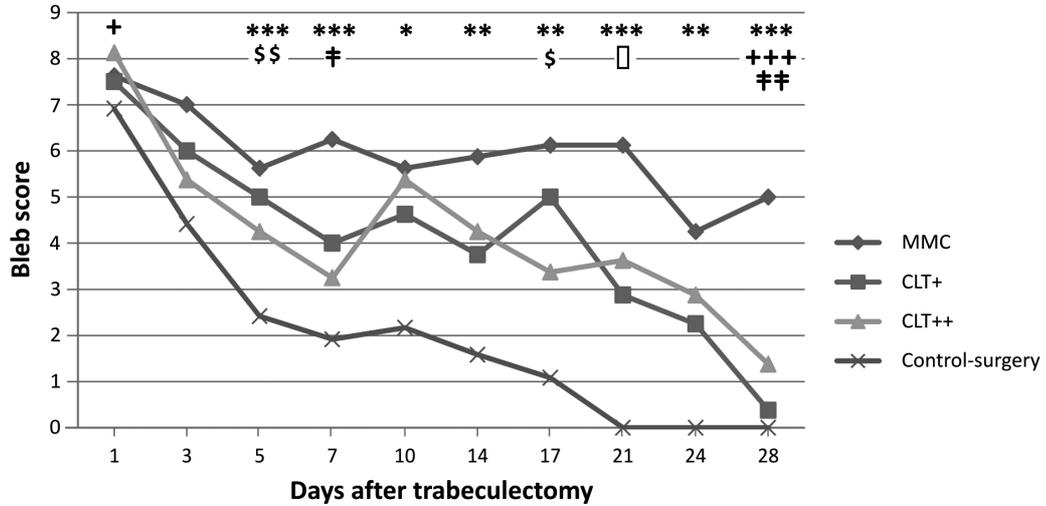
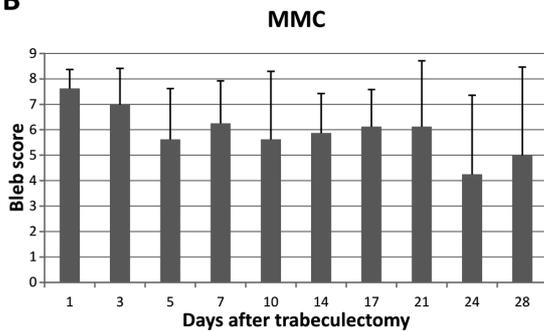
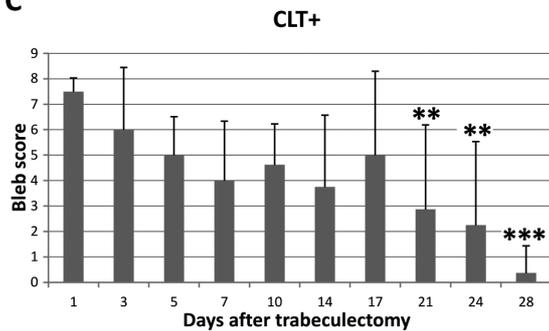


Abbildung 8: Durchschnittliche Bleb Score-Ergebnisse während der Studie mit signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen an einzelnen postoperativen Tagen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung als Graph dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 der MMC-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe; \$ p<0,05 und \$\$ p<0,01 der CLT++ Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe; □ p<0,05 der CLT+ Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe, + p<0,05 der MMC-Gruppe im Vergleich zur CLT++ Gruppe und ‡ p<0,05 und †† p<0,01 der MMC-Gruppe im Vergleich zur CLT+ Gruppe [68].

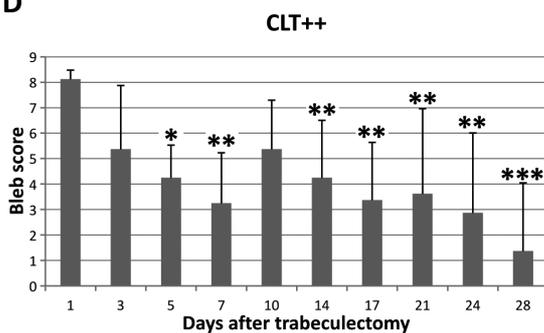
B



C



D



E

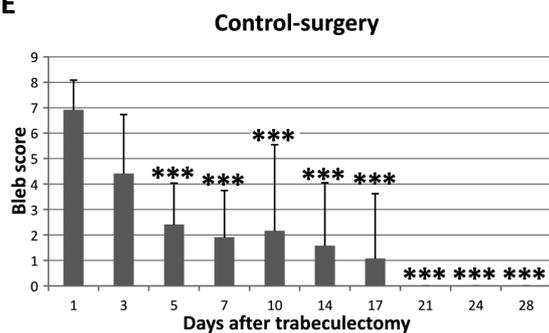


Abbildung 9: Durchschnittliche Bleb Score-Ergebnisse der einzelnen Gruppen im Vergleich zum durchschnittlichen Bleb Score-Ergebnis des ersten Tages. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung als Graph dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 im Vergleich zum Bleb Score-Ergebnis des ersten Tages [68].

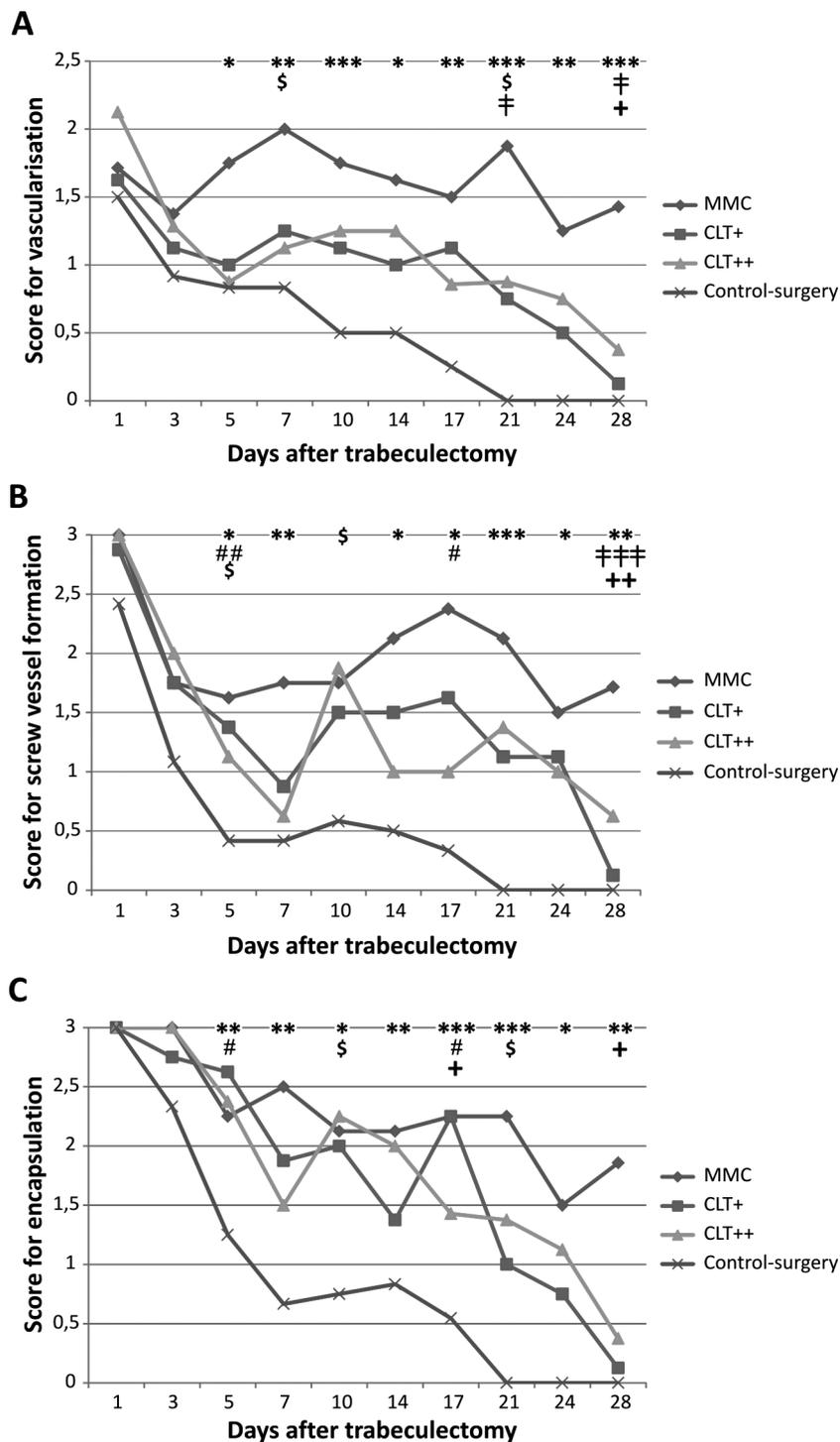


Abbildung 10: Durchschnittliche Score-Ergebnisse für die Einzelkriterien Vaskularisation (A), Korncziehiergefäße (B) sowie Einkapselung (C) während des Studienverlaufs. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung in den Graphen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 der MMC-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe; # p<0,05 und ## p<0,01 der CLT++ Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe; \$ p<0,05 der CLT+ Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe; ‡ p<0,05 und ‡‡‡ p<0,001 der MMC-Gruppe im Vergleich zur CLT++ Gruppe; + p<0,01 und ++ p<0,01 der MMC-Gruppe im Vergleich zur CLT+ Gruppe [68].

Im Gegensatz zur MMC-Gruppe erreichten im Vergleich der Einzelscore-Werte die CLT-Gruppen nur an wenigen Tagen einen höheren Score als die Kontroll-OP-Gruppe. Die CLT++ Gruppe erzielte in der Beurteilung der Vaskularisation lediglich am 17. postoperativen Tag einen statistisch höheren Score als die Kontroll-OP-Gruppe (Abbildung 10A). Sowohl in der Beurteilung der Korkenziehergefäße als auch in der Beurteilung der Einkapselung zeigte sich ein statistisch höherer Score der CLT++ Gruppe zur Kontroll-OP-Gruppe am 5. und 17. postoperativen Tag (Abbildung 10B-C).

In der CLT+ Gruppe zeigte sich bei der Beurteilung der Vaskularisation am 21. postoperativen Tag ein signifikant höherer Score als der der Kontroll-OP-Gruppe (Abbildung 10A). Sowohl in der Bewertung der Korkenziehergefäße als auch in der Bewertung der Einkapselung erreichte die CLT+ Gruppe am 5., 10. und 21. Tag einen signifikant höheren Score als die Kontroll-OP-Gruppe (Abbildung 10B).

Trotz der übermäßig signifikant besseren Einzelscore-Werte der MMC-Gruppe im Vergleich zu Kontroll-OP-Gruppe waren die Einzelscore-Werte der MMC-Gruppe nur an wenigen Tagen signifikant besser als die der CLT-Gruppen (Abbildung 10).

Im Bereich der Vaskularisation erreichte die MMC-Gruppe am 21. und 28. ein signifikant besseres Ergebnis als die CLT++ Gruppe und am 7., 21. und 28. Tag ein signifikant besseres Ergebnis als die CLT+ Gruppe (Abbildung 10A).

Im Bereich der Korkenziehergefäße wies die MMC-Gruppe lediglich am 28. Tag ein signifikant besseres Ergebnis als die CLT++ Gruppe sowie am 7. und 17. Tag ein signifikant besseres Ergebnis als die CLT+ Gruppe auf (Abbildung 10B). Bei der Beurteilung der Einkapselung erreichte die MMC-Gruppe jeweils am 28. Tag einen signifikant besseren Score als die beiden CLT-Gruppen (Abbildung 10C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die funktionsfähige Zeit der Filterkissen in allen Studiengruppen (MMC, CLT++, CLT+) verglichen mit der der Kon-

troll-OP-Gruppe statistisch gesehen signifikant länger war. Unter den Studien-
gruppen selbst gab es jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Die MMC-Gruppe stach dafür mit den höchsten Scorewerten für die Filterkissen-
bewertung heraus. Dazu zählten sowohl die durchschnittliche Überlebens-
zeit, der Gesamt-Score, sowie die Einzelwerte des Bleb Scores, in denen die
MMC-Gruppe jeweils die höchsten Werte erzielte. Auch wenn in der MMC-
Gruppe die Filterkissen am längsten funktionsfähig blieben, so zeigte sich trotz
allem kein statistisch signifikanter Unterschied zu den CLT-Gruppen.

In Abbildung 11 sind charakteristische Photographien der Filterkissen zusammen
mit den dazugehörigen Score-Werten zu sehen.

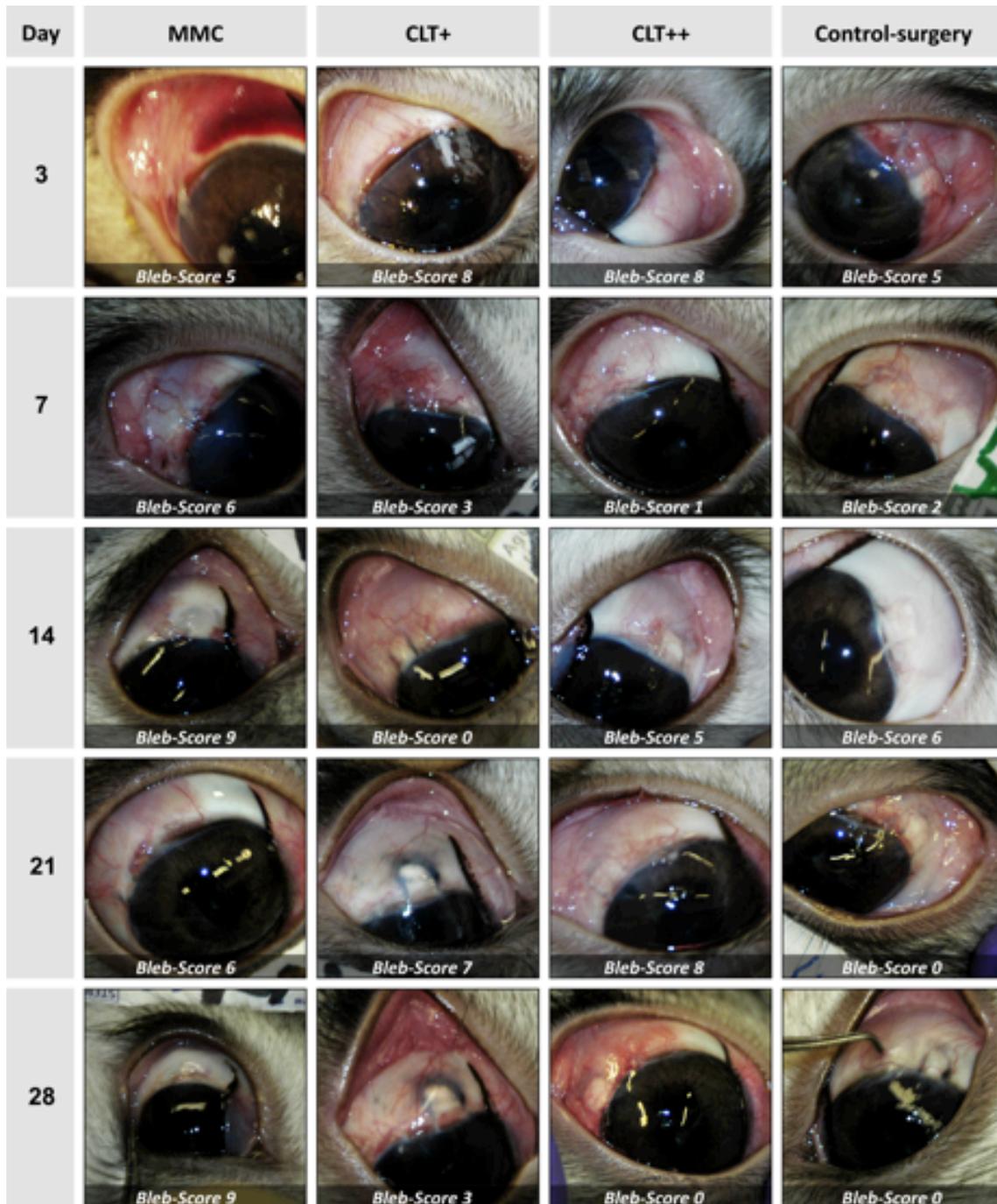


Abbildung 11: Repräsentative Fotografien der Filterkissen mit den dazugehörigen Score-Werten [68]

3.1.3.3 Postoperative Entzündung

Zwischen den vier Gruppen konnten hinsichtlich des Entzündungsgrades keine statistisch signifikanten Unterschiede an irgendeinem postoperativen Tag festgestellt werden. Am ersten postoperativen Tag lagen die Werte zwischen 0,9

und 1,1, am 3. postoperativen Tag sank der Score in allen Gruppen deutlich auf Werte zwischen 0 und 0,25 ab. Ab dem 7. Tag konnten alle Augen als entzündungsfrei dokumentiert werden.

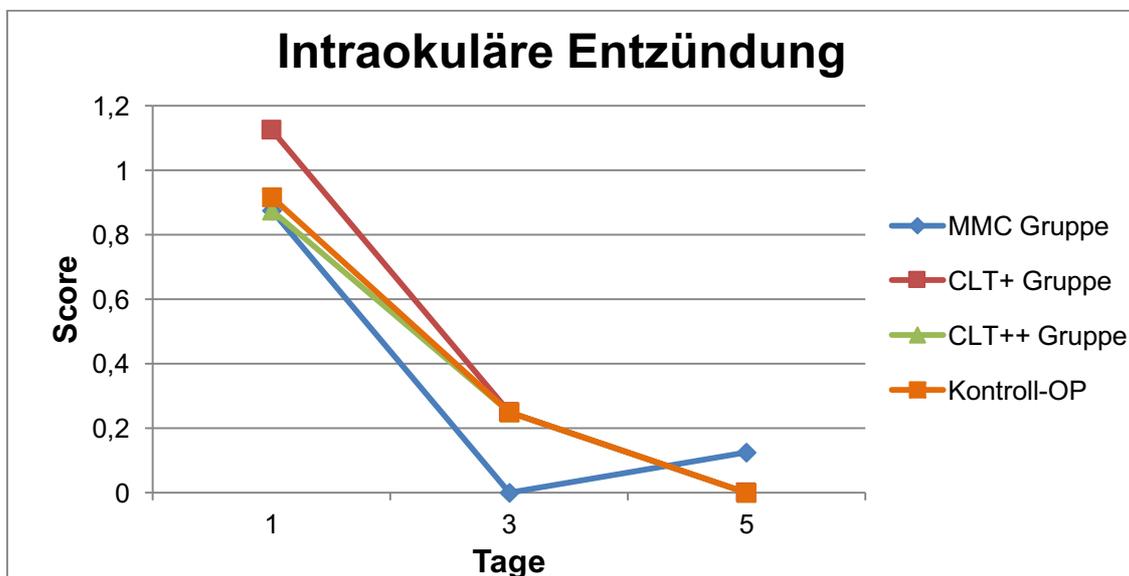


Abbildung 12: Durchschnittliche Score-Ergebnisse für die postoperative intraokuläre Entzündung während der ersten fünf postoperativen Tage

3.2 Histologie

Die histologischen Präparate dienen zur Beurteilung folgender Kriterien: subkonjunktivale Kollagenablagerung/Fibrosierung, Vaskularisation, Narbendicke im OP-Spalt sowie der Anzahl der Becherzellen.

Bei der Kontroll-OP-Gruppe und der MMC-Gruppe zeigte sich die größte Ausdehnung der subkonjunktivalen Kollagenablagerung. In den beiden CLT-Gruppen waren lediglich geringfügig weniger Ablagerungen zu finden (Abbildung 14A, Abbildung 15N-Q). Im Vergleich zu allen anderen Gruppen besaß die CLT++ Gruppe die geringsten Ablagerungen. Dieser Unterschied war allerdings nur im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe statistisch signifikant (Abbildung 14A, Abbildung 15N-Q). Entzündungszellen waren in der Standardfärbung in sämtlichen Versuchsgruppen im Filterkissen nicht erkennbar.

In Hinblick auf die Vaskularisation konnte in der MMC-Gruppe die geringste Vaskularisation nachgewiesen werden; wohingegen die Präparate der beiden CLT-Gruppen und die der Kontroll-OP-Gruppe eine nahezu gleich starke Ausprägung der Vaskularisation aufwiesen (Abbildung 14B, Abbildung 15N-Q). Der Unterschied zwischen der MMC-Gruppe und den restlichen Gruppen erwies sich allerdings als nicht statistisch signifikant (Abbildung 14B, Abbildung 15N-Q).

Bei der Beurteilung der Narbendicke im OP-Spalt konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der MMC- und den CLT-Gruppen festgestellt werden (Abbildung 14C, Abbildung 15I-M). Bei den Präparaten der Kontroll-OP-Gruppe war die Narbendicke durchschnittlich am größten, ergab jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den anderen Gruppen (Abbildung 14C, Abbildung 15I-M).

Prozentual wurden in den Präparaten der MMC-Gruppe am wenigsten erhaltene Becherzellen gefunden. Dies zeigte sich statistisch gesehen als signifikant (Abbildung 14D).

Zusammenfassend wurden in der Kontroll-OP-Gruppe in allen vier bewerteten Histologiekriterien die schlechtesten Werte verzeichnet. In der Analyse der Narbendicke zeigte sich in den Studiengruppen eine geringere Dicke als in der Kontroll-OP-Gruppe. In der Analyse der subkonjunktivalen Kollagen-Ablagerungen zeigte sich lediglich in der CLT+ Gruppe eine signifikant geringere Ausprägung. Ebenso wies in der Analyse der Vaskularisation lediglich die MMC-Gruppe eine deutlich geringere Ausprägung auf.

Die immunhistochemischen Färbungen mit α -SMA-Antikörpern sowie mit α 5 β 1-Integrin-Antikörpern konnten nicht zuverlässig ausgewertet werden, da das in Standardprotokollen vorgeschriebene Procedere zu einer ausgeprägten Gewebszerstörung führte. Durch das Kochen der Gewebeproben und der damit verbundenen Zerstörung konnten die entscheidenden Gewebeabschnitte der

Sklera an den Trabekulektomie-Operationsstellen nicht mehr ausgewertet werden. Auch eine Modifizierung des Versuchsprotokolls, in welchem versucht wurde, die Gewebsschäden des Kochens der Schnitte durch eine Vorbehandlung mit Enzymen oder vorsichtiges Erwärmen abzuschwächen, brachte keinen zusätzlichen Informationsgewinn.

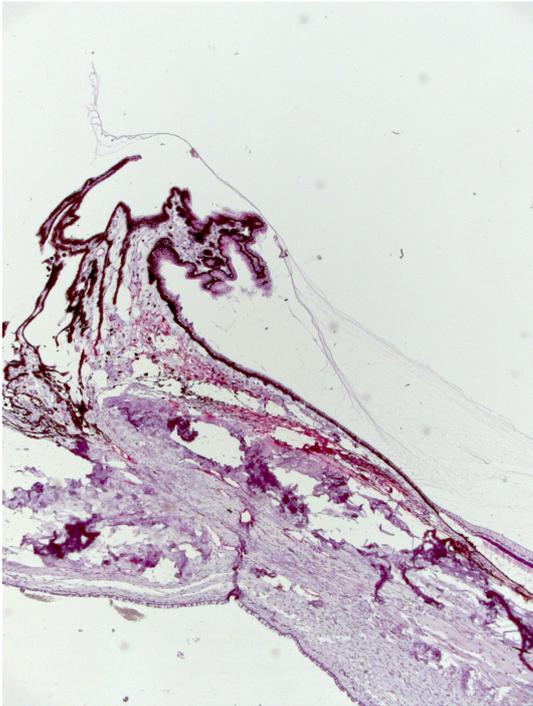


Abbildung 13: Beispiels einer ausgeprägten Gewebserstörung bei den immunhistochemischen Färbungen

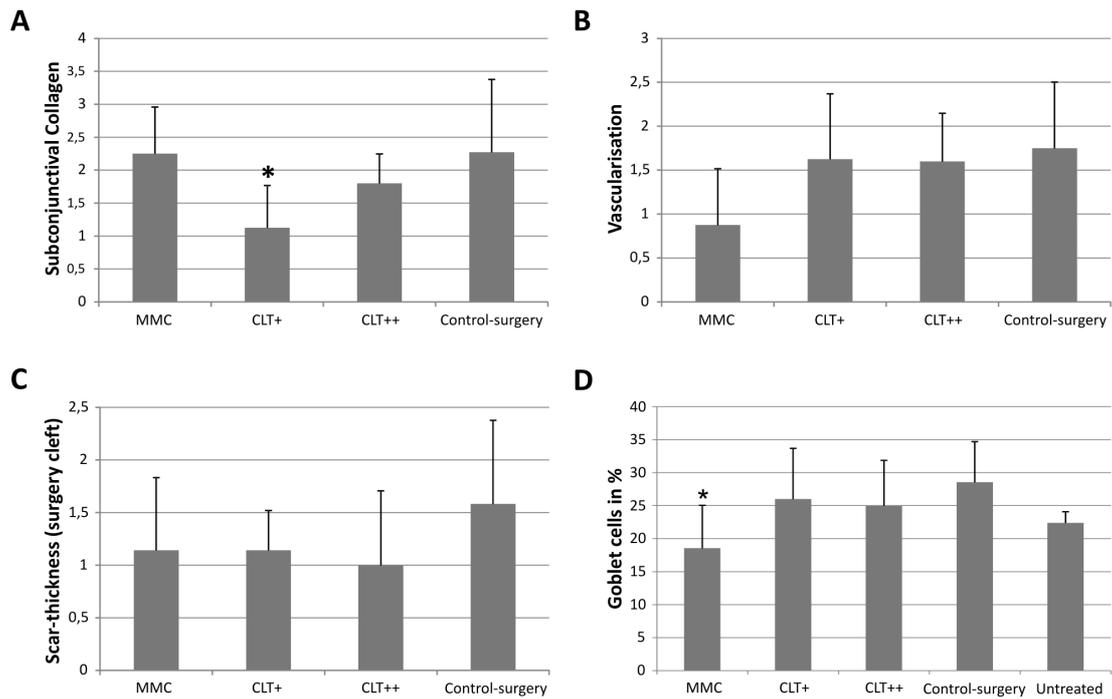


Abbildung 14: Die Säulendiagramme veranschaulichen die Menge an subkonjunktivalen Kollagenablagerungen an der Operationsstelle (A), die Vaskularisation des Filterkissens (B), die Narbendicke im Operationsspalt (C) sowie die prozentuale Anzahl an Becherzellen auf der Trabekulektomie-seite des Auges (D). Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung in den Graphen dargestellt. Hierbei steht das eingefügte Symbol „*“ für Folgendes: $p < 0,05$ der Gruppe 2 im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe [68].

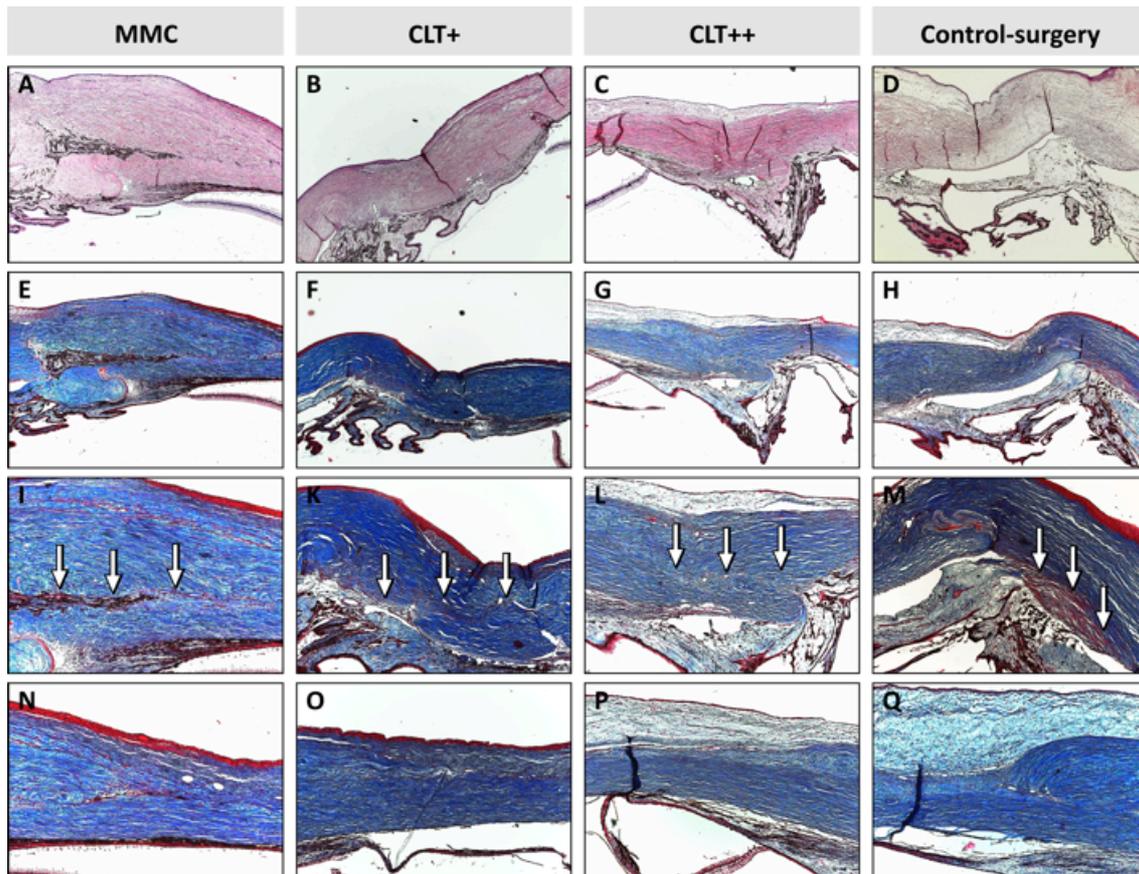


Abbildung 15: Repräsentative Photographien der histologischen Präparate der Trabekulektomie-Bereiche. Photographien A – D H&E-Färbung (100-fache Vergrößerung); E – M Masson Trichrom-Färbung (E – H 100-fache Vergrößerung, I – M: 200-fache Vergrößerung). Die Photographien N – Q zeigen das Filterkissen am peripheren Ende des oberflächlichen Skleralflaps.

3.3 Zellkulturversuche

3.3.1 MTS-Test

Mit Hilfe des MTS-Tests wurde die Zellviabilität untersucht. Da eine 1:1-Verdünnung der Substanzen toxische Wirkungen zeigte, wurde die Versuchsreihe mit Verdünnungen ab 1:5 gestartet. Die Werte der Kontrollgruppe an Tag 1, 3 und 5 wurden jeweils als 100 % festgesetzt und mit den Werten der verschiedenen Konzentrationsgruppen in Bezug gesetzt. In sämtlichen nachfolgenden Graphiken und Tabellen sind die CLT-Verdünnungen nur mit dem Konzentrationsverhältnis, die Placebo-Verdünnungen mit dem Konzentrationsverhältnis sowie einem nachfolgenden „P“ für Placebo gekennzeichnet.

Es zeigte sich, dass mit niedrigeren Konzentrationen des Placebo (P)- bzw. CLT-Wirkstoffes die Viabilität der Zellen anstieg (Tabelle 6). Dies galt mit Aus-

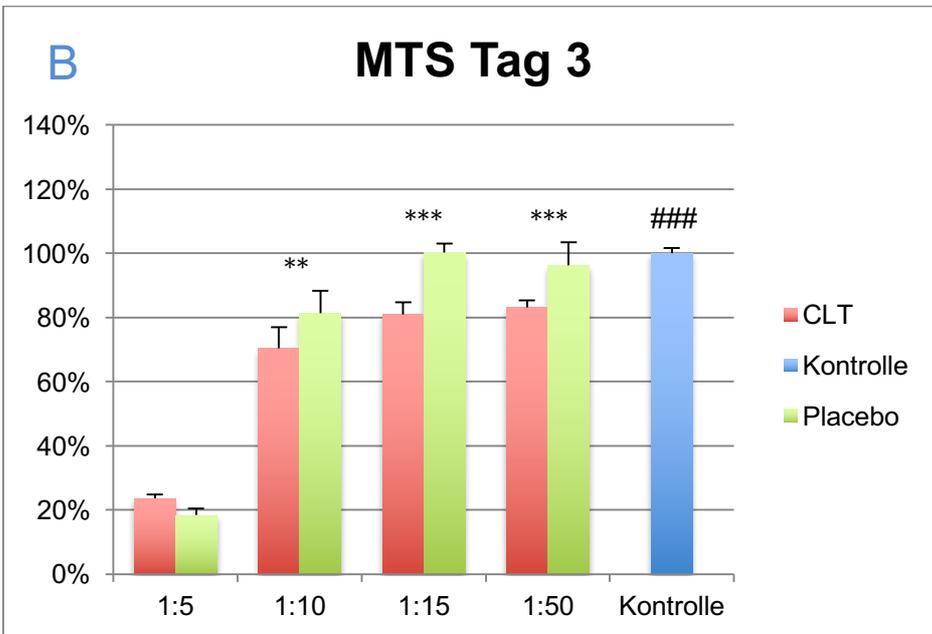
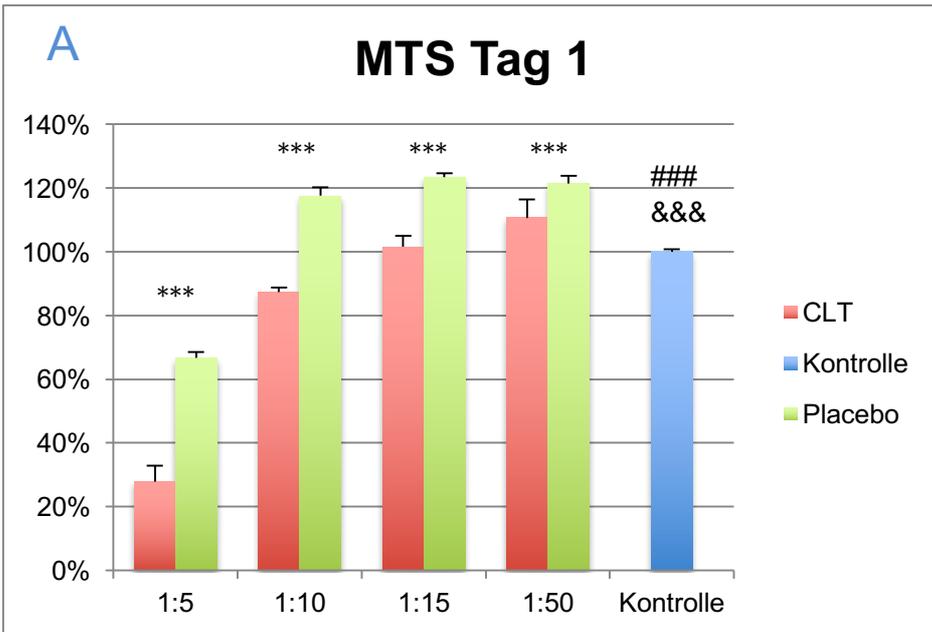
nahme weniger Werte sowohl für die Zellen, die einen Tag auf der Platte inkubiert wurden, als auch für die Zellen mit einer Inkubationszeit von drei und fünf Tagen. Beispielsweise erreichte am ersten Tag die 1:5 CLT-Konzentration einen Wert von 27,88 % ± 5,0 %, die 1:50-CLT-Konzentration 110,65 % ± 5,78 % (Tabelle 6). Am selben Tag erreichte die 1:5 P-Konzentration einen Wert von 66,64 % ± 1,80 %, die 1:50 P-Konzentration 121,4 % ± 2,39 % (Tabelle 6).

Tabelle 6: Durchschnittswerte des MTS-Tests

	1:5	1:10	1:15	1:50
Tag 1	27,88 % ± 5 %	87,38 % ± 1,39 %	101,53 % ± 3,45 %	110,65 % ± 5,78 %
Tag 3	23,7 % ± 1,16 %	70,36 % ± 6,62 %	80,99 % ± 3,74 %	83,07 % ± 2,25 %
Tag 5	14,74 % ± 0,32 %	38,31 % ± 4,01 %	119,64 % ± 2,92 %	99,9 % ± 2,98 %

	1:5P	1:10P	1:15P	1:50 P
Tag 1	66,64 % ± 1,80 %	117,51 % ± 2,76 %	123,4 % ± 1,30 %	121,4 % ± 2,39 %
Tag 3	18,38 % ± 1,97 %	81,28 % ± 7,10 %	100,25 % ± 2,86 %	96,21 % ± 7,27 %
Tag 5	12,52 % ± 0,23 %	44,15 % ± 4,33 %	128,46 % ± 3,13 %	95,94 % ± 2,16 %

Kontrolle	
Tag 1	100 % ± 0,71 %
Tag 3	100 % ± 1,67 %
Tag 5	100 % ± 2,54 %



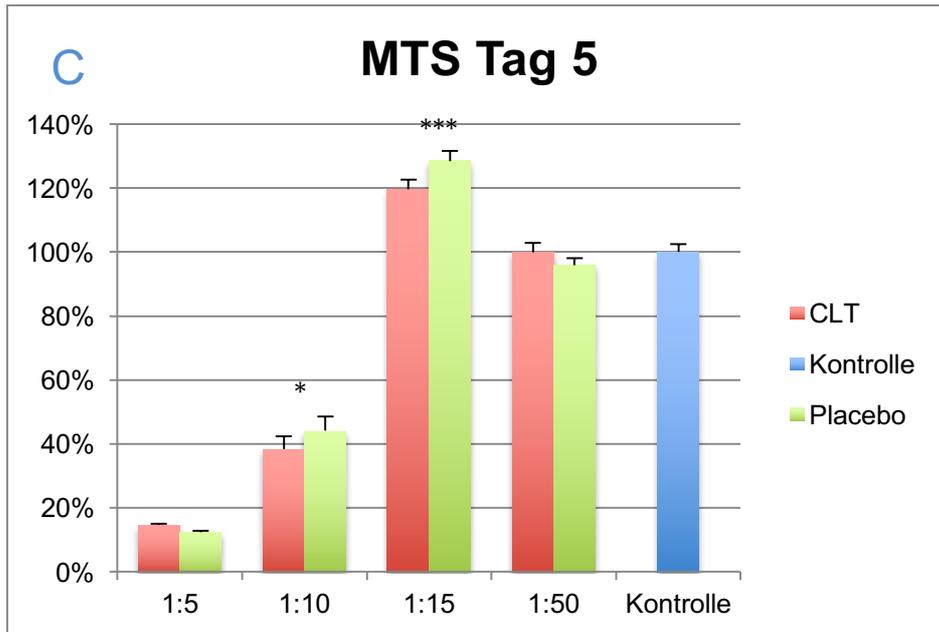


Abbildung 16 A-C: Säulendiagramme zu den Werten des MTS-Tests der verschiedenen Konzentrationen von Placebo und CLT an Tag 1, 3 und 5. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ für die Unterschiede der gleichen Konzentration zwischen den beiden Substanzen. ### $p < 0,001$ für die Unterschiede zwischen Kontrolle und 1:50-CLT, &&& $p < 0,001$ für die Unterschiede zwischen Kontrolle und 1:50-Placebo.

Am ersten Tag zeigte die Zellviabilität der CLT-Gruppe bei sämtlichen Konzentrationen einen statistisch signifikant niedrigeren Wert als die Placebo-Gruppe (Abbildung 16). Beispielsweise betrug der Wert für 1:5 CLT $27,88 \% \pm 5 \%$, der für 1:5 P $66,64 \% \pm 1,80 \%$ (Tabelle 6). Bei der 1:10-Konzentration erreichte CLT einen Wert von $87,38 \% \pm 1,39 \%$, P hingegen einen Wert von $117,51 \% \pm 2,76 \%$ (Tabelle 6).

Am ersten Tag lagen die Werte der 1:15- und der 1:50-CLT-Konzentration über dem Kontrollwert. Die 1:50-CLT-Konzentration erreichte mit $110,65 \% \pm 5,78 \%$ einen signifikant höheren Wert als die Kontrolle mit $100 \% \pm 0,71 \%$ (Tabelle 6). Auch die 1:10-, 1:15- und 1:50-Placebo-Gruppen lagen über dem Kontrollwert. Jedoch erreichte nur die 1:50-P-Konzentration mit $121,4 \% \pm 2,39 \%$ einen statistisch signifikant höheren Wert als die Kontrollgruppe (Abbildung 16, Tabelle 6).

An Tag 3 lagen die Werte für CLT mit Ausnahme der 1:5-Konzentration, bei welcher die CLT-Gruppe sogar oberhalb der Placebo-Gruppe lag, ebenfalls statistisch signifikant unter denen der Placebo-Gruppe (Abbildung 16) (1:10 Ver-

dünnung: CLT 70,36 % \pm 6,62 % vs. P 81,28 % \pm 7,10 %; 1:50 Verdünnung: CLT 83,07 % \pm 2,25 vs. P 96,21 % \pm 7,27 % (Tabelle 6)).

Die 1:50-CLT-Konzentration lag am dritten Tag mit 83,07 % \pm 2,25 % signifikant unter der Kontrollgruppe mit 100 % \pm 1,67 % (Tabelle 6).

Am 5. Tag lagen lediglich bei der 1:10- sowie bei der 1:15-Verdünnung statistisch signifikant niedrigere Werte für CLT im Vergleich zur Placebo-Gruppe vor (1:10 Verdünnung: CLT 38,31 % \pm 4,01 % vs. P 44,15 % \pm 4,33 %; 1:15 Verdünnung: CLT 119,64 % \pm 2,92 % vs. P 128,46 % \pm 3,13 % (Tabelle 6, Abbildung 16)). Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die hochkonzentrierten Proben eine niedrigere Viabilität. Desto niedriger die CLT, bzw. die Placebo-Konzentration war, desto mehr stieg die Viabilität. Überraschenderweise stieg bei einer Konzentration von 1:15 in beiden Gruppen die Viabilität statistisch signifikant über die Kontrollgruppe (1:15 Verdünnung: CLT 119,64 % \pm 2,92 %, Placebo 128,46 % \pm 3,13 % vs. Kontrolle 100 % \pm 2,54 % (Tabelle 6)).

3.3.2 Kristallviolett-Test

Im Kristallviolett-Test ergaben sich mit dem MTS-Test vergleichbare Werte. Bei hohen Konzentrationen der Substanzen CLT bzw. Placebo sanken die Werte, d.h. die Zellzahl der lebenden, adhärent wachsenden Zellen, deutlich (Tabelle 7). So betrug der Wert für die 1:5 CLT-Konzentration an Tag 5 nur 43,64 % \pm 4,31 % und die der 1:5 P-Konzentration nur 42,29 % \pm 2,99 % verglichen mit dem Wert der Kontrolle von 100 % \pm 6,80 % (Tabelle 7).

Generell gesehen waren sowohl am 1., als auch am 3. und 5. Tag bei nahezu allen Konzentrationen die Placebo-Werte höher als die der CLT-Gruppe. Hierbei bestanden bei diversen Konzentrationen statistisch signifikante Unterschiede, welche weiter unten näher beschrieben werden.

Prinzipiell zeigten höherkonzentrierte Proben fast immer einen erniedrigten Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

An Tag 1 waren alle Werte der CLT-Gruppe mit Ausnahme der 1:50-Verdünnung statistisch signifikant niedriger als die der Placebo-Gruppe (Abbildung 17A). Beispielsweise lag der 1:5 CLT-Wert mit $57,38 \% \pm 5,11 \%$ signifikant unter dem Placebo-Wert von $81,84 \% \pm 2,29 \%$ (Tabelle 7). Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe lagen die Werte der Placebo-Gruppe abgesehen von der 1:5-Konzentration oberhalb den Werten der Kontroll-Gruppe, obgleich nicht statistisch signifikant.

An Tag 3 erreichten die CLT-Werte mit Ausnahme der 1:5-Verdünnung ebenfalls ein statistisch signifikant niedrigeres Ergebnis als die der Placebo-Gruppe (Abbildung 17B). So lag beispielsweise der 1:50 CLT-Wert mit $76,11 \% \pm 3,16 \%$ signifikant unter dem 1:50 P-Wert mit $105,59 \% \pm 8,98 \%$ (Tabelle 7). Als Ausreißer überragten – jedoch nicht statistisch signifikant – die Werte der Placebo-Gruppe in der 1:15- und 1:50-Konzentration den Wert der Kontrollgruppe (Abbildung 17B). Statistisch signifikant niedriger als die Kontrollgruppe war der Wert der 1:50-CLT-Konzentration (1:50 CLT $75,11 \% \pm 3,16$ vs. Kontrolle $100 \% \pm 3,26 \%$ (Tabelle 7)).

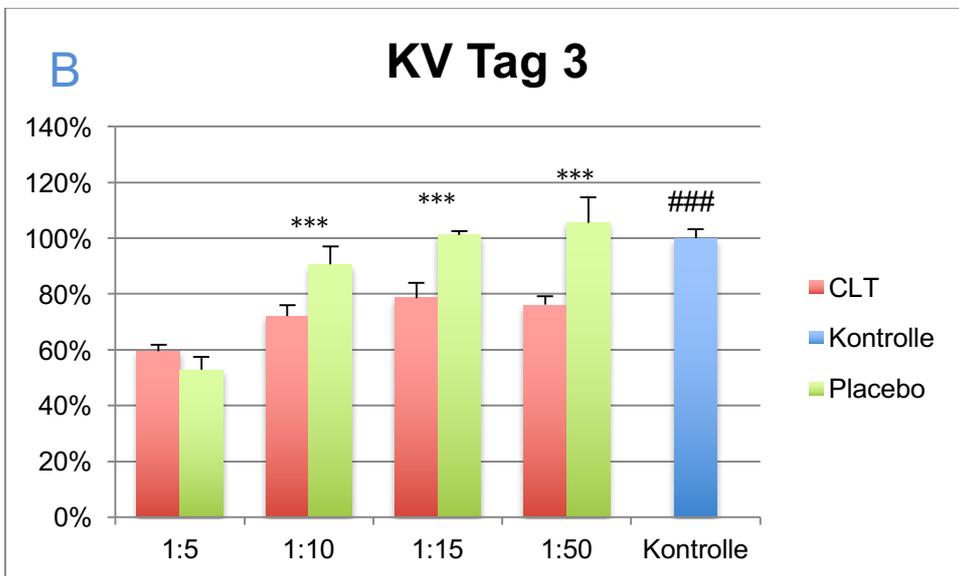
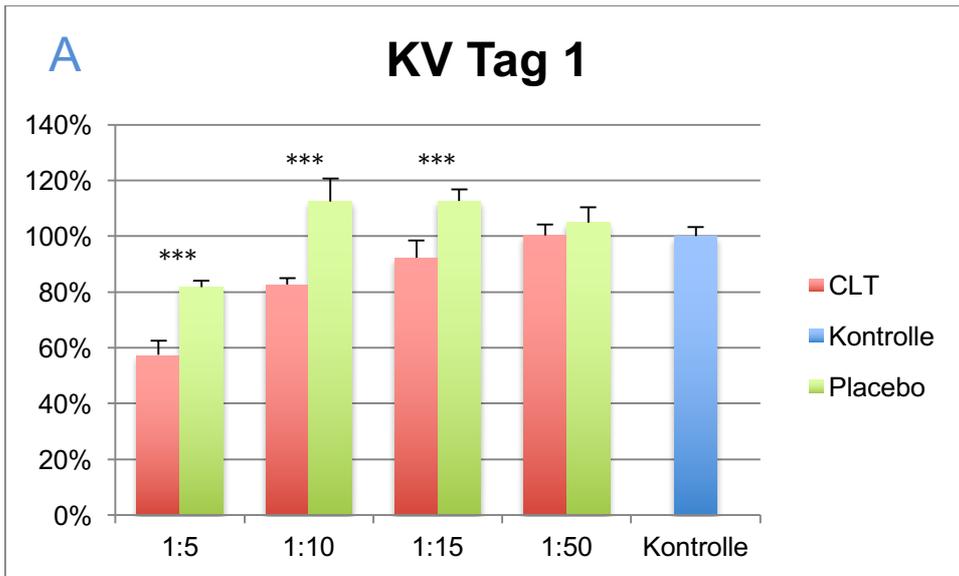
An Tag 5 wiesen lediglich die Werte der 1:10- sowie die der 1:15-CLT-Konzentration ein statistisch signifikant niedrigeres Ergebnis als die Placebo-Gruppe auf (1:10 Verdünnung: CLT $64,06 \% \pm 3,21 \%$ vs. Placebo $75,31 \% \pm 6,99 \%$ (Tabelle 7)). Bei der 1:50-Konzentration erwies sich dieser Unterschied als nicht signifikant und bei der 1:5-Konzentration überragte der Wert der CLT-Gruppe sogar den Wert der Placebo-Gruppe (Abbildung 17). Als statistisch signifikant niedriger als die Kontrollgruppe ergab sich der Wert der 1:50-CLT-Gruppe ($86,11 \% \pm 3,95 \%$ vs. Kontrolle $100 \% \pm 6,80 \%$ (Tabelle 7)).

Tabelle 7: Durchschnittliche Werte des KV-Tests

	1:5	1:10	1:15	1:50
Tag 1	$57,38 \% \pm 5,11 \%$	$82,61 \% \pm 2,35 \%$	$92,26 \% \pm 6,10 \%$	$100,22 \% \pm 4,08 \%$
Tag 3	$59,54 \% \pm 2,36 \%$	$72,04 \% \pm 3,98 \%$	$78,52 \% \pm 5,48 \%$	$76,11 \% \pm 3,16 \%$
Tag 5	$43,64 \% \pm 4,31 \%$	$64,06 \% \pm 3,21 \%$	$103,26 \% \pm 8,02 \%$	$86,11 \% \pm 3,95 \%$

	1:5P	1:10P	1:15P	1:50P
Tag 1	81,84 % ± 2,29 %	112,47 % ± 8,10 %	112,6 % ± 4,20 %	104,98 % ± 5,43 %
Tag 3	52,81 % ± 4,58 %	90,62 % ± 6,39 %	101,2 % ± 1,36 %	105,59 % ± 8,98 %
Tag 5	42,29 % ± 2,99 %	75,31 % ± 6,99 %	118,05 % ± 10,57 %	96,34 % ± 7,43 %

Kontrolle	
Tag 1	100 % ± 3,32 %
Tag 3	100 % ± 3,26 %
Tag 5	100 % ± 6,80 %



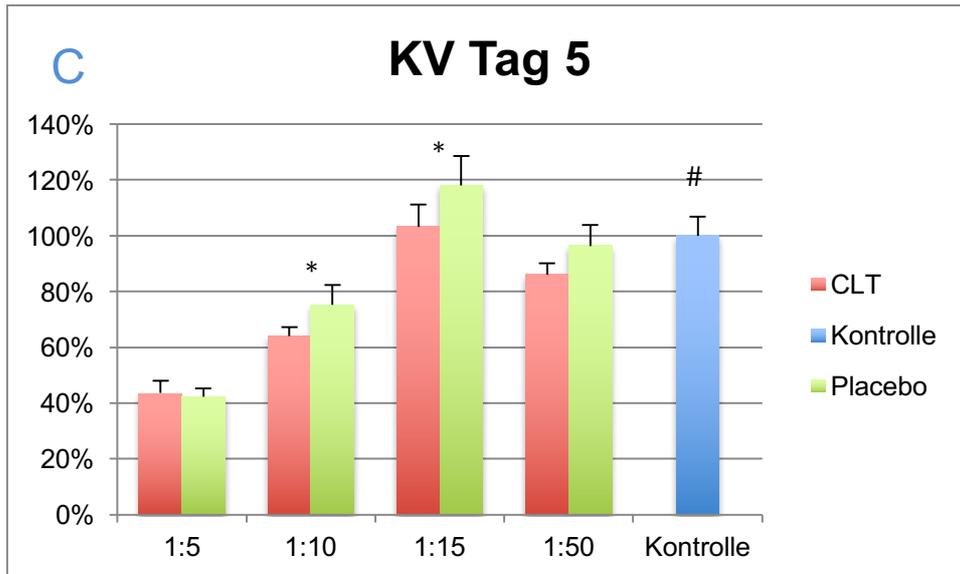


Abbildung 17A-C: Säulendiagramme zu den Werten des KV-Tests der verschiedenen Konzentrationen von Placebo und CLT an Tag 1, 3 und 5. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ für die Unterschiede der gleichen Konzentration zwischen den beiden Substanzen. ### $p < 0,001$ und # $p < 0,05$ für die Unterschiede zwischen 1:50-CLT und Kontrolle.

Die Gegenüberstellung der beiden Zellkulturtests, nämlich des MTS- und des KV-Tests, verdeutlicht die relative Viabilität der Zellen. Während der KV-Test aussagt, wie viele Zellen vorhanden sind, zeigt der MTS-Test, wie stoffwechselaktiv diese sind. Wenn man nun den MTS-Test in Bezug auf den KV-Test setzt, so wird die relative Viabilität, d.h. die Aktivität bezogen auf eine Zellmasse, ersichtlich.

Die relative Viabilität sank bis auf zwei Ausnahmen bei der Placebo-Gruppe mit zunehmender Konzentration an allen Tagen. So lag beispielsweise am ersten Tag der 1:50 CLT-Wert bei $110,3 \% \pm 3,31 \%$ während der 1:5-Wert bei $49,21 \% \pm 11,8 \%$ lag (Tabelle 8). Ebenso lag am ersten Tag der 1:50 Placebowert mit $115,74 \% \pm 4,82 \%$ über dem 1:5 Wert von $81,4 \% \pm 2,90 \%$ (Tabelle 8).

Die beiden Ausnahmen bildeten jeweils die 1:15 Placebowerte am 3. und 5. Tag. Diese lagen mit $98,96 \% \pm 2,75 \%$ und $106,99 \% \pm 9,16 \%$ jeweils höher als die ihr zugehörige 1:50-Konzentration von $91,12 \% \pm 3,10 \%$ und $97,95 \% \pm 9,20 \%$ (Tabelle 8).

Beim Vergleich der jeweils selben Konzentration zwischen CLT und Placebo lag der Wert der 1:5-Placebo-Gruppe an Tag 1 statistisch signifikant über dem der CLT-Gruppe. An Tag 3 und 5 lag der Wert der 1:50-Placebo-Gruppe jedoch statistisch signifikant unter dem der CLT-Gruppe (Abbildung 18). So betrug beispielsweise am 3. Tag die 1:50 Konzentration von CLT $109,16 \% \pm 4,87 \%$, während die ebenso niedrigkonzentrierte Placebogruppe einen Wert von $91,12 \% \pm 3,10 \%$ erreichte (Tabelle 8).

Die Werte der stärker verdünnten Lösungen überstiegen zum Teil die Kontrollwerte. Hierbei ergaben sich im Vergleich der Kontrollwerte und der Werte der 1:50 CLT-Konzentration am 1. und 5. Tag statistisch signifikante Unterschiede (Abbildung 18). So lag die 1:50 CLT-Konzentration am 5. Tag bei $114,65 \% \pm 2,98 \%$ signifikant über den am selben Tag gemessenen Kontrollwert von $100 \% \pm 8,07 \%$ (Tabelle 8).

Zwischen den Werten der Kontrolle und den Werten der 1:50 Placebokonzentration kam lediglich am 1. Tag ein statistisch signifikanter Unterschied auf (Abbildung 18). Hierbei betrug der Wert der 1:50 Placebokonzentration $115,74 \% \pm 4,82 \%$ und war signifikant höher als der Kontrollwert vom selben Tag mit $100 \% \pm 3,38 \%$ (Tabelle 8).

Tabelle 8: Durchschnittswerte für die Bezugnahme des MTS-Tests auf den KV-Test

	1:5	1:10	1:15	1:50
Tag 1	49,21 % ± 11,8 %	105,73 % ± 2,92 %	110,17 % ± 4,43 %	110,3 % ± 3,31 %
Tag 3	39,76 % ± 1,10 %	97,67 % ± 9,25 %	103,25 % ± 4,81 %	109,16 % ± 4,87 %
Tag 5	33,74 % ± 2,85 %	59,69 % ± 6,8 %	112,56 % ± 8,25 %	114,65 % ± 2,98 %

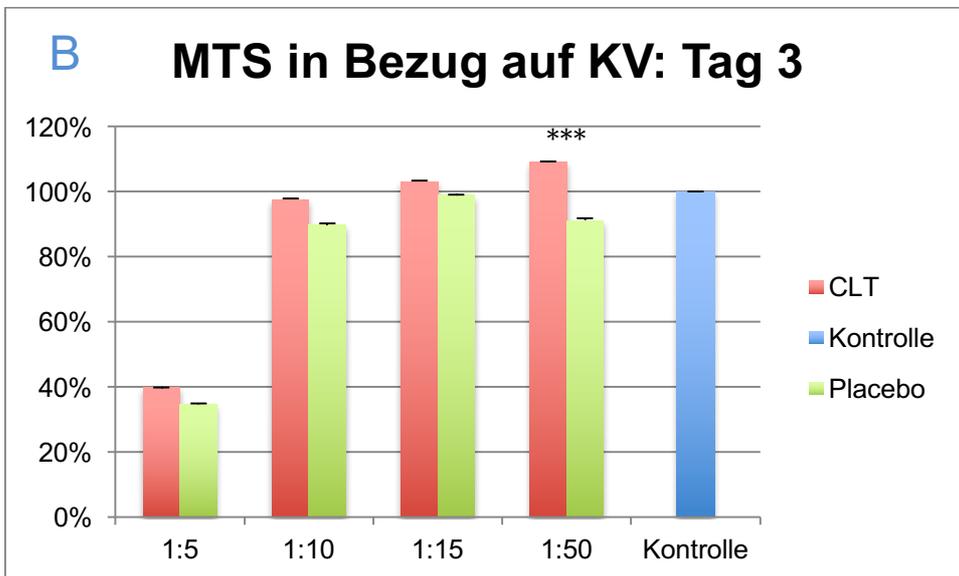
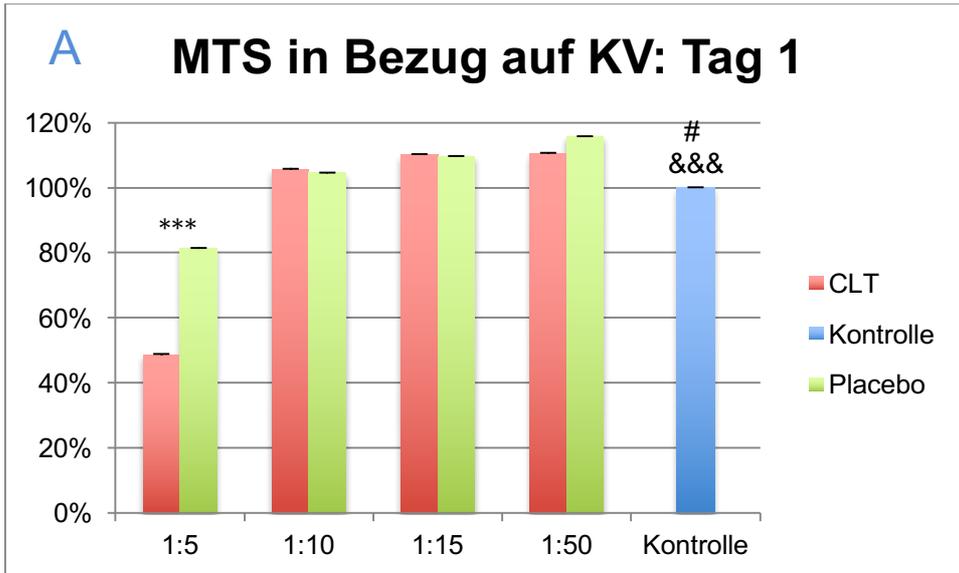
	1:5P	1:10P	1:15P	1:50P
Tag 1	81,4 % ± 2,90 %	104,72 % ± 5,77 %	109,59 % ± 3,51 %	115,74 % ± 4,82 %
Tag 3	34,9 % ± 4,04 %	89,82 % ± 8,04 %	98,96 % ± 2,75 %	91,12 % ± 3,10 %
Tag 5	29,36 % ± 1,57 %	57,92 % ± 6,14 %	106,99 % ± 9,16 %	97,95 % ± 9,20 %

Kontrolle

Tag 1 100 % ± 3,38 %

Tag 3 100 % ± 4,2 %

Tag 5 100 % ± 8,07 %



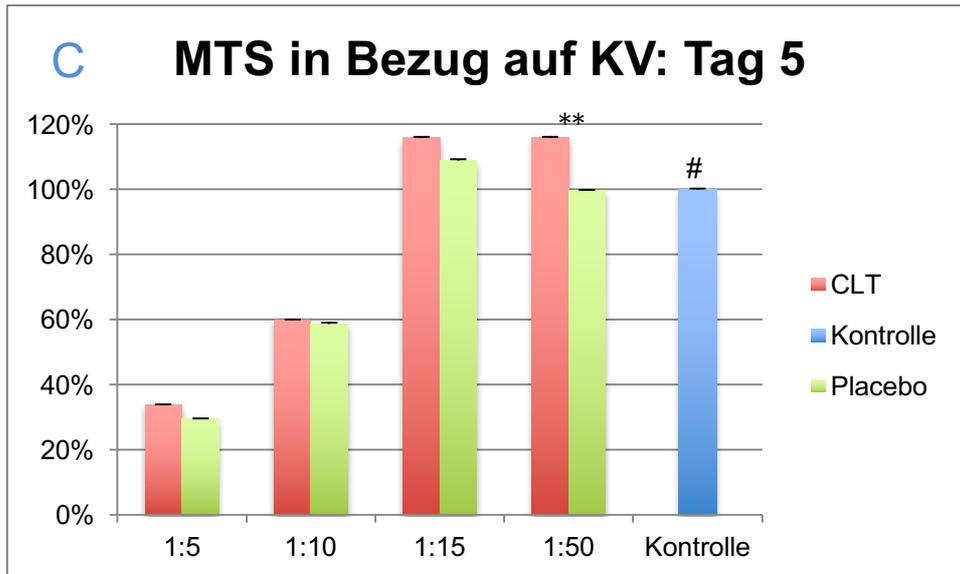


Abbildung 18 A-C: Säulendiagramm zu den Werten des MTS-Tests in Bezug auf den KV-Test. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: *** $p < 0,001$ und ** $p < 0,01$ für den Unterschied zwischen CLT und Placebo # $p < 0,05$ für den Unterschied zwischen 1:50 CLT und Kontrolle, && $p < 0,001$ für den Unterschied zwischen 1:50 P und Kontrolle.

3.3.3 Caspase 3/7-Assay

Im Caspase-Test konnten weitestgehend niedrigere Werte bei stärker konzentrierten Substanzen beobachtet werden. Bis auf wenige Ausreißer ergaben sich an allen Tagen steigende Werte bei gleichzeitig stärker verdünnten Lösungen von CLT bzw. Placebo (Tabelle 9). Ausreißer waren beispielsweise die 1:10-Placebo-Konzentrationen an Tag 3 und Tag 5 ($127,06 \% \pm 10,50 \%$; $138,22 \% \pm 11,98 \%$ (Tabelle 9)).

Bei den niedrigen Konzentrationen (1:15, 1:50) bestanden an allen Tagen mit wenigen Ausnahmen zwischen der Placebo- und CLT-Gruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede. Eine Ausnahme bildete beispielsweise die 1:50-Konzentration an Tag 1 (s.u.). Zudem befanden sich bei diesen Konzentrationen die Werte beider Gruppen weitestgehend im Bereich der Kontrollgruppenwerte.

Bei den höheren Konzentrationen (1:5, 1:10) hingegen waren an Tag 3 und Tag 5 alle Werte der Placebogruppe statistisch signifikant höher als die der CLT-Gruppe. Jedoch zeigte die 1:10-Konzentration der CLT-Gruppe an Tag 1 einen höheren Wert als die Placebo-Gruppe. Zusätzlich wurden bei der Placebogrup-

pe an Tag 3 und Tag 5 bei der 1:10-Konzentration die an diesem Tag am höchsten verzeichneten Werte gemessen.

An Tag 1 stiegen die Werte der Placebo- und CLT-Konzentrationen mit Ausnahme der 1:15-CLT-Konzentration mit zunehmender Verdünnung an. Hierbei lagen die Werte der CLT-Gruppe bei der 1:10- und 1:50-Konzentration statistisch signifikant über den Werten der Placebo-Gruppe (1:10-Verdünnung: CLT 102,08 % \pm 6,73 %, P 85,55 % \pm 3,92 %; 1:50-Verdünnung: CLT 126,04 % \pm 5,98 %, P 109,94 % \pm 3,15 % (Abbildung 19A, Tabelle 9)).

Der Wert der 1:50-CLT-Konzentration lag statistisch signifikant über dem Kontrollwert (1:50-CLT: 126,04 % \pm 5,98 %, Kontrolle: 100 % \pm 7,45 % (Abbildung 19A, Tabelle 9)).

An Tag 3 zeigten sowohl die CLT- als auch die Placebowerte einen Peak bei der 1:15-Konzentration und sanken anschließend wieder auf ein relativ konstantes Niveau ab. Während des Peaks überragte die Placebogruppe – wenngleich auch nicht statistisch signifikant - mit 127,06 % \pm 10,5 % die Kontrollgruppe.

Zwischen den beiden Studiengruppen zeigte sich bei der 1:5-Konzentration der CLT-Gruppe ein statistisch signifikant niedrigerer Wert als bei der Placebo-Gruppe (CLT: 62,77 % \pm 6,7 %, P: 89,1 % \pm 6,67 % (Abbildung 19B, Tabelle 9)). Auch die 1:10 CLT-Konzentration erreichte mit 92,11 % \pm 5,09 % einen signifikant niedrigeren Wert als die 1:10 Placebokonzentration mit 127,06 % \pm 10,50 % (Tabelle 9).

An Tag 5 war im Gegensatz zu den Vortagen in keiner der beiden Versuchsgruppen ein konstanter Verlauf ersichtlich. Während die CLT-Gruppe bei der 1:10-Verdünnung ihren niedrigsten Wert erreichte, erreichte die Placebo-Gruppe bei eben dieser Verdünnung ihren höchsten Wert (Abbildung 19C).

Die Werte der CLT-Gruppe fielen von der 1:5- zur 1:10-Konzentration ab, stiegen bei der 1:15-Konzentration wieder an und fielen bei der 1:50-Konzentration erneut ab. In der Placebogruppe zeigte sich ein Anstieg von der 1:5-Konzentration auf den Peak der 1:10-Konzentration. Daraufhin sanken die Werte bei der 1:15- und 1:50-Konzentration unter den Wert der 1:5-Konzentration

ab (Abbildung 19C). Die Werte der Placebogruppe lagen bei der 1:5- und 1:10-Verdünnung statistisch signifikant höher als die Werte der CLT-Gruppe (1:5-Verdünnung: CLT 80,26 % ± 7,85 %, P 105,57 % ± 4,74 %; 1:10-Verdünnung: CLT 66,88 % ± 5,73 %, P 138,22 % ± 11,98 % (Tabelle 9)). Bei der 1:15-Verdünnung lag die CLT-Gruppe mit 112,82 % ± 8,2 % signifikant über der Placebogruppe mit 95,94 % ± 8,13 % (Tabelle 9).

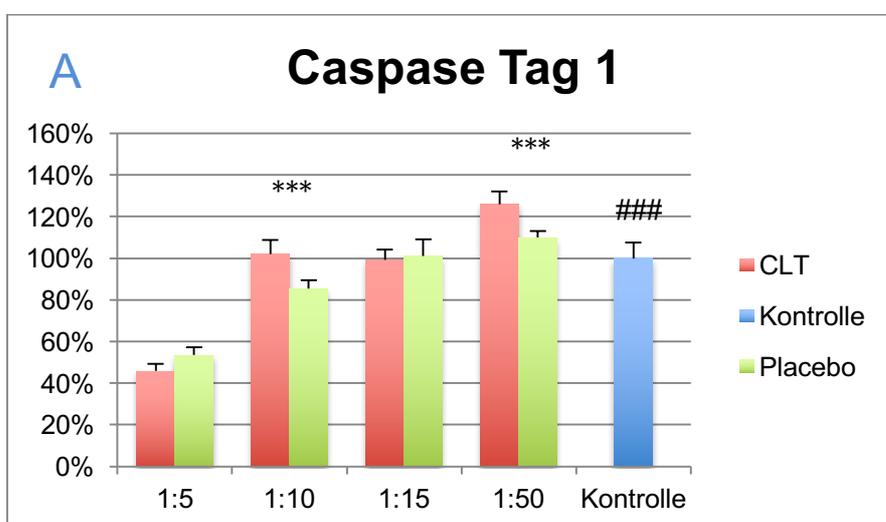
Vergleicht man die Zellzahl, die aus dem KV-Test ersichtlich wird, mit den Ergebnissen des Caspase-Tests, zeigt sich besonders an Tag 5, dass obwohl die Zellzahl sehr niedrig ist, die Caspase-Werte hoch sind. Die Caspaseaktivität ist daher pro Zelle gesehen bei den höheren CLT- bzw. Placebo-Konzentrationen hoch.

Tabelle 9: Durchschnittswerte des Caspase-Tests

	1:5	1:10	1:15	1:50
Tag 1	45,97 % ± 3,32 %	102,08 % ± 6,73%	99,29 % ± 4,74 %	126,04 % ± 5,98 %
Tag 3	62,77 % ± 6,7 %	92,11 % ± 5,09 %	80,93 % ± 3,45 %	89,46 % ± 3,83 %
Tag 5	80,26 % ± 7,85 %	66,88 % ± 5,73 %	112,82 % ± 8,2 %	95,67 % ± 4,02 %

	1:5P	1:10P	1:15P	1:50P
Tag 1	53,54 % ± 3,58 %	85,55 % ± 3,92 %	101,02 % ± 8,13 %	109,94 % ± 3,15 %
Tag 3	89,1 % ± 6,67 %	127,06 % ± 10,5 %	81,26 % ± 4,91 %	86,32 % ± 5,64 %
Tag 5	105,57 % ± 4,74 %	138,22 % ± 11,98 %	95,94 % ± 8,13 %	86,47 % ± 1,84 %

Kontrolle	
Tag 1	100 % ± 7,45 %
Tag 3	100 % ± 3,91 %
Tag 5	100 % ± 4,27 %



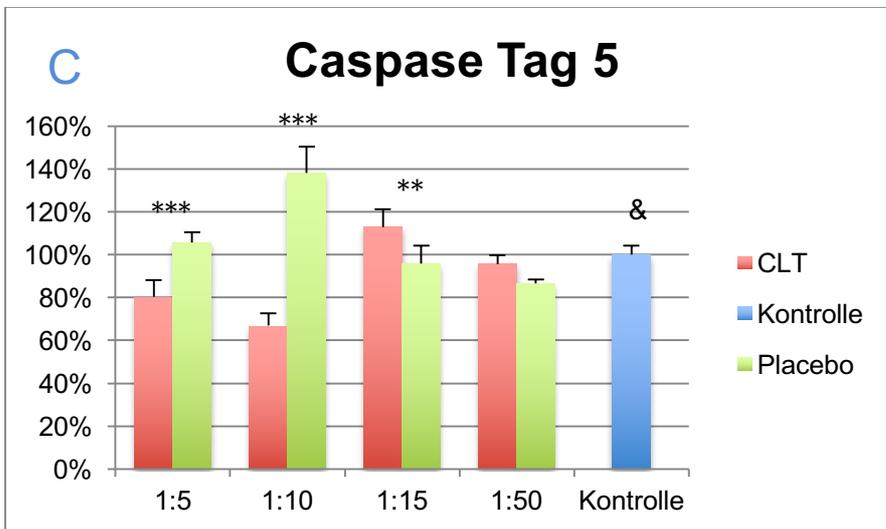
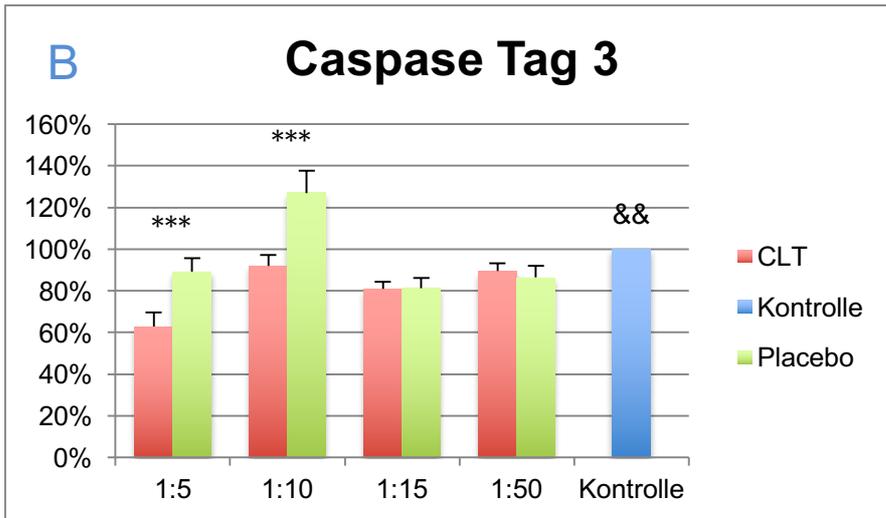


Abbildung 19 A-C: Säulendiagramm zu den Werten des Caspase-Tests. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: *** $p < 0,001$ und ** $p < 0,01$ für die Unterschiede der gleichen Konzentration zwischen den beiden Substanzen. ### $p < 0,001$ für die Unterschiede zwischen Kontrolle und 1:50-CLT. && $p < 0,01$ und & $p < 0,05$ für die Unterschiede zwischen Kontrolle und 1:50P.

Für die Positivkontrolle des Caspase-Tests wurde Staurosporin (St) in 3 μm -, 0,9 μm -, 0,6 μm - und 0,3 μm -Verdünnung verwendet. Dieser Plausibilitätstest für den Caspase-Assay zeigte am ersten Tag einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Apoptose.

3.3.4 Migrations-Assay

Der Migrations-Assay gibt Auskunft darüber, in welchem Maße bFGF die Migration der Tenonfibroblasten hin zum Fibronectin induziert und welche Rolle dabei die verschiedenen CLT- und Placebokonzentrationen spielen. In den unbeschichteten Wells der background-Gruppe fand sich keine wesentliche Migration (Tabelle 10, Abbildung 23). Zu erwähnen ist, dass in der background-Gruppe – vom Protokoll abweichend - Zellen verwendet wurden. In den Fibronectin-beschichteten Wells hingegen fand eine Migration in sämtlichen CLT- und Placebo-Konzentrationsgruppen statt, die durch die Zugabe von bFGF noch verstärkt wurde.

Die Kontrollgruppe mit bFGF wurde als 100 % definiert. Im Vergleich dazu erreichte die Kontrollgruppe ohne bFGF einen Wert von $80,11 \% \pm 7,13 \%$ und lag damit statistisch signifikant unter der Kontrollgruppe mit bFGF (Tabelle 10). Dieser Sachverhalt ist auch in der Immunfluoreszenz-Färbung gut erkennbar (Abbildung 23).

Die Werte des Migrations-Assays sanken mit höherer Konzentration der Substanz CLT bzw. Placebo. So betrug der Wert für die 1:50 CLT-Verdünnung $97,32 \% \pm 8,43 \%$ und für die 1:5 CLT-Verdünnung $32,56 \% \pm 3,11 \%$ der Kontrolle (Tabelle 10). Die zunehmende Anzahl der migrierten Zellen bei abnehmender Konzentration von CLT ist auch in der Immunfluoreszenz-Färbung in Abbildung 21 gut erkennbar.

Auch die Placebo-Versuchsreihe zeigte bei der 1:50-Verdünnung mit $62,64 \% \pm 5,98 \%$ einen höheren Wert als die 1:5-Verdünnung mit $28,79 \% \pm 1,11 \%$ der Kontrolle (Tabelle 10). Dies ist auch in der Immunfluoreszenz-Färbung der Abbildung 22 gut erkennbar. Beim Vergleich der 1:50-Werte zur Kontrolle+bFGF-Gruppe erzielte die 1:50P-Gruppe mit $62,64 \% \pm 5,98 \%$ im Vergleich zu $100 \% \pm 8,33 \%$ einen statistisch signifikanten Unterschied (Abbildung 20, Tabelle 10).

Die Werte stiegen sowohl in der Placebo- als auch in der CLT-Versuchsgruppe kontinuierlich ohne Ausreißer von der 1:5- bis zur 1:50-Verdünnung an (Tabelle 10).

Tabelle 10: Durchschnittswerte des Migrations-Assays

1:5	1:10	1:15	1:50
32,56 % ± 3,11 %	43,26 % ± 3,01 %	47,60 % ± 4,23 %	97,32 % ± 8,43 %
1:5P	1:10P	1:15P	1:50P
28,79 % ± 1,11 %	41,36 % ± 2,68 %	49,41 % ± 1,59 %	62,64 % ± 5,98 %
K + bFGF	K - bFGF	background	
100 % ± 8,33 %	80,11 % ± 7,13 %	27,29 % ± 1,78 %	

Bei der Analyse der gleichen Konzentrationen von CLT bzw. Placebo bestand lediglich bei der 1:50-Verdünnung statistisch gesehen ein signifikanter Unterschied (Abbildung 20). Während die CLT-Konzentration in einer Verdünnung von 1:50 einen Wert von 97,32 % ± 8,43 % aufwies, lag die Placebo-Konzentration derselben Verdünnung mit 62,64 % ± 5,98 % signifikant darunter (Tabelle 10). Die Migrationshemmung war daher in der Placebo-Gruppe bei dieser Verdünnung stärker.

Bei der Kontrolle-bFGF sind höhere Werte als bei fast allen Verdünnungen mit Ausnahme von CLT 1:50 ersichtlich. Es wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass zwischen den Werten der Kontrolle-bFGF und Kontrolle+bFGF alle anderen Werte liegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl CLT als auch Placebo dosisabhängig die bFGF-induzierte Migration der Tenonfibroblasten durch die FN-beschichteten Wells hemmen. Da sich CLT und Placebo jedoch nur in der 1:50-Verdünnung signifikant unterscheiden, lässt sich daraus folgern, dass CLT im Migrationsversuch keine Wirkung zeigt.

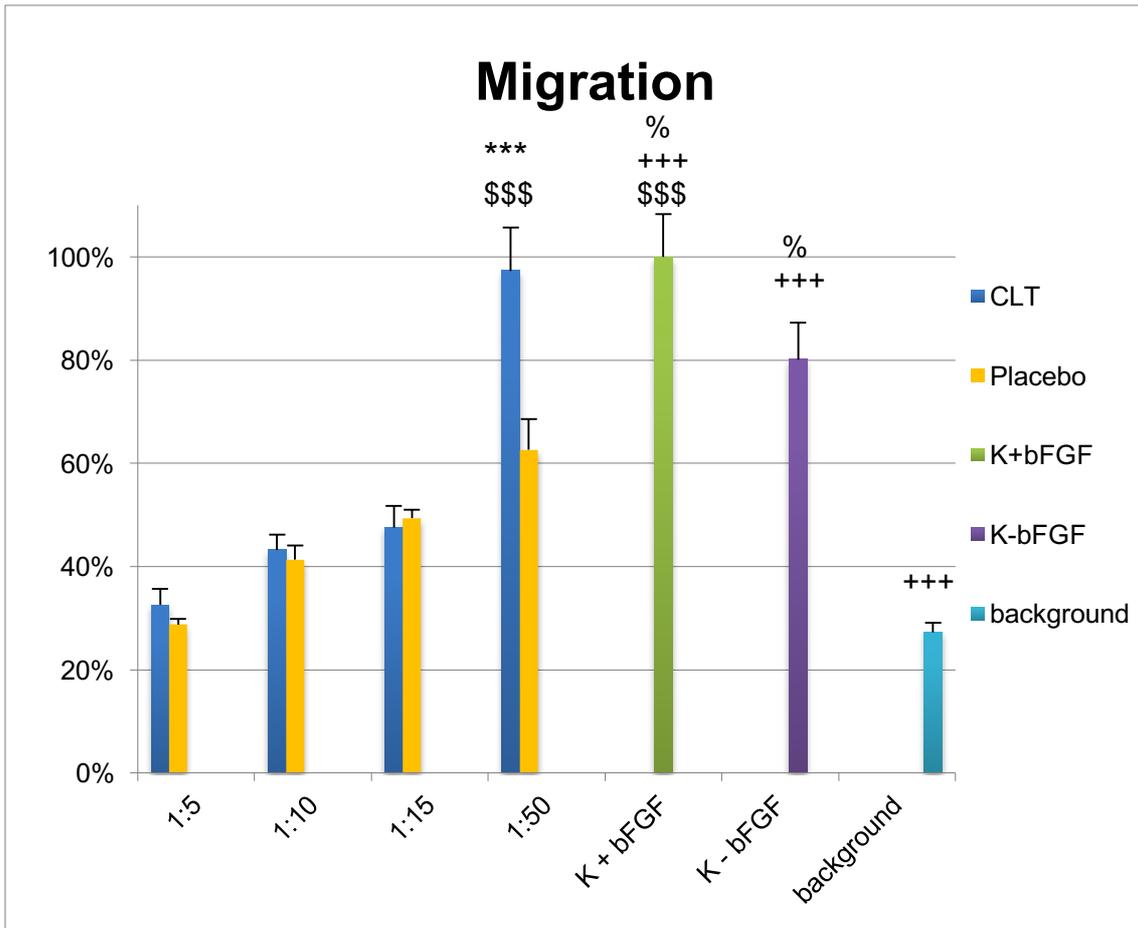


Abbildung 20: Säulendiagramm zu den Werten des Migrations-Assays. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für einen signifikanten Unterschied zwischen folgenden Werten: *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen 1:50 CLT und 1:50P. % $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zwischen K+bFGF und K-bFGF, +++ $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen der background- und der K+bFGF-/K-bFGF-Gruppe, \$\$\$ $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen K+bFGF und 1:50P.

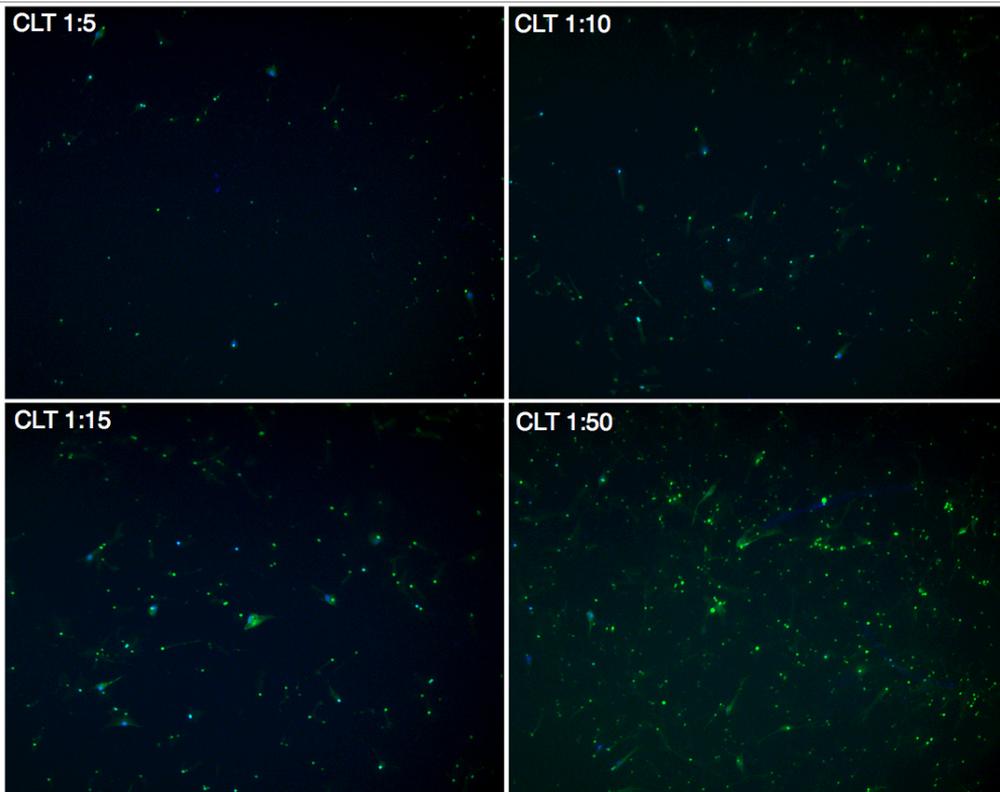


Abbildung 21: Repräsentative Bilder der Calcein- und DAPI-Färbung des Migrations-Assays der CLT-Verdünnungen

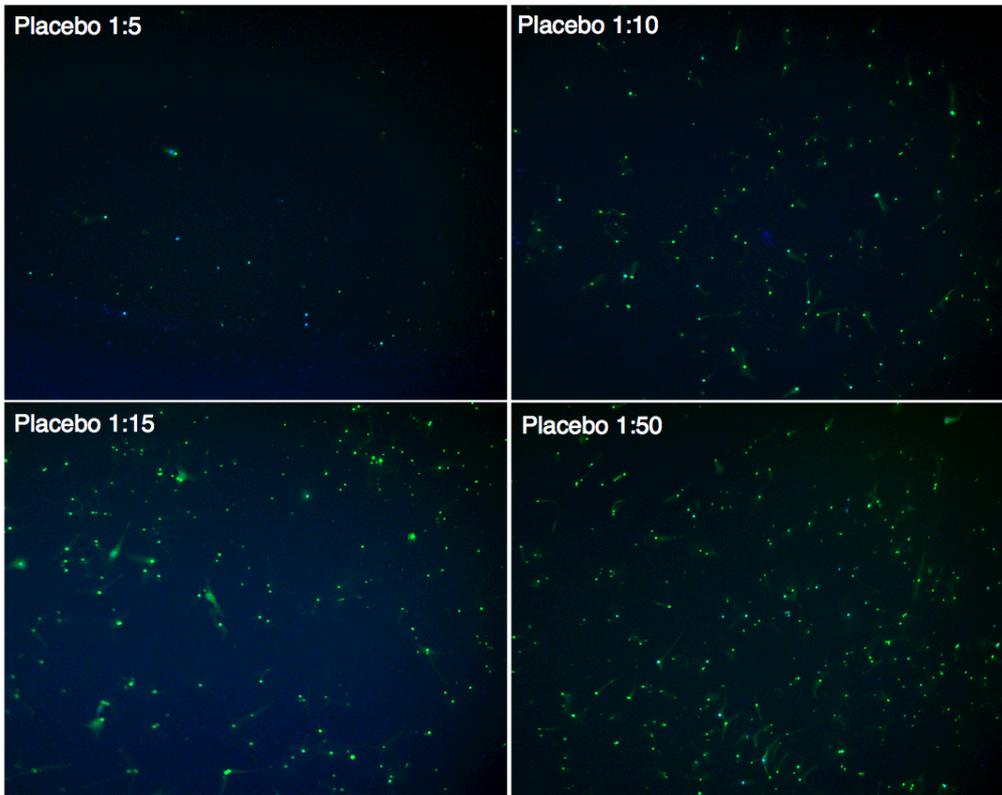


Abbildung 22: Repräsentative Bilder der Calcein- und DAPI-Färbung des Migrations-Assays der Placebo-Verdünnungen

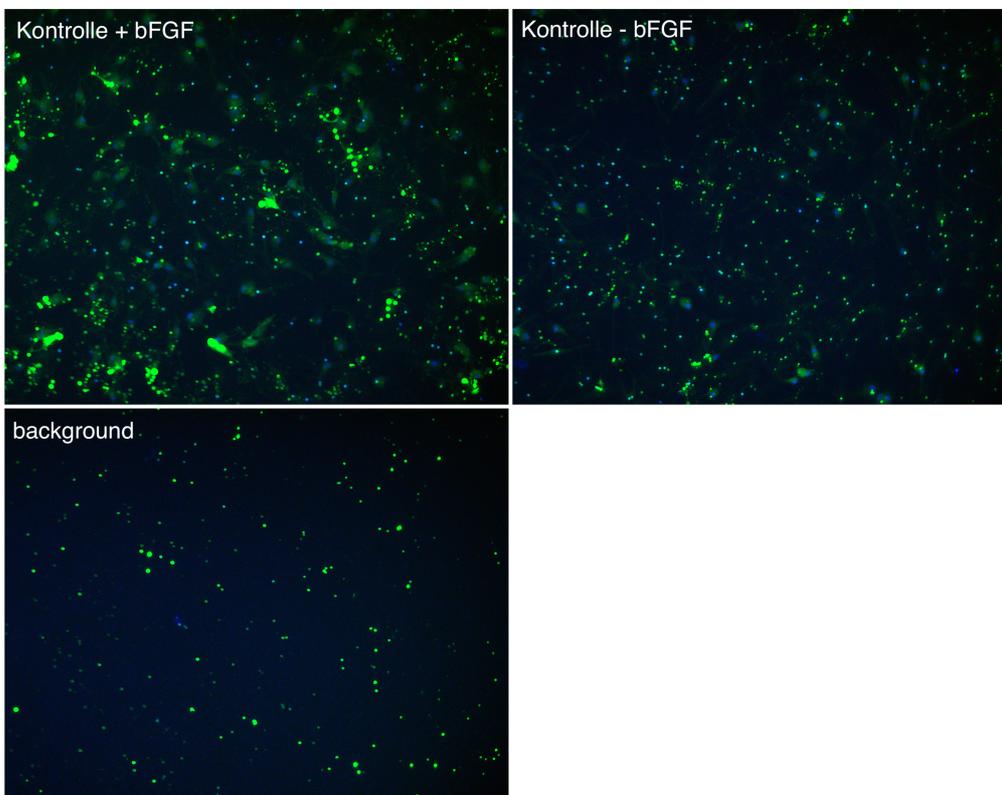


Abbildung 23: Repräsentative Bilder der Calcein- und DAPI-Färbung des Migrations-Assays der Kontrollen und des backgrounds

3.3.5 Adhäsions-Assay

Der Adhäsions-Assay gibt Auskunft darüber, in welchem Maße CLT bzw. Placebo die Zelladhäsion in FN-beschichteten Wells beeinflusst. Der Kontrollwert wurde als 100 % definiert und die anderen Werte dazu in Bezug gesetzt.

Je stärker die Konzentration von CLT bzw. Placebo, der die Zellen ausgesetzt waren, desto mehr adhärenente Zellen konnten im anschließenden KV-Test nachgewiesen werden. So betrug bei der 1:5 CLT-Verdünnung der Wert des Adhäsions-Assays 132,35 % ± 10,85 %, bei der 1:50er-Verdünnung nur noch 99,48 % ± 5,97 % (Tabelle 11). Auch bei den Konzentrationen des Placebowirkstoffs zeigte sich ein ähnliches Bild. In der 1:5 Placebo-Verdünnung betrug der Wert 104,94 % ± 4,93 %, bei der 1:50 Verdünnung nur noch 95,58 % ± 3,20 % (Tabelle 11). In der unbeschichteten background-Gruppe zeigte sich mit 75,72 % ± 6,28 % die niedrigste Adhäsion zwischen den Zellen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Durchschnittswerte des Adhäsions-Assays

1:5 CLT	1:10 CLT	1:15 CLT	1:50 CLT
132,35 % ± 10,85 %	119,69 % ± 3,75 %	106,50 % ± 3,08 %	99,48 % ± 5,97 %

1:5P	1:10P	1:15P	1:50P
104,94 % ± 4,93 %	103,21 % ± 3,72 %	97,92 % ± 6,12 %	95,58 % ± 3,20 %

background	Kontrolle
75,72 % ± 6,28 %	100 % ± 7,32 %

Beim Vergleich derselben Konzentrationen lagen zwischen CLT und Placebo bei der 1:5- und der 1:10-Verdünnung statistisch gesehen signifikante Unterschiede vor (Abbildung 24). Die 1:5 CLT-Verdünnung befand sich mit 132,35 % ± 10,85 % signifikant über der Placebo-Verdünnung von 104,94 % ± 4,93 % (Tabelle 11). Auch in der 1:10-Verdünnung war CLT mit 119,69 % ± 3,75 % signifikant über der Placebo-Verdünnung von 103,21 % ± 3,72 % (Tabelle 11). Dass CLT pro-adhärenent wirkt, zeigte sich durch den statistisch signifikant höheren Wert von 1:5 CLT im Vergleich zum Kontroll-Wert (1:5 CLT 132,35 % ± 10,85 %, Kontrolle 100 % ± 7,32 %). Die Placebo-Gruppe hingegen unterschied sich nicht statistisch signifikant von der Kontroll-Gruppe.

Adhäsion

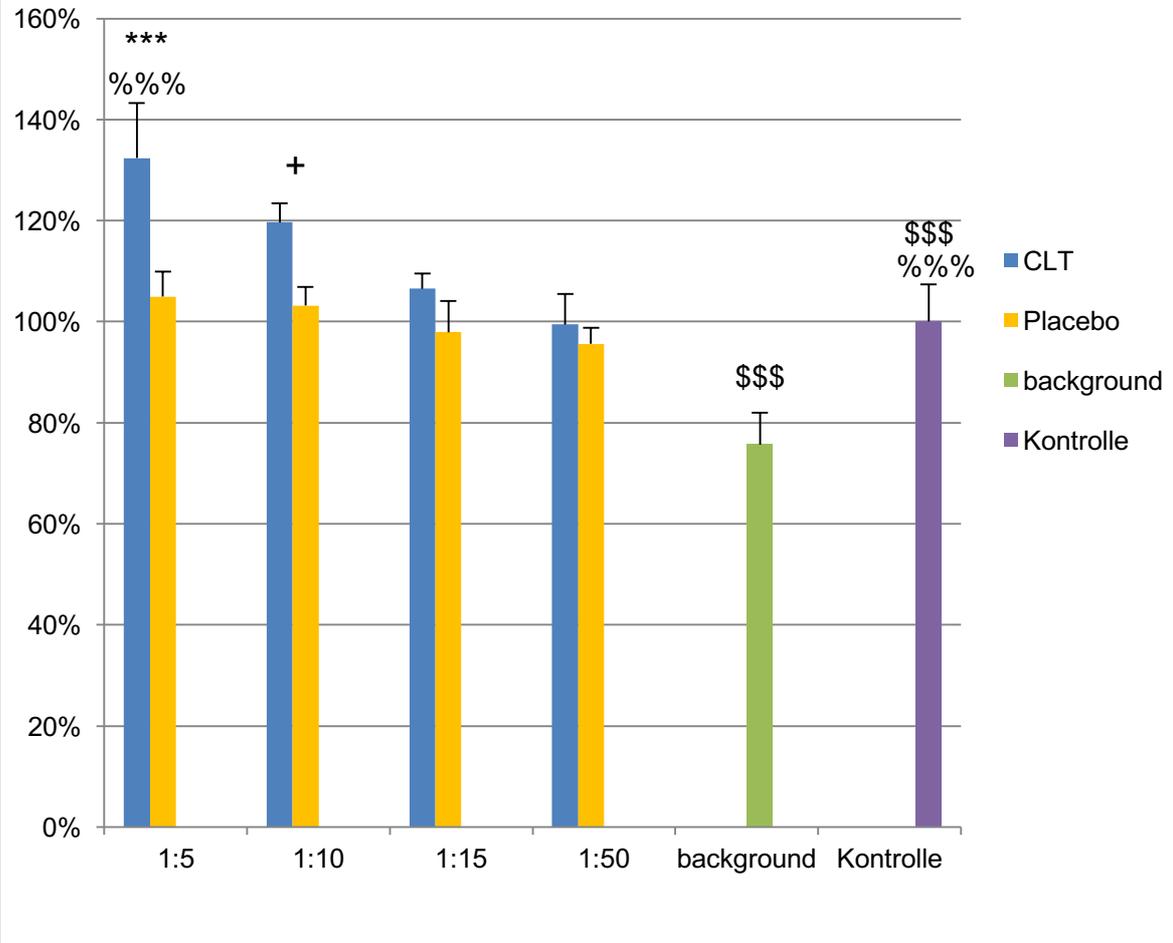


Abbildung 24: Säulendiagramm zu den Werten des Adhäsions-Assays. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für einen signifikanten Unterschied zwischen folgenden Werten: *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen 1:5 CLT und 1:5P. + $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zwischen 1:10 CLT und 1:10P. \$\$\$ $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der background-Gruppe, %%% $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der CLT-Gruppe.

4 Diskussion

Allgemein: CLT-28643 bietet als $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibitor durch seine sowohl antifibrotische als auch antiangiogenetische Wirkung beste Voraussetzungen für den Wundheilungsprozess der Trabekulektomie. Ziel dieser Studie war es, mit Hilfe eines Trabekulektomiemodells an Kaninchen, die durch CLT-28643 induzierte Hemmung der Narbenbildung zu beobachten. Des Weiteren sollte gezeigt werden, dass CLT-28643 ohne toxische Nebenwirkungen die Erfolgsquote dieser speziellen Glaukomoperation verbessert.

Hauptergebnisse: Die drei Studiengruppen, die einer antifibrotischen Therapie unterzogen wurden (MMC, CLT+ und CLT++), wiesen einen beträchtlich längeren Erfolg in der Überlebenszeit der Sickerkissen auf als die Kontroll-OP-Gruppe (Abbildung 6, Abbildung 7). Zudem zeigten sich bessere IOP-Werte sowie ein besserer Bleb Score der Filterkissen im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe (Abbildung 3, Abbildung 8, Abbildung 9).

MMC: Die MMC-Gruppe zeigte hinsichtlich der Überlebenszeit der Filterkissen einen statistisch signifikanten Vorteil im Vergleich zu der CLT+, jedoch nicht zu der CLT++ Gruppe (Abbildung 6, Abbildung 7). Bei der Beurteilung der Morphologie der Filterkissen anhand des WBCS tendierte die MMC-Gruppe zudem vor allem zum Studienende hin zu besseren Ergebnissen (Abbildung 8, Abbildung 9). Dass am 28. postoperativen Tag die MMC-Gruppe einen statistisch signifikant besseren Bleb Score als die beiden CLT-Gruppen aufwies, kann auch durch den apoptotischen und stark zytotoxischen Effekt des MMC erklärt werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass sobald sich ein Filterkissen – wie dies insbesondere auch bei den CLT-Gruppen vorkam – vorzeitig verschloss, der Blebscore mit 0 Punkten gewertet wurde und daher die stärkere lokale Wirkung durch die Toxizität des MMC mehr ins Gewicht fällt.

Kontroll-OP: Jedes zweite Partnerauge der drei Studiengruppen wurde einer Trabekulektomie ohne adjuvante Medikation unterzogen und zählte somit zur

Kontroll-OP-Gruppe. Hinsichtlich der Partneraugen erfolgte in der MMC-, CLT+ und CLT++ Gruppe dieselbe Aufteilung. Es wäre jedoch möglich, dass die Ergebnisse der Kontroll-OP-Gruppe etwas anders ausfielen, hätten die Partneraugen die jeweils gleiche adjuvante Medikation oder keine adjuvante Medikation wie die anderen Behandlungsgruppen gehabt. Dadurch, dass aus Tierschutz-Gründen eine Beschränkung der Zahl an Versuchstieren gefordert ist, wurden wir jedoch dazu angehalten, die Hälfte der linken Augen für die Kontroll-OP-Gruppe zu nutzen.

Zeitraum: Die Studie wurde vier Wochen nach der Trabekulektomie beendet. Es zeigte sich jedoch, dass am 28. postoperativen Tag 75 % der Filterkissen der MMC-Gruppe immer noch in Funktion waren. Dies lässt den Schluss zu, dass die Studie möglicherweise nicht gänzlich den Zeitraum, der nötig gewesen wäre, um den klinischen Erfolg beurteilen zu können, abdeckt. Nichtsdestotrotz zeigte sich in dem untersuchten postoperativen Zeitraum der antifibrotische Effekt des CLT-28643 sowie die Verbesserung der Erfolgsrate einer Trabekulektomie durch CLT-28643 in einer ähnlichen Weise wie das bisher bekannte MMC.

Blebscore-Allgemein: Bei der Beurteilung des Bleb Scores, der die Morphologie der Filterkissen bewertet, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Erhebung auch subjektiven Entscheidungen unterliegt und somit die Einzelscore-Werte nicht überbewertet werden dürfen. Besser eignet sich hierfür der Gesamtscore, da dieser mehrere Daten in sich vereint und verschiedene Aspekte des Filterkissens bewertet.

Blebscore-Mikrozysten: Während der Beurteilung der Bleb Scores entwickelten sich während der gesamten Versuchsdauer bei keinem der Filterkissen Mikrozysten. Dies war jedoch im Kaninchen-Operationsmodell nicht überraschend, da Kaninchen eine viel stärkere Vernarbungstendenz als Menschen zeigen. In anderen Studien konnten Mikrozysten nur sehr selten bei Kaninchen beobachtet werden und falls welche auftraten, wiesen diese eine andere Struktur als die

beim Menschen vorkommenden Mikrozysten auf. Es wird angenommen, dass der Mangel an Mikrozysten bei Kaninchen auch darauf zurückzuführen ist, dass die Konjunktiva histologisch gesehen einen von der menschlichen Konjunktiva abweichenden Aufbau aufweist. Während die menschliche Konjunktiva sechs Zellschichten aufweist, besitzen Kaninchen lediglich zwei bis drei konjunktivale Zellschichten [69, 70].

IOP-Tonopen: In Bezug auf den IOP stellte sich bei mehrmaligem Messen mit dem Tonopen heraus, dass die Messwerte stark variierten und schwer zu reproduzieren waren. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Messungen mit dem Tonopen im Gegensatz zu den Messungen mit dem Schiötz-Tonometer stets am wachen Tier durchgeführt wurden. Dies könnte zu Artefakten geführt haben, da die Köpfe der Versuchstiere für die Messung manuell fixiert werden mussten und so versehentlich Druck auf die Augen ausgeübt worden sein konnte. Auch das Blinzeln der wachen Tiere bzw. deren Abwehrhaltung kann hierbei nicht außer Acht gelassen werden. Des Weiteren wurde der Tonopen ursprünglich für den Gebrauch am Menschen konzipiert, auch wenn er nun häufig Anwendung für die Druckmessung am Kaninchen findet. Es ist zudem auch bekannt, dass der Tonopen für die Beurteilung von sehr niedrigen Augendruckwerten, wie dies insbesondere nach Trabekulektomie-Operationen der Fall ist, weniger zuverlässig ist. Eine Druckmessmethode führt nur dann zu verlässlichen Werten, wenn wiederholte Messungen innerhalb weniger Minuten eine Wertevervariabilität von weniger als 3 mmHg aufweisen. Bei Messungen des Tonopens lag die Wertevervariabilität in unserem Versuch jedoch meist deutlich über 3 mmHg (drei Beispielmessungen: 10 mmHg, 16 mmHg, 8 mmHg). Der iCare Tonometer lieferte bei Messversuchen an Kaninchenaugen sogar noch schlechtere Ergebnisse, so dass dieser für uns nicht als Alternative in Frage kam. Infolgedessen entschieden wir uns, lediglich die Messwerte des Schiötz Tonometers in die Endauswertung aufzunehmen, auch wenn dies eine Untersuchung der Tiere in Narkose erforderte.

Die beiden CLT-Gruppen erreichten hinsichtlich der Drucksenkung zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Kon-

troll-OP-Gruppe. Trotz allem verlängerte die CLT-Behandlung den Effekt der Drucksenkung. In der CLT++ Gruppe konnte eine Drucksenkung beobachtet werden, die ähnlich der der MMC-Gruppe verlief. Die MMC-Gruppe erreichte lediglich am letzten Tag der Studie einen statistisch signifikanten Unterschied (Abbildung 3). Hieraus ist ersichtlich, dass hinsichtlich der Druckwerte die kombinierte intra- und postoperative Anwendung von CLT durchaus eine Alternative zur herkömmlichen Anwendung von MMC darstellt.

Zusammenhang zwischen IOP und Narkose: Bei der Entwicklung des IOPs fällt auf, dass der IOP der unbehandelten Gruppe ab dem dritten postoperativen Tag unerwartet etwas niedriger ist als der IOP an Tag 0 (Abbildung 3, Abbildung 4B, Abbildung 5). Dieser Effekt kann durch die bei dem Eingriff verwendeten Anästhetika erklärt werden. Wie bereits bekannt, wird der IOP bei einer Vollnarkose durch die eingesetzten Narkotika über einen gewissen Zeitraum gesenkt. Für die präoperativen Untersuchungen erfolgte die Ermittlung der IOP-Werte unmittelbar nach Injektion der Narkotika. Die postoperativen Ermittlungen des IOP hingegen erfolgten erst, nachdem bei den narkotisierten Kaninchen die Beurteilung der Morphologie der Filterkissen abgeschlossen war und Fotografien derselben angefertigt wurden. Diese Reihenfolge der Untersuchungen war notwendig, um Veränderungen der Morphologie des Filterkissens durch die Druckmessung zu vermeiden. Dies ist vermutlich der Grund für das Absinken der postoperativ ermittelten IOP-Werte. Da wir jedoch die postoperativen Nachuntersuchungen jedes Mal auf die gleiche Art und Weise durchführten, blieb der Zeitraum, bis der IOP gemessen werden konnte, stets gleich. Höchstwahrscheinlich blieb der IOP der unbehandelten Gruppe ab dem dritten postoperativen Tag durch diesen Grund auch relativ stabil und zeigte nur geringe Schwankungen (Abbildung 4B).

Histologie der Narben: Es ist bekannt, dass Narben im Laufe der Zeit dünner werden. Vor allem die Kollagenablagerung und die Narbendicke im Operationspalt sind davon betroffen. Da die Filterkissen der verschiedenen Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten versagten, die histologische Auswertung jedoch

am letzten Studientag (Tag 28) erfolgte, muss man die histologischen Ergebnisse mit Vorsicht interpretieren (Abbildung 6). Nichtsdestotrotz zeigte die Kontroll-OP-Gruppe statistisch gesehen mehr subkonjunktivale Kollagenablagerung als die CLT+ Gruppe (Abbildung 14A). Und dies, obwohl die Filterkissen der Kontroll-OP-Gruppe früher versagten als die der CLT+ Gruppe. Dadurch ist es sehr wahrscheinlich, dass CLT auch an der Konjunktiva einen antifibrotischen Effekt erzielt.

Sicherheit/Toxizität: Ein wichtiger Punkt in der Medikamentenanwendung ist die Sicherheitsfrage. Sowohl CLT als auch MMC erwiesen sich während der gesamten Studienzeit als sicher. Es kam weder zu toxischen Reaktionen noch zu einer übermäßigen oder verlängerten Entzündungsreaktion im oder am Auge. Als einzige Nebenwirkung zeigte sich eine deutliche Verminderung der Anzahl von Becherzellen unter MMC. Die MMC-Gruppe wies im Vergleich mit den anderen Gruppen die niedrigste Durchschnittszahl an Becherzellen auf. Verglichen mit der Kontroll-OP-Gruppe erreichte dieser Unterschied eine statistische Signifikanz (Abbildung 14D). Die CLT-Gruppen hingegen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontroll-OP-Gruppe. Es ist jedoch zu beachten, dass die CLT-Gruppen im Vergleich zur MMC-Gruppe keine signifikant höhere Anzahl an Becherzellen zeigten, so dass eine milde Toxizität von CLT nicht gänzlich auszuschließen ist. Eine Studie mit einer Länge von 28 Tagen lässt auch keine beweisenden Rückschlüsse auf eine langfristige Sicherheit zu. Vor allem MMC ist, wie bereits erläutert, dafür bekannt, spätfolgende Komplikationen auszulösen, die bis zu Monaten oder Jahren nach der OP auftreten können. Diese konnten aufgrund der kurzen Dauer der Studie nicht näher analysiert werden. Das Ergebnis deutet jedoch darauf hin, dass CLT-28643 besser verträglich sein könnte als MMC.

MMC-(Neben)Wirkungen, CLT als Alternative?: MMC inhibiert durch Alkylierung irreversibel die DNA-Replikation und die Proteinbiosynthese [43, 71]. MMC ist daher in der Lage, die Fibroblastenproliferation zu stoppen, damit die Narbenbildung abzuschwächen und somit für eine Verbesserung der Funktion und

des Überlebens der Filterkissen zu sorgen [42]. Leider führt die antiproliferative und toxische Wirkung des MMC auch zu der Ausbildung sehr dünner und avaskulärer Filterkissen, die für Langzeitprobleme, wie Endophthalmitiden und irreversiblen Hypotonien verantwortlich sind [44, 45].

Zudem zerstört die starke Zytotoxizität des MMC auch Blutgefäße und verhindert somit das Eintreten einer postoperativen Entzündungsreaktion. Dieser Effekt kann von CLT-28643 als Integrininhibitor nicht erwartet werden. Entzündungsreaktionen, die zum Versagen von Filterkissen beitragen, können möglicherweise durch eine alleinige Monotherapie von Integrininhibitoren jedoch nicht ausreichend verhindert werden. In unserer Studie wurden keine adjuvanten Steroide, wie beispielsweise Dexamethason, verwendet, damit der alleinige Effekt von CLT-28643 unverfälscht objektiviert werden kann. In einer klinischen Situation würden jedoch topische Steroide postoperativ Anwendung finden. Diese Steroide würden dazu beitragen, nicht nur mögliche Entzündungsreaktionen, sondern auch die Vaskularisation zu hemmen und möglicherweise damit den positiven Effekt von CLT-28643 zu verstärken.

Vaskularisation: Vor allem die Vaskularisation der Filterkissen scheint von besonderer Bedeutung zu sein. Einerseits wird eine ausgeprägte Vaskularisation und besonders die Anwesenheit von Korkenziehergefäßen in der frühen postoperativen Phase mit einem frühen Versagen der Filterkissen in Zusammenhang gebracht [72]. Avaskuläre Filterkissen hingegen zeigen ein längeres Überleben. Andererseits hängen Komplikationen wie beispielsweise die Undichtigkeit des Filterkissens oder späte Infektionen mit der Größe der avaskulären Bereiche auf dem Filterkissen zusammen [73]. Das Vorhandensein eines avaskulären Filterkissens beinhaltet also große Vor- und Nachteile. Wünschenswert wäre ein antifibrotisches Medikament, welches zur gleichen Überlebensrate der Filterkissen wie MMC, jedoch nicht zu avaskulären Filterkissen und konjunktivaler Ausdünnung führt. Daher besteht ein großer Bedarf für ein weniger toxisches und sogleich spezifischer antifibrotisches Medikament als MMC.

In unserer Studie konnten lediglich in der MMC-Gruppe avaskuläre Filterkissen beobachtet werden. In allen anderen Gruppen waren die Filterkissen während

der gesamten Studiendauer vaskularisiert. Auch der Einzelscore des Bleb Scores für Vaskularisation war in der MMC-Gruppe mit Ausnahme des ersten postoperativen Tags stets am höchsten (Abbildung 10A). Dies bedeutet, dass die Filterkissen der MMC-Gruppe den niedrigsten Vaskularisationsgrad aufwiesen. Ähnlich zur MMC-Gruppe zeigten die Filterkissen der beiden CLT-Gruppen einen geringen Grad an Vaskularisation, welcher für das Überleben der Filterkissen von Vorteil ist. Ab dem 14. postoperativen Tag nahm die Vaskularisation der CLT-Gruppen jedoch kontinuierlich zu (Abbildung 10A). Hierin kann der Vorteil gesehen werden, dass durch die nicht gänzlich avaskulären Filterkissen Langzeitkomplikationen wie Infektionen oder Undichtigkeiten vermieden werden könnten.

Im Gegensatz zum Vaskularisationsgrad blieb die Anzahl an Korkenziehergefäßen der beiden CLT-Gruppen bis zum 24. postoperativen Tag konstant niedrig (Abbildung 10B). Das späte Absinken des Scores ist dem finalen Versagen der Filterkissen zuzuschreiben, da ein Filterkissen, welches nicht mehr funktionsfähig war, stets mit 0 Punkten in jedem Einzelscore bewertet wurde. Daher ist ersichtlich, dass die wiedereinsetzende Vaskularisation der Filterkissen nach dem 14. postoperativen Tag bei den beiden CLT-Gruppen hauptsächlich aus normalen Blutgefäßen und nicht aus Korkenziehergefäßen bestand (Abbildung 10A-B). Gemäß den beschriebenen pathophysiologischen Überlegungen hinsichtlich der Vaskularisation von Filterkissen, ist die Entwicklung der Vaskularisation in den beiden CLT-Gruppen als günstig anzusehen, da die Filterkissen eine vorteilhafte Vaskularisation mit nur vereinzelt Korkenziehergefäßen aufwiesen. Unterstützend für die leicht antiangiogene Wirkung von CLT konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass durch die Inhibition von $\alpha 5\beta 1$ -Integrinen die corneale Neovaskularisation bei einer Hornhautwunde vermindert werden konnte [74].

Wundheilung: Die Expression von α -SMA verstärkt die Kontraktilität der Fibroblasten, kennzeichnet die Kontraktionsphase der Bindegewebsreparatur und ist der am häufigsten eingesetzte Marker für Myofibroblasten [75]. Wenn die Gewebshheilung erfolgt ist, sterben in einem physiologischen Prozess die Myo-

fibroblasten durch Apoptose ab und es besteht daher danach auch keine Expression von α -SMA mehr [76]. In einer pathologischen Wundheilungssituation, unterliegen die Myofibroblasten nicht der Apoptose, so dass auch die α -SMA-Expression bestehen bleibt und sich eine hypertrophe Narbe entwickelt [77]. TGF- β 1 wird als der Haupt-Wachstumsfaktor in der Entwicklung von Myofibroblasten, welche zur α -SMA-Expression führt, angesehen [78]. Des Weiteren reguliert TGF- β 1 die Expression von α 5 β 1-Integrin und dessen Liganden Fibronectin hoch [79]. α 5 β 1-Integrin und Fibronectin sind Bestandteil der fokalen Adhäsionsstellen [77], welche während der Differenzierung der Myofibroblasten gebildet werden und den Verankerungsstellen der Myofibroblasten in der Extrazellulärmatrix ähneln. Über diese fokalen Adhäsionsstellen sind die Myofibroblasten in der Lage, mechanische Belastung wahrzunehmen. Erhöht sich die mechanische Belastung, so wird vermehrt TGF- β 1 ausgeschüttet und die Expression von α -SMA nimmt zu. α 5 β 1-Integrin und Fibronectin vermitteln diesen TGF- β 1-Signalweg, der über eine Autophosphorylierung und Aktivierung einer Kinase an den fokalen Adhäsionsstellen zur Myofibroblasten-Differenzierung führt. Dieser Signalweg ist essentiell für die Induktion und Aufrechterhaltung des differenzierten Myofibroblasten-Phänotyp [79]. CLT-28643 blockiert die α 5 β 1-Integrine und vermindert dadurch die Wundheilung nach einer Trabekulektomie.

Zusätzlich ist wohl bekannt, dass die Rezeptordichte die Migrationsrate der Fibroblasten beeinflussen kann [80]. Wenn CLT-28643 als α 5 β 1-Integrin-Inhibitor auf der Konjunktiva angewendet wird, werden α 5 β 1-Integrine inhibiert. Dadurch sollte die Adhäsion der Fibroblasten an die Extrazellulärmatrix vermindert werden und die Migrationsantwort könnte sogar verstärkt werden. Interessanterweise wurde gerade zu diesem Aspekt eine experimentelle Studie veröffentlicht. Joo et al. verstärkte durch eine Behandlung mit Trichostatin A (TSA) die α 5 β 1-Integrin-Expression von Fibroblasten, so dass die Migrationsgeschwindigkeit abnahm. Wurden die Fibroblasten mit niedrigen Konzentrationen von inhibierenden α 5 β 1-Integrin-Antikörpern inkubiert, so wurde die Fibroblastenmigration fast vollständig wiederhergestellt. Wurden die Fibroblasten jedoch mit hohen

Konzentrationen inkubiert, so blieb die Migrationsrate auf einem niedrigen Niveau. Des Weiteren führte die Inkubation mit ausschließlich hohen Konzentrationen an inhibierenden $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Antikörpern selbst zu einer Reduktion der Migrationsrate [81]. Dadurch ist es sehr wahrscheinlich, dass der $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibitor CLT-28643 die Migrationsantwort der Fibroblasten verändert. Es ist jedoch unklar, ob dies zu einer verstärkten oder abgeschwächten Migrationsantwort führt.

In einer weiteren Studie, in der ein anderer $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibitor sowohl mit Zelllinien als auch mit Primärzellen getestet wurde, zeigte sich eine konstante Inhibierung der Migration von Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen [67, 82]. Daher ist es möglich, dass das beobachtete verlängerte Überleben der Filterkissen unter CLT-28643 auf die kombinierte Wirkung durch einerseits die Inhibierung der Migrationsantwort der Fibroblasten so wie andererseits durch die Inhibierung der Fibrose zurückzuführen ist.

In unserer Studie zeigte sich im Adhäsionsversuch eine pro-adhärenente Wirkung von CLT. Dies war durch den statistisch signifikant höheren Wert von 1:5 CLT im Vergleich zum Kontroll-Wert ersichtlich (Abbildung 24). Normalerweise wäre jedoch zu erwarten, dass CLT durch die $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibition die Fibroblastenadhäsion hemmt. Somit konnte die oben erläuterte molekulare Grundlage in unserem Adhäsionsversuch nicht nachgewiesen werden.

Bezüglich der Migration ist aus molekularer Sicht durch Einsetzen von CLT als $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibitor eine veränderte Antwort zu erwarten. In unserer Studie zeigte sich jedoch, dass CLT im Migrationsversuch keine Wirkung zeigt, denn CLT und Placebo unterschieden sich nur in der 1:50-Verdünnung signifikant (Abbildung 20).

Immunhisto/Integrin-Expression: Durch den Studienaufbau ist es leider nicht möglich, die Wirkung des $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibitors auf die $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Expression zu erläutern, da durch die Aufbereitung der Schnitte für die Immunhistochemie genau die interessierenden Anteile des Gewebes durch Zerstörung der Sklera verloren gingen. Auch eine Vorbehandlung der Schnitte mit Pronase

oder Proteinkinase K, welche zu einer besseren Erhaltung der Gewebe führte sowie eine Anwendung höherer Konzentrationen der Antikörperlösung für eine angemessene Qualität der Schnitte führte zu keinem zusätzlichem Informationsgewinn. Die immunhistochemische Färbung wurde 28 Tage nach dem Eingriff, nachdem alle Tiere getötet wurden, durchgeführt. Das bestätigt frühere Untersuchungen. In einer bisher noch nicht veröffentlichten Studie wurden Mäuseaugen an verschiedenen Zeitpunkten nach einer Trabekulektomie histologisch auf die Anwesenheit von $\alpha 5\beta 1$ -Integrin mit Hilfe einer $\alpha 5\beta 1$ -Integrinspezifischen Färbung hin untersucht. Bei der Evaluierung der konjunktivalen Vernarbung in dieser Studie wurde festgestellt, dass die Integrin-Expression am 28. postoperativen Tag nur minimal vorhanden war. Diese Studie an Mäusen zeigte, dass $\alpha 5\beta 1$ -Integrine nach dem Eingriff an der Operationsseite exprimiert werden und am dritten postoperativen Tag ihren Höhepunkt erreichen. An den darauffolgenden Tagen nimmt die Expression allmählich ab, bis sie am 28. Tag ein fast nicht mehr nachweisbares Niveau erreicht. Am 28. Tag gab es keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des Niveaus der Myofibroblastenaktivierung. Daher nehmen wir an, dass die SMA-Expression ähnlich wie die $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Expression zu einem früheren Zeitpunkt in unserem Modell ihren Höhepunkt erreichte.

Zellkulturteil: Im Zellkulturteil konnten die den klinischen und histologischen Ergebnissen zugrundeliegenden Zellmechanismen nachgewiesen werden.

Im MTS-Test, der die Viabilität der Zellen erfasst bzw. indirekt den zytotoxischen Effekt durch den Verlust vitaler Zellen kenntlich macht, schnitten die CLT-Konzentrationen bis auf wenige Ausnahmen mit einem statistisch signifikant niedrigeren Testergebnis als die gleichwertigen Placebo-Konzentrationen ab (Abbildung 16). Dies impliziert einen viabilitätshemmenden Effekt von CLT auf die kultivierten Tenonfibroblasten. Zudem stiegen die Werte mit immer schwächer konzentriertem CLT bzw. Placebo an.

Zu beachten ist, dass durch das Verdünnen der Substanzen zwischen den einzelnen Konzentrationsgruppen keine konstante Menge an zugefügtem Nähr-

medium eingehalten werden konnte. Bei der niedrigsten Verdünnung von 1:5 wurde dementsprechend weniger Nährmedium verwendet als bei den stärkeren Verdünnungen. Die niedrigen Ergebnisse der stärkeren Konzentrationen können so auch durch den Mangel an Nährmedium begründet sein.

Unerwartet ist auch, dass die schwächeren Konzentrationen von CLT und Placebo im MTS-Test teilweise höhere Werte als die Kontrollgruppe erzielten (Tabelle 6). Möglicherweise wirkt CLT daher sogar viabilitätssteigernd.

Da der KV-Test die lebenden, adhärenen Zellen aus dem MTS-Test färbt und somit eine quantitative Aussage über die Anzahl der lebenden Zellen macht, unterstützt er die oben beschriebenen Ergebnisse des MTS-Tests. Denn prinzipiell zeigten höherkonzentrierte Proben fast immer einen erniedrigten Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Des Weiteren waren bei nahezu allen Konzentrationen die Placebo-Werte höher als die Werte der CLT-Gruppe (Tabelle 7, Abbildung 17). Auch die Bezugnahme des MTS-Tests auf den KV-Test verdeutlicht die bereits gewonnenen Ergebnisse: Mit höherer Konzentration von CLT und Placebo fielen die Werte ab. Dies bedeutet, dass die Viabilität der einzelnen Zelle reduziert war. Hierbei ergaben sich jedoch nur zwischen manchen Werten der gleichen Konzentration zwischen CLT und Placebo statistisch signifikante Unterschiede (Abbildung 18). Dies bedeutet, dass die relative Viabilität bei höheren Konzentrationen reduziert war. Die Werte der schwächeren Konzentrationen von CLT bzw. Placebo überstiegen aber zum Teil die Kontrollwerte (Tabelle 8). Dies bedeutet, dass hier MTS viabilitätsfördernd gewesen sein muss. Die Ergebnisse der niedrigen CLT-Verdünnungen stehen daher im Gegensatz zu den hohen Verdünnungen. Deshalb ist es am wahrscheinlichsten, dass die Viabilitätsreduktion bei hohen Konzentrationen durch den Nährstoffmangel bedingt ist, aber bei niedrigen Konzentrationen CLT sogar leicht viabilitätsfördernd ist.

Im Caspase 3/7-Assay, mit Hilfe dessen eine Aussage über das Ausmaß der Apoptose getroffen werden kann, bestanden an allen Tagen mit wenigen Ausnahmen zwischen der Placebo- und der CLT-Gruppe bei den niedrigen Kon-

zentrationen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Zudem befanden sich bei diesen Konzentrationen die Werte beider Gruppen weitestgehend im Bereich der Kontrollgruppenwerte. Bei den höheren Konzentrationen hingegen waren an Tag 3 und Tag 5 bis auf einen Ausreißer alle Werte der Placebogruppe statistisch signifikant höher als die der CLT-Gruppe. Zusätzlich wurden bei der Placebogruppe an Tag 3 und Tag 5 bei der 1:10-Konzentration die an diesem Tag am höchsten verzeichneten Werte gemessen (Abbildung 19). Vergleicht man die Zellzahl, die aus dem KV-Test ersichtlich wird, mit den Ergebnissen des Caspase-Tests, so würde man erwarten, dass in den niedrigen Verdünnungen die Werte des Caspase-Tests deutlich niedriger sind, da auch die Zellzahl reduziert ist. Dies ist aber nicht der Fall. Besonders an Tag 5 zeigt sich, dass obwohl die Zellzahl sehr niedrig ist, die Caspase-Werte hoch sind. Die Caspaseaktivität ist daher pro Zelle gesehen bei den höheren CLT- bzw. Placebo-Konzentrationen hoch. Dies ist ggf. durch den Nährstoffmangel bedingt oder dass sowohl die Placebo-Lösung als auch die CLT-Lösung apoptotisch wirken. Zudem ist aber anzumerken, dass bei den Caspase-Tests die Placebogruppe fast durchweg höhere Werte zeigt als die CLT-Gruppe. Deshalb könnte hier der Nährstoffmangel bei hohen Verdünnungen zu einer Caspaseaktivierung geführt haben. Da die CLT-Gruppen aber niedrigere Werte zeigen als die Placebo-Gruppen könnte CLT gegebenenfalls sogar antiapoptotisch wirken. Wegen den vielen Ausreißern und auch den sehr schwankenden Caspaseergebnissen ist die Aussagefähigkeit diesbezüglich aber stark reduziert.

Der Migrations-Assay ergab, dass sowohl CLT als auch Placebo dosisabhängig die durch bFGF-induzierte Migration hemmen (Tabelle 10, Abbildung 20). Zwischen den beiden Substanzen gab es jedoch lediglich bei der 1:50-Konzentration einen statistisch signifikanten Unterschied, so dass man davon ausgehen kann, dass CLT keine Wirkung zeigt und somit die Migration der Zellen nicht merklich beeinflusst. Zu beachten ist allerdings, dass K-bFGF höhere Werte als fast alle Verdünnungen mit Ausnahme des 1:50-CLT-Wertes zeigen. Der Versuch hat nicht zum Erfolg geführt, da eigentlich alle Werte zwischen K-bFGF und K+bFGF hätten liegen müssen. Dies liegt wahrscheinlich darin be-

gründet, dass die Hemmung durch die Verdünnung größer war als der durch den Wachstumsfaktor hervorgerufene Reiz.

Des Weiteren ist anzumerken, dass der background Zellen enthält und die Auswertung des Versuches somit schwierig ist.

Des Weiteren scheint CLT die Adhäsion der Zellen sogar zu verstärken (Abbildung 24, Tabelle 11). Da dies und auch manch andere Zellkulturergebnisse nur mäßig die Ergebnisse der klinischen und histologischen Untersuchung unterstützen, würde dies bedeuten, dass CLT auf kultivierte Tenonfibroblasten praktisch wirkungslos ist. Möglicherweise haben sich die Zellen durch das Herauslösen aus ihrer natürlichen Umgebung derartig dedifferenziert und verändert, dass sie auf die Substanz nicht mehr reagieren können. Generell sind Rückschlüsse aus der Zellkultur auf die Wirkung am lebenden Organismus nur mit Einschränkungen zu bewerten.

Andernfalls wäre anzunehmen, dass CLT tatsächlich wirkungslos ist und die Tierversuche nur ein zufällig positives Ergebnis erbrachten. Möglicherweise könnte eine Wirkung von CLT auch bei ausreichend großer Fallzahl und längerer Studiendauer mit einer langen Nachbeobachtungsphase nicht nachgewiesen werden.

Die Analysen der Publikationen von Li und Zahn [67, 83] ergaben jedoch, dass ein $\alpha 5\beta 1$ -Integrininhibitor in der Lage ist, sowohl die Adhäsion als auch die Migration dosisabhängig zu hemmen. Dass unsere Zellkulturversuche keinen Effekt bzw. sogar einen verstärkenden Effekt wie bei der Adhäsion zeigten, könnte daran liegen, dass die Versuche an unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt wurden. Während wir in unserer Studie humane Tenonfibroblasten verwendeten, griffen Li et al. auf humane Retinapigmentepithel-Zellen und Zahn et al. auf ARPE-19 Zellen zurück [67, 83].

Integrininhibitor: Wiederholte Injektionen eines nicht spezifischen Integrininhibitor-Peptids sind dazu imstande, einen niedrigen IOP sowie die Funktion der Filterkissen nach einer filtrierenden Glaukomoperation bei Kaninchen auf-

rechtzuerhalten [84]. Dieses Peptid erkennt jedoch auch einige andere Integrine wie $\alpha\beta 5$ oder $\alpha\beta 3$, welche bei physiologischen Funktionen wie beispielsweise der Phagozytose von Außensegmenten der Photorezeptoren oder der Anlagerung von RPE-Zellen an die Bruch'sche Membran eine Rolle spielen [81, 82, 84, 85]. Deshalb bestehen Sicherheitsbedenken bei nicht selektiven Integrininhibitoren und eine klinische Anwendung ist wahrscheinlicher mit einem selektiven Integrininhibitor zu erreichen.

Zusammenfassung: In unserer Studie konnten wir zeigen, dass eine spezifische $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibition durch CLT-28643 das Überleben der Filterkissen sowie die durch die Trabekulektomie hervorgerufene Drucksenkung signifikant verlängert. Außerdem scheint CLT-28643 auf Grundlage unserer chirurgischen und histologischen Ergebnisse sicher für die zukünftige Glaukomchirurgie zu sein. Längerfristige Rückschlüsse sind jedoch aus dieser Studie heraus nicht möglich, da aufgrund der kurzen Studiendauer keine Aussage über die Komplikationen getroffen werden kann, die möglicherweise erst nach Monaten oder Jahren auftreten. Hierzu müsste man vom Kaninchen-Operationsmodell auf eine klinische Studie am Menschen übergehen. Auch wenn die antiproliferative Wirkung von CLT-28643 in den Zellkulturversuchen nicht so klar wie in den Tierversuchen gezeigt werden konnte, so ist die Fortführung der Evaluation der antifibrotischen Wirkung von CLT-28643 in einer klinischen Studie durchaus interessant.

5 Zusammenfassung

Bei der filtrierenden Glaukomchirurgie kommt es durch eine Wundheilungs- und Fibrosereaktion zu einem Versagen der Filterkissen. Hierbei sind Myofibroblasten, die durch Integrine aktiviert werden, von großer Bedeutung. Der Fibronectinrezeptor $\alpha 5\beta 1$ -Integrin könnte dabei eine entscheidende Rolle spielen. Dies ist die erste Studie, in der die Rolle eines $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibitors (CLT-28643) bei der postoperativen Fibrosierung nach filtrierenden Glaukomchirurgie-Eingriffen untersucht wird. CLT-28643 wurde in dieser Studie mit dem Goldstandard Mitomycin C (MMC) verglichen. Zudem sollte die Wirkung von CLT-28643 auf Tenonfibroblasten in der Zellkultur untersucht werden.

Wir führten eine doppelt-blinde Trabekulektomiestudie an 24 Kaninchen durch. Die rechten Augen wurden in drei Gruppen à 8 Augen aufgeteilt. An allen rechten Augen erfolgte eine Trabekulektomie: In der MMC-Gruppe erhielten die 8 rechten Augen eine intraoperative MMC-Gabe. Postoperativ wurden Placebo-Augentropfen appliziert. In der CLT+ Gruppe erhielten die 8 rechten Augen intraoperativ CLT-28643 subkonjunktival; postoperativ wurden Placebo-Augentropfen appliziert. In der CLT++ Gruppe erhielten die 8 rechten Augen CLT-28643 subkonjunktival sowie postoperativ als Augentropfen. Für die Kontroll-OP-Gruppe erfolgte an den linken Augen von 12 Kaninchen eine Trabekulektomie ohne adjuvante Medikation. Die anderen 12 linken Augen blieben unoperiert und bildeten die unbehandelte Gruppe.

Für die klinische Untersuchung wurden IOP-Messungen mit Hilfe eines Schiötz-Tonometers, Spaltlampenuntersuchungen (Überleben der Filterkissen sowie der Würzburger Bleb Score) sowie eine fotografische Dokumentation der Filterkissen durchgeführt. Vier Wochen nach der Trabekulektomie wurden die Kaninchen getötet und die Augen histologisch aufbereitet.

Bei den Zellkulturversuchen wurde die Wirkung von CLT-28643 in diversen Konzentrationen im Vergleich zu einer Placebo-Behandlung an Tenonfibroblasten untersucht. Es wurde zur Viabilitätsbestimmung ein MTS- sowie ein Kristallviolett-Test durchgeführt. Zudem erfolgte ein Migrations- und Adhäsionsassay, sowie eine Untersuchung der Capsase-3/7-Aktivität.

Wir konnten zeigen, dass die Behandlung mit CLT-28643 (CLT+ und CLT++ Gruppe) zu einem signifikant längeren Überleben der Filterkissen und zu einem besseren Bleb Score, verglichen mit den Ergebnissen der Kontroll-OP-Gruppe, führte (10. postoperativer Tag: Kontroll-OP-Gruppe 33 %-ige Funktion, CLT-Gruppen 100 %-ige Funktion). Die MMC-Gruppe konnte als einzige der Gruppen am letzten Tag der Verlaufsbeobachtung eine Filterkissenfunktion von 75 % aufweisen. Das zweitbeste Ergebnis an diesem Tag erreichte mit 25 % die CLT+ Gruppe. In der MMC-Gruppe blieben die Filterkissen am längsten funktionsfähig.

Die beiden CLT-Gruppen erreichten hinsichtlich der Drucksenkung zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Kontroll-OP-Gruppe. Die CLT-28643-Gabe wurde in allen Augen sehr gut toleriert. Klinisch und histologisch zeigten sich keine Hinweise für eine mögliche Toxizität von CLT-28643. MMC hingegen wies im Vergleich mit den anderen Gruppen die niedrigste Durchschnittszahl an Becherzellen auf und statistisch signifikant weniger Becherzellen als die Kontroll-OP-Gruppe, was auf eine mögliche Toxizität hinweist. Die CLT-Gruppen zeigten im Vergleich zur MMC-Gruppe aber keine signifikant höhere Anzahl an Becherzellen, so dass eine milde Toxizität von CLT nicht gänzlich auszuschließen ist.

Bei den Zellkulturversuchen schnitten beim MTS-Test die CLT-Konzentrationen bis auf wenige Ausnahmen mit einem statistisch signifikant niedrigeren Testergebnis als die gleichwertigen Placebo-Konzentrationen ab. Dies impliziert einen viabilitätshemmenden Effekt von CLT auf die kultivierten Tenonfibroblasten. Der Kristallviolett-Test unterstützte die Ergebnisse des MTS-Tests. Auch die Bezugnahme des MTS-Tests auf den Kristallviolett-Test verdeutlicht, dass bei höheren CLT-Konzentrationen die relative Viabilität der einzelnen Zelle reduziert war.

Die restlichen Zellkulturversuche zeigten inkonstante Ergebnisse, so dass weitere Rückschlüsse schwierig sind. Einer der limitierenden Faktoren war die inkonstante Nährstoffversorgung der Zellen bei den unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Ergebnisse meiner Doktorarbeit zeigen auf, dass $\alpha 5\beta 1$ -Integrin wesentlich die Fibrosereaktion nach einem Trabekulektomie-Eingriff fördert. Folglich führte die Behandlung mit dem $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Inhibitor CLT-28643 zu einem verlängerten Überleben des Filterkissens im Vergleich zu keiner adjuvanten Medikation. Es stellte sich jedoch ebenfalls heraus, dass die Anwendung von MMC – dem derzeitigen Goldstandard bei der Trabekulektomie – hierbei einen größeren Effekt zu zeigen scheint.

6 Literaturverzeichnis

1. Casson RJ, Chidlow, G., Wood, J. P., Crowston, J. G., Goldberg, I.: **Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts.** *Clinical & experimental ophthalmology* 2012, **40**(4):341-349.
2. Leffler CT, Schwartz, S. G., Hadi, T. M., Salman, A., Vasuki, V.: **The early history of glaucoma: the glaucous eye (800 BC to 1050 AD).** *Clin Ophthalmol* 2015, **9**:207-215.
3. Grewe R: **The history of glaucoma.** *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 1986, **188**(2):167-169.
4. Stamper RL: **A history of intraocular pressure and its measurement.** *Optometry and vision science* 2011, **88**(1):E16-28.
5. Goldmann H: **Albrecht von Graefe und das Glaukom.** *Arch Ophthalmol* 1971, **181**:94.
6. Sit AJ: **Intraocular pressure variations: causes and clinical significance.** *Canadian journal of ophthalmology* 2014, **49**(6):484-488.
7. Dufrane R, Ehongo A: **[Treatment of glaucoma].** *Revue medicale de Bruxelles* 2014, **35**(4):291-297.
8. Turgut B, Eren, K., Akin, M. M., Demir, T., Kobat, S.: **Topical infliximab for the suppression of wound healing following experimental glaucoma filtration surgery.** *Drug design, development and therapy* 2014, **8**:421-429.
9. Chen YS, Green, C. R., Danesh-Meyer, H. V., Rupenthal, I. D.: **Neuroprotection in the treatment of glaucoma - A focus on connexin43 gap junction channel blockers.** *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 2015.
10. Grehn F: **Augenheilkunde:** Springer Verlag; 2008.
11. Lang GK: **Augenheilkunde.** Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2008.
12. Quigley HA: **Number of people with glaucoma worldwide.** *The British journal of ophthalmology* 1996, **80**(5):389-393.
13. Shaarawy TM, Sherwood M. B., Hitchings R. A., Crowston J. G.: **Glaucoma Medical Diagnosis & Therapy** vol. 1: Elsevier; 2009.
14. Weinreb RN, Aung, T., Medeiros, F. A.: **The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review.** *Jama* 2014, **311**(18):1901-1911.
15. Thylefors BN, A.D.: **The global impact of glaucoma.** *Bull World Health Organ* 1994, **72**(3):323-326.
16. Thylefors B, Negrel, A.D., Pararajasegaram, R., Dadzie, K.Y.: **Global data on blindness.** *Bull World Health Organ* 1995, **73**(1):115-121.
17. Pfeiffer N, Krieglstein, G. K., Wellek, S.: **Knowledge about glaucoma in the unselected population: a German survey.** *Journal of glaucoma* 2002, **11**(5):458-463.
18. Anderson DR: **Glaucoma: the damage caused by pressure. XLVI Edward Jackson memorial lecture.** *American journal of ophthalmology* 1989, **108**(5):485-495.

19. Sommer A: **Glaucoma risk factors observed in the Baltimore Eye Survey.** *Current opinion in ophthalmology* 1996, **7**(2):93-98.
20. Kroese M, Burton, H.: **Primary open angle glaucoma. The need for a consensus case definition.** *Journal of epidemiology and community health* 2003, **57**(9):752-754.
21. AGIS: **The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration.**The AGIS Investigators. *American journal of ophthalmology* 2000, **130**(4):429-440.
22. Erb C: **[Early Manifest Glaucoma Trial update 2004].** *Der Ophthalmologe* 2005, **102**(3):219-221.
23. Kass MA, Heuer, D. K., Higginbotham, E. J., Johnson, C. A., Keltner, J. L., Miller, J. P., Parrish, R. K., 2nd, Wilson, M. R., Gordon, M. O.: **The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma.** *Archives of ophthalmology* 2002, **120**(6):701-713; discussion 829-730.
24. Flammer J, Haefliger, I. O., Orgul, S., Resink, T.: **Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage?** *Journal of glaucoma* 1999, **8**(3):212-219.
25. Bathija R: **Optic nerve blood flow in glaucoma.** *Clinical & experimental optometry* 2000, **83**(3):180-184.
26. Pache M: **[Sleep apnoea and glaucoma].** *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 2014, **231**(2):127-129.
27. Johnson GJ, Minassian, D.C., Weale, R.: **The epidemiology of eye disease.** London/ Weinheim: Chapman& Hall Medical; 1998.
28. Burk A, Burk, R. : **Checkliste Augenheilkunde:** Georg Thieme Verlag; 2005.
29. Schlote T, Grüb, M., Mielke J., Rohrbach, M. : **Taschenatlas Augenheilkunde,** vol. 1: Georg Thieme 2004.
30. Seet LF, Finger, S. N., Chu, S. W., Toh, L. Z., Wong, T. T.: **Novel insight into the inflammatory and cellular responses following experimental glaucoma surgery: a roadmap for inhibiting fibrosis.** *Curr Mol Med* 2013, **13**(6):911-928.
31. Salim S: **Current variations of glaucoma filtration surgery.** *Current opinion in ophthalmology* 2012, **23**(2):89-95.
32. Matlach J, Klink, T.: **[Trabeculectomy versus canaloplasty].** *Ophthalmologe* 2015.
33. Van Bergen T, Van de Velde, S., Vandewalle, E., Moons, L., Stalmans, I.: **Improving patient outcomes following glaucoma surgery: state of the art and future perspectives.** *Clinical ophthalmology* 2014, **8**:857-867.
34. Migdal C, Gregory, W., Hitchings, R.: **Long-term functional outcome after early surgery compared with laser and medicine in open-angle glaucoma.** *Ophthalmology* 1994, **101**(10):1651-1656; discussion 1657.
35. Klink T, Grehn, F.: **[Modern filtration surgery. An update].** *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 2013, **110**(4):299-305.

36. Ehrnrooth P, Lehto I, Puska P, Laatikainen L: **Long-term outcome of trabeculectomy in terms of intraocular pressure.** *Acta Ophthalmol Scand* 2002, **80**(3):267-271.
37. Gerste RD: **Glaukom: Hohe Langzeiterfolgsraten der Trabekulektomie.** *Deutsches Ärzteblatt* 2012, **109**:1089-1090.
38. Broadway D, Grierson, I., Hitchings, R.: **Racial differences in the results of glaucoma filtration surgery: are racial differences in the conjunctival cell profile important?** *The British journal of ophthalmology* 1994, **78**(6):466-475.
39. Vesti E: **Filtering blebs: follow up of trabeculectomy.** *Ophthalmic surgery* 1993, **24**(4):249-255.
40. Boiko EV, Pozniak, A. L., Iakushev, D. I., Maltsev, D. S., Suetov, A. A., Nuralova, I. V.: **Latent Infections as a Risk Factor for Posttrabeculectomy Bleb Failure.** *Journal of glaucoma* 2015.
41. Koller TLS, J.; Gloor, B.: **[Risk factors for trabeculectomy failure].** *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 1998, **213**(1):1-8.
42. Lockwood A, Brocchini S, Khaw PT: **New developments in the pharmacological modulation of wound healing after glaucoma filtration surgery.** *Curr Opin Pharmacol* 2013, **13**(1):65-71.
43. Lama PJ, Fechtner RD: **Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery.** *Survey of ophthalmology* 2003, **48**(3):314-346.
44. Higginbotham EJ, Stevens RK, Musch DC, Karp KO, Lichter PR, Bergstrom TJ, Skuta GL: **Bleb-related endophthalmitis after trabeculectomy with mitomycin C.** *Ophthalmology* 1996, **103**(4):650-656.
45. Gedde SJ, Herndon LW, Brandt JD, Budenz DL, Feuer WJ, Schiffman JC: **Postoperative complications in the Tube Versus Trabeculectomy (TVT) study during five years of follow-up.** *American journal of ophthalmology* 2012, **153**(5):804-814.e801.
46. Akarsu C, Onol, M., Hasanreisoglu, B.: **Postoperative 5-fluorouracil versus intraoperative mitomycin C in high-risk glaucoma filtering surgery: extended follow up.** *Clinical & experimental ophthalmology* 2003, **31**(3):199-205.
47. Picht G. GF: **Sickerkissenentwicklung nach Trabekulektomie.** *Der Ophthalmologe* 1998, **95**:380-387.
48. Israeli-Rosenberg S, Manso, A. M., Okada, H., Ross, R. S.: **Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte.** *Circulation research* 2014, **114**(3):572-586.
49. Gagen D, Faralli, J. A., Filla, M. S., Peters, D. M.: **The role of integrins in the trabecular meshwork.** *Journal of ocular pharmacology and therapeutics* 2014, **30**(2-3):110-120.
50. Rohrbach DH: **Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes: Cell Biology:** Academic Press, Inc. ; 1993.
51. Hynes RO: **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.** *Cell* 2002, **110**(6):673-687.
52. Henderson NC, Sheppard, D.: **Integrin-mediated regulation of TGFbeta in fibrosis.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1832**(7):891-896.

53. Jester JV, Huang, J., Petroll, W. M., Cavanagh, H. D.: **TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling.** *Exp Eye Res* 2002, **75**(6):645-657.
54. Klingberg F, Hinz, B., White, E. S.: **The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis.** *J Pathol* 2013, **229**(2):298-309.
55. Koivisto L, Heino, J., Hakkinen, L., Larjava, H.: **Integrins in Wound Healing.** *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014, **3**(12):762-783.
56. Widgerow AD: **Chronic wounds - is cellular 'reception' at fault? Examining integrins and intracellular signalling.** *International wound journal* 2013, **10**(2):185-192.
57. Tanaka N, Ikeda, Y., Yamaguchi, T., Furukawa, H., Mitomi, H., Nakagawa, T., Tohma, S., Fukui, N.: **alpha5beta1 integrin induces the expression of noncartilagenous procollagen gene expression in articular chondrocytes cultured in monolayers.** *Arthritis Res Ther* 2013, **15**(5):R127.
58. Yu Y, He, G. Z., Wu, Y., Huang, C. B.: **[Expression and significance of alpha5beta1 integrin in abnormal scars].** *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2004, **20**(4):271-273.
59. Tartaglia LJ, Bennett, A., Plattner, A. S., Muzyczka, N., Ling, C., Srivastava, A., Agbandje-McKenna, M.: **Molecular cloning, overexpression, and an efficient one-step purification of alpha5beta1 integrin.** *Protein Expr Purif* 2013, **92**(1):21-28.
60. Ren J, Xu, S., Guo, D., Zhang, J., Liu, S.: **Increased expression of alpha5beta1-integrin is a prognostic marker for patients with gastric cancer.** *Clin Transl Oncol* 2014, **16**(7):668-674.
61. Caldirola P. BU CY: **The selective a5b1 antagonist CLT-28643 inhibits tumors growth and angiogenesis.** *Poster at EORTC-NCI-AACR* 2010.
62. Klink T, Kann G, Ellinger P, Klink J, Grehn F, Guthoff R: **The prognostic value of the wuerzburg bleb classification score for the outcome of trabeculectomy.** *Ophthalmologica* 2011, **225**(1):55-60.
63. Perkins TW, Faha B, Ni M, Kiland JA, Poulsen GL, Antelman D, Atencio I, Shinoda J, Sinha D, Brumback L *et al*: **Adenovirus-mediated gene therapy using human p21WAF-1/Cip-1 to prevent wound healing in a rabbit model of glaucoma filtration surgery.** *Archives of ophthalmology* 2002, **120**(7):941-949.
64. Riss TL, Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L.: **Cell Viability Assays.** In: *Assay Guidance Manual.* edn. Edited by Sittampalam GS, Gal-Edd N, Arkin M, Auld D, Austin C, Bejcek B, Glicksman M, Inglese J, Lemmon V, Li Z *et al*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
65. Kueng W, Silber E, Eppenberger U: **Quantification of cells cultured on 96-well plates.** *Analytical biochemistry* 1989, **182**(1):16-19.

66. Kuribayashi K, Mayes PA, El-Deiry WS: **What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria?** *Cancer biology & therapy* 2006, **5(7):763-765.**
67. Zahn G, Volk K, Lewis GP, Vossmeier D, Stragies R, Heier JS, Daniel PE, Jr., Adamis AP, Chapin EA, Fisher SK *et al*: **Assessment of the integrin alpha5beta1 antagonist JSM6427 in proliferative vitreoretinopathy using in vitro assays and a rabbit model of retinal detachment.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2010, **51(2):1028-1035.**
68. Schultheiss M, Schnichels, S., Konrad, E.-M., Bartz-Schmidt, K. U., Zahn, G., Caldirola, P., Fsadni, M., Caram-Lelham, N., Spitzer, M. S. : **$\alpha 5\beta 1$ -integrin inhibitor (CLT-28643) effective in rabbit trabeculectomy model.** Submitted to *Acta Ophthalmologica* 2016.
69. Okuda T, Higashide T, Fukuhira Y, Kaneko H, Shimomura M, Sugiyama K: **Suppression of avascular bleb formation by a thin biodegradable film in a rabbit filtration surgery with mitomycin C.** *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 2012, **250(10):1441-1451.**
70. Geggel HS, Friend J, Thoft RA: **Conjunctival epithelial wound healing.** *Investigative ophthalmology & visual science* 1984, **25(7):860-863.**
71. Rjiba-Touati K, Ayed-Boussema I, Soualeh N, Achour A, Bacha H, Abid S: **Antioxidant and antigenotoxic role of recombinant human erythropoietin against alkylating agents: cisplatin and mitomycin C in cultured Vero cells.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2013, **238(8):943-950.**
72. Klink J, Schmitz B, Lieb WE, Klink T, Grein HJ, Sold-Darseff J, Heinold A, Grehn F: **Filtering bleb function after clear cornea phacoemulsification: a prospective study.** *The British journal of ophthalmology* 2005, **89(5):597-601.**
73. Hu CY, Matsuo H, Tomita G, Suzuki Y, Araie M, Shirato S, Tanaka S: **Clinical characteristics and leakage of functioning blebs after trabeculectomy with mitomycin-C in primary glaucoma patients.** *Ophthalmology* 2003, **110(2):345-352.**
74. Muether PS, Dell, S., Kociok, N., Zahn, G., Stragies, R., Vossmeier, D., Jousen, A. M.: **The role of integrin alpha5beta1 in the regulation of corneal neovascularization.** *Exp Eye Res* 2007, **85(3):356-365.**
75. Hinz B, Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Chaponnier, C.: **Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity.** *Mol Biol Cell* 2001, **12(9):2730-2741.**
76. Desmouliere AR, M. Darby, I. Gabbiani, G.: **Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar.** *Am J Pathol* 1995, **146(1):56-66.**
77. Hinz B: **Formation and function of the myofibroblast during tissue repair.** *J Invest Dermatol* 2007, **127(3):526-537.**
78. Desmouliere AG, A.; Gabbiani, F.; Gabbiani, G.: **Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts.** *J Cell Biol* 1993, **122(1):103-111.**

79. Tomasek JJ, Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R. A.: **Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**(5):349-363.
80. Avila M, Ortiz, G., Lozano, J. M., Franco, P., Patarroyo, M. E.: **GGRGDSPCA peptide: a new antiscarring agent on glaucoma filtration surgery.** *Ophthalmic Surg Lasers* 2001, **32**(2):134-139.
81. Finnemann SC, Bonilha, V. L., Marmorstein, A. D., Rodriguez-Boulan, E.: **Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(24):12932-12937.
82. Nandrot EF, Kim, Y., Brodie, S. E., Huang, X., Sheppard, D., Finnemann, S. C.: **Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin.** *J Exp Med* 2004, **200**(12):1539-1545.
83. Li R, Maminishkis A, Zahn G, Vossmeier D, Miller SS: **Integrin alpha5beta1 mediates attachment, migration, and proliferation in human retinal pigment epithelium: relevance for proliferative retinal disease.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2009, **50**(12):5988-5996.
84. Avila MO, G., Lozano; J. M., Franco, P.; de Perez, G.; Patarroyo, M. E.: **The effects of RGD (Arg-Gly-Asp) peptides on glaucoma filtration surgery in rabbits.** *Ophthalmic Surg Lasers* 1998, **29**(4):309-317.
85. Thumann G. HS. HD: **Cell Biology of the Retinal Pigmented Epithelium.** 2005:137–152.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Department für Augenheilkunde an der Universitäts-Augenklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Martin Spitzer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Martin Spitzer (Oberarzt), Dr. med. Maximilian Schultheiß (Facharzt) und Dr. rer. nat. Sven Schnichels (Laborleiter).

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Johanna Wude, Dr. rer. nat. Sven Schnichels, Dr. med. Maximilian Schultheiß)) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Sven Schnichels durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Eva-Maria Konrad

8 Veröffentlichungen

Submitted to Acta Ophthalmologica:

Schultheiss, M.; Schnichels, S.; **Konrad, E.-M.**; Bartz-Schmidt, K.U.; Zahn, G.; Caldirola, P.; Fsadni, M.G.; Caram-Lelham, N.; Spitzer, M.S.
 α 5 β 1-Integrin Inhibitor (CLT-28643) Effective In Rabbit Trabeculectomy Model

Poster:

Schultheiss, M.; Schnichels, S.; **Konrad, E.-M.**; Bartz-Schmidt, K.U.; Zahn, G.; Caldirola, P.; Fsadni, M.G.; Caram-Lelham, N.; Spitzer, M.S.
Evaluation of the α 5 β 1-integrin-inhibitor CLT-28643 in a trabeculectomy rabbit model
Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Orlando, USA, 04. - 08.05.2014

Schultheiss, M.; Schnichels, S.; **Konrad, E.-M.**; Bartz-Schmidt, K.U.; Zahn, G.; Caldirola, P.; Fsadni, M.G.; Caram-Lelham, N.; Spitzer, M.S.
Evaluation of the α 5 β 1-integrin-inhibitor CLT-28643 in a trabeculectomy rabbit model
112. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Leipzig, Deutschland, 25. - 28.09.2014

Kongressvorträge:

Schultheiss, M.; Schnichels, S.; **Konrad, E.-M.**; Bartz-Schmidt, K.U.; Zahn, G.; Caldirola, P.; Fsadni, M.G.; Caram-Lelham, N.; Spitzer, M.S.
Evaluation of the α 5 β 1-integrin-inhibitor CLT-28643 in a trabeculectomy rabbit model
98. Jahrestagung der Baden-Württembergischen Augenärztlichen Vereinigung (WAV), Tübingen, Deutschland, 28.02 - 01.03.2014

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die verschiedenen Phasen der physiologischen Wundheilung [33]	12
Abbildung 2: Schematisches Modell eines Integrin-Moleküls [50]	16
Abbildung 3: Die durchschnittlichen IOP-Werte aller Gruppen mit signifikanten Unterschieden der Werte zwischen den Gruppen an einzelnen Tagen, gemessen mit dem Schiötz Tonometer. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung im Graphen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ der MMC-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe; \$ $p < 0,05$ und \$\$\$ $p < 0,001$ der CLT+ Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe; □□□ $p < 0,001$ der CLT++ Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe; § $p < 0,05$ und §§§ $p < 0,001$ der Kontroll-OP-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe; + $p < 0,05$ der MMC-Gruppe im Vergleich zur CLT++ Gruppe und ‡ $p < 0,05$ der MMC-Gruppe im Vergleich zur Kontroll- OP-Gruppe [68].	42
Abbildung 4: Die durchschnittlichen IOP-Werte aller Gruppen mit signifikanten Unterschieden der Werte zwischen den Gruppen im Vergleich zum durchschnittlich gemessenen IOP-Wert an Tag 0. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung in den Graphen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich zum präoperativen Druckwert [68].	43
Abbildung 5: Delta-IOP-Levels aller Gruppen verglichen mit den präoperativen bestimmten IOP-Werten als Basislinie. ** $p < 0,01$ beim Vergleich der Kontroll-OP-Gruppe mit der unbehandelten Gruppe [68].	44
Abbildung 6: Die Kaplan-Meier Kurven zeigen die prozentuale Überlebenszeit der Filterkissen zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden folgendermaßen gekennzeichnet: MMC vs Kontroll-OP-Gruppe *** $p < 0,001$; MMC vs CLT+ Gruppe + $p < 0,05$; CLT+	

vs Kontroll-OP-Gruppe \$\$ p<0,01; CLT++ vs Kontroll-OP-Gruppe ‡‡ p<0.01 [68].	46
Abbildung 7: Das Säulendiagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl der Tage, in denen die Filterkissen der verschiedenen Gruppen funktionsfähig waren. Als Beobachtungszeitraum diente der gesamte Studienverlauf. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung im Säulendiagramm dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: ** p<0,01 und *** p<0,001 im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe [68].	47
Abbildung 8: Durchschnittliche Bleb Score-Ergebnisse während der Studie mit signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen an einzelnen postoperativen Tagen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung als Graph dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 der MMC-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe; \$ p<0,05 und \$\$ p<0,01 der CLT++ Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe; □ p<0,05 der CLT+ Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe, + p<0,05 der MMC-Gruppe im Vergleich zur CLT++ Gruppe und ‡ p<0,05 und ‡‡ p<0,01 der MMC-Gruppe im Vergleich zur CLT+ Gruppe [68].	50
Abbildung 9: Durchschnittliche Bleb Score-Ergebnisse der einzelnen Gruppen im Vergleich zum durchschnittlichen Bleb Score-Ergebnis des ersten Tages. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung als Graph dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 im Vergleich zum Bleb Score-Ergebnis des ersten Tages [68].	50
Abbildung 10: Durchschnittliche Score-Ergebnisse für die Einzelkriterien Vaskularisation (A), Korkenziehergefäße (B) sowie Einkapselung (C) während des Studienverlaufs. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung in den Graphen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 der MMC-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe; # p<0,05 und ## p<0,01 der CLT++ Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe; \$ p<0,05	

der CLT+ Gruppe im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe; ‡ p<0,05 und ‡‡‡ p<0,001 der MMC-Gruppe im Vergleich zur CLT++ Gruppe; + p<0,01 und ++ p<0,01 der MMC-Gruppe im Vergleich zur CLT+ Gruppe [68].	51
Abbildung 11: Repräsentative Photographien der Filterkissen mit den dazugehörigen Score-Werten [68]	54
Abbildung 12: Durchschnittliche Score-Ergebnisse für die postoperative intraokuläre Entzündung während der ersten fünf postoperativen Tage	55
Abbildung 13: Beispiels einer ausgeprägten Gewebszerstörung bei den immunhistochemischen Färbungen	57
Abbildung 14: Die Säulendiagramme veranschaulichen die Menge an subkonjunktivalen Kollagenablagerungen an der Operationsstelle (A), die Vaskularisation des Filterkissens (B), die Narbendicke im Operationsspalt (C) sowie die prozentuale Anzahl an Becherzellen auf der Trabekulektomie-seite des Auges (D). Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung in den Graphen dargestellt. Hierbei steht das eingefügte Symbol „*“ für Folgendes: p<0,05 der Gruppe 2 im Vergleich zur Kontroll-OP-Gruppe [68].	58
Abbildung 15: Repräsentative Photographien der histologischen Präparate der Trabekulektomie-Bereiche. Photographien A – D H&E-Färbung (100-fache Vergrößerung); E – M Masson Trichrom-Färbung (E – H 100-fache Vergrößerung, I – M: 200-fache Vergrößerung). Die Photographien N – Q zeigen das Filterkissen am peripheren Ende des oberflächlichen Skleralflaps.	59
Abbildung 16 A-C: Säulendiagramme zu den Werten des MTS-Tests der verschiedenen Konzentrationen von Placebo und CLT an Tag 1, 3 und 5. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 für die Unterschiede der gleichen Konzentration zwischen den beiden Substanzen. ### p<0,001 für die Unterschiede zwischen Kontrolle und 1:50-CLT, &&& p<0,001 für die Unterschiede zwischen Kontrolle und 1:50-Placebo.	62

Abbildung 17A-C: Säulendiagramme zu den Werten des KV-Tests der verschiedenen Konzentrationen von Placebo und CLT an Tag 1, 3 und 5. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ für die Unterschiede der gleichen Konzentration zwischen den beiden Substanzen. ### $p < 0,001$ und $p < 0,05$ für die Unterschiede zwischen 1:50-CLT und Kontrolle.	66
Abbildung 18 A-C: Säulendiagramm zu den Werten des MTS-Tests in Bezug auf den KV-Test. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: *** $p < 0,001$ und ** $p < 0,01$ für den Unterschied zwischen CLT und Placebo # $p < 0,05$ für den Unterschied zwischen 1:50 CLT und Kontrolle, &&& $p < 0,001$ für den Unterschied zwischen 1:50 P und Kontrolle.	69
Abbildung 19 A-C: Säulendiagramm zu den Werten des Caspase-Tests. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für Folgendes: *** $p < 0,001$ und ** $p < 0,01$ für die Unterschiede der gleichen Konzentration zwischen den beiden Substanzen. ### $p < 0,001$ für die Unterschiede zwischen Kontrolle und 1:50-CLT. && $p < 0,01$ und & $p < 0,05$ für die Unterschiede zwischen Kontrolle und 1:50P.	72
Abbildung 20: Säulendiagramm zu den Werten des Migrations-Assays. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für einen signifikanten Unterschied zwischen folgenden Werten: *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen 1:50 CLT und 1:50P. % $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zwischen K+bFGF und K-bFGF, +++ $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen der background- und der K+bFGF-/K-bFGF-Gruppe, \$\$\$ $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen K+bFGF und 1:50P.	75
Abbildung 21: Repräsentative Bilder der Calcein- und DAPI-Färbung des Migrations-Assays der CLT-Verdünnungen	76

Abbildung 22: Repräsentative Bilder der Calcein- und DAPI-Färbung des Migrations-Assays der Placebo-Verdünnungen.....	77
Abbildung 23: Repräsentative Bilder der Calcein- und DAPI-Färbung des Migrations-Assays der Kontrollen und des backgrounds.....	77
Abbildung 24: Säulendiagramm zu den Werten des Adhäsions-Assays. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Hierbei stehen die eingefügten Symbole für einen signifikanten Unterschied zwischen folgenden Werten: *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen 1:5 CLT und 1:5P. + $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zwischen 1:10 CLT und 1:10P. \$\$\$ $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der background-Gruppe, %%% $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der CLT-Gruppe.	79

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Epidemiologie der verschiedenen Glaukomarten weltweit. Primäres Offenwinkelglaukom (POWG), Primäres Engwinkelglaukom (PEWG) [27] .5	
Tabelle 2: Würzburg Bleb Classification Score zur Beurteilung des Filterkissens nach der Trabekulektomie [62].....	27
Tabelle 3: Perkin Score zur Beurteilung der histologischen Präparate [63]	28
Tabelle 4: Durchschnitt IOP	43
Tabelle 5: Durchschnittliche „Bleb Scores“	49
Tabelle 6: Durchschnittswerte des MTS-Tests.....	60
Tabelle 7: Durchschnittliche Werte des KV-Tests	64
Tabelle 8: Durchschnittswerte für die Bezugnahme des MTS-Tests auf den KV-Test	67
Tabelle 9: Durchschnittswerte des Caspase-Tests	71
Tabelle 10: Durchschnittswerte des Migrations-Assays.....	74
Tabelle 11: Durchschnittswerte des Adhäsions-Assays.....	78

9.3 Danksagungen

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Martin Spitzer bedanken, der mir dieses interessante Dissertationsthema überlassen hat und mich während der Promotion fortlaufend unterstützt hat. Ein großer Dank gebührt hierbei insbesondere seiner Geduld und seiner umfassenden Betreuung.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Maximilian Schultheiss bedanken, ohne dessen Betreuung, Geduld und Motivation meine Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem bin ich allen Mitarbeitern des Breuningerbaus zu Dank verpflichtet, auf deren freundliche Hilfe ich mich stets verlassen konnte. Zudem bin ich sehr dankbar darüber, dass ich sämtliche Geräte und Materialien, die ich für meine Versuchsreihen benötigt habe, verwenden durfte.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie über ihre Liebe, Geduld und tatkräftige Unterstützung und Zuneigung.

9.4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.