

Aus der Augenklinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Siegfried Priglinger

aus der Arbeitsgruppe okuläre Wundheilung
Leitung: Prof. Dr. med. Kirsten Eibl-Lindner

**Ein innovatives Medizinprodukt: Die biologisch aktive,
medikamentenfreisetzende Intraokularlinse zur Modulation
des Nachstars**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen
Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stefan Amin Kassume

aus Braunau am Inn
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Kirsten Eibl-Lindner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. med. Chris P. Lohmann

Prof. Dr. med. Christos Haritoglou

Prof. Dr. rer. nat. Ingrid Boekhoff

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:**
Dr. med. Christian Wertheimer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2018

meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
1. KLINISCHE RATIONALE (DARLEGUNG DER NOTWENDIGKEIT EINER MEDIKAMENTENFREISETZENDEN INTRAOKULARLINSE)	1
1.1. <i>Die Katarakt (Grauer Star)</i>	1
1.2. <i>Ätiologie und Pathogenese der Katarakt</i>	1
1.3. <i>Therapie der Katarakt</i>	2
1.4. <i>Nachstar</i>	3
1.5. <i>Konventionelle Therapieverfahren des Nachstars</i>	4
2. STAND DER FORSCHUNG: AKTUELLE KLINISCHE MÖGLICHKEITEN DER NACHSTARPROPHYLAXE	5
2.1. <i>Design und Material von Intraokularlinsen</i>	5
2.2. <i>Chirurgische Möglichkeiten der Nachstarprophylaxe</i>	6
3. EXPERIMENTELLE ANSÄTZE: PHARMAKOLOGISCHE NACHSTARPROPHYLAXE	6
3.1. <i>Potentielle Pharmaka in der Nachstarprophylaxe</i>	6
4. STAND DER FORSCHUNG: ENTWICKLUNG VON MEDIKAMENTENFREISETZENDEN INTRAOKULARLINSEN.	8
5. EIN MEDIZINPRODUKT – DIE MEDIKAMENTENFREISETZENDE INTRAOKULARLINSE	10
5.1. <i>Einordnung der medikamententragenden Intraokularlinse als Medizinprodukt..</i>	10
5.2. <i>Die wichtigsten Eckpunkte in der Medizinproduktzulassung</i>	11
II. ZIELSETZUNG.....	12
III. MATERIAL UND METHODEN.....	13
1. ZELLKULTUR.....	13
2. PHARMAKA.....	13
3. VERWENDETE INTRAOKULARLINSEN	14
3.1. <i>Hoya YA-65BB</i>	14
3.2. <i>Rayner Raysoft 574R</i>	14
4. PHARMAKOLOGISCHE MODIFIKATION VON INTRAOKULARLINSEN	15
4.1. <i>Beladen des Linsen-Acrylats mit Pharmaka (Einlegemethode)</i>	15
4.2. <i>Modifikation von Intraokularlinsen mithilfe der Biomatrix PLGA (Beschichten)</i> ...	15
5. VORDERAUGENABSCHNITTSMODELL.....	16
6. ZELLWACHSTUM HINTER INTRAOKULARLINSEN	17
6.1. <i>Färbung mit Kristallviolett</i>	17
6.2. <i>Fotographische Analyse mit ImageJ</i>	17
7. TOXIZITÄTS-UNTERSUCHUNG MITTELS XTT-ASSAY	19
8. LABORCHEMISCHE METHOTREXAT-SPIEGEL-BESTIMMUNG	19

9.	HUMANES KAPSELSACKMODELL	20
10.	ZELL-SCRATCH-ASSAY	21
11.	STATISTISCHE ANALYSE.....	23
IV.	ERGEBNISSE	24
1.	ZELLWACHSTUM HINTER INTRAOKULARLINSEN IM VORDERAUGENABSCHNITTSMODELL	24
1.1.	<i>Disulfiram</i>	24
1.2.	<i>Retinsäure</i>	25
1.3.	<i>Rapamycin (Sirolimus)</i>	26
1.4.	<i>Kaffeensäure-Phenethylester</i>	27
1.5.	<i>Methotrexat</i>	28
1.6.	<i>Methotrexat mit PLGA</i>	29
2.	HUMANES KAPSELSACKMODELL	31
2.1.	<i>Retinsäure</i>	31
2.2.	<i>Rapamycin (Sirolimus)</i>	32
2.3.	<i>Kaffeensäure-Phenethylester</i>	33
2.4.	<i>Methotrexat und Methotrexat-PLGA</i>	34
3.	ZELL-SCRATCH-ASSAY	37
4.	TOXIZITÄTSUNTERSUCHUNG MITTELS XTT-ASSAY	37
4.1.	<i>Beladene Intraokularlinsen</i>	37
4.2.	<i>Methotrexat-PLGA-beschichtete Intraokularlinsen</i>	38
5.	METHOTREXAT-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG.....	39
5.1.	<i>Methotrexat-beladene Intraokularlinsen</i>	40
5.2.	<i>Methotrexat-und-PLGA-modifizierte IOL</i>	40
V.	DISKUSSION	42
1.	ZUSAMMENFASSUNG DER ERHOBENEN ERGEBNISSE.....	42
2.	MEDIKAMENTENFREISETZENDE INTRAOKULARLINSEN	42
2.1.	<i>Lens soaking (Dip coating)</i>	43
2.2.	<i>Lens coating mittels Linkermolekülen</i>	43
2.3.	<i>Hypercritical-fluid-Imprägnation</i>	44
2.4.	<i>Haptikmodifikation von Intraokularlinsen</i>	44
3.	LANGFRISTIGE NACHSTAR-PROPHYLAXE.....	44
4.	TOXIZITÄT VON METHOTREXAT	45
5.	PHARMAKOLOGIE UND MATERIALEIGENSCHAFTEN VON METHOTREXAT	46
6.	INTRAOKULARE PHARMAKOKINETIK.....	47
7.	KLINISCHER AUSBLICK.....	48

VI.	ZUSAMMENFASSUNG	50
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	52
VIII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	66
IX.	PUBLIZIERTE ERGEBNISSE	67
X.	DANKSAGUNG	68
XI.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	69

I. EINLEITUNG

1. Klinische Rationale (Darlegung der Notwendigkeit einer medikamentenfreisetzenden Intraokularlinse)

1.1. Die Katarakt (Grauer Star)

Die Linse ist eine bikonvexe, transparente Struktur mit einer Dicke von ungefähr 5 mm und einem Durchmesser von 9 mm¹. Funktionell dient die Linse dem Bündeln von Licht auf der Retina. Mithilfe des Ziliarmuskels kann ihre Konvexität verändert werden, um somit Objekte in verschiedener Distanz zum Auge ausreichend fokussieren zu können. Man nennt diesen Prozess Akkommodation.

Bei ausgeprägter Verfärbung und Transparenzminderung der Linse, einhergehend mit einer Störung der Sehkraft, spricht man von Katarakt².

Die Katarakt ist nach wie vor eine der Hauptursachen eines Verlustes von Sehvermögen weltweit³. Die Zunahme der Lebenserwartung in Europa führt zu einem Anstieg der Inzidenz und Prävalenz der Katarakt in der westlichen Welt⁴. Im Jahr 2010 war jede dritte Blindheit weltweit bedingt durch diese. Jede sechste Einschränkung des Sehvermögens ließ sich ebenso auf die Katarakt zurückführen⁵.

1.2. Ätiologie und Pathogenese der Katarakt

Die Ätiologie der Katarakt ist multifaktoriell⁶. Die Spannweite reicht von traumatischen (Kontusionen oder Perforationen) über endokrine Ursachen (z.B. Diabetes mellitus), Strahlung (Infrarot- oder Röntgenstrahlung), chemische und medikamentöse Einflüsse (z.B. Naphthalin oder Kortikosteroide) bis hin zu angeborenen Ursachen (im Rahmen einer Trisomie 21 oder Myotonie)⁷.

Einer der Hauptrisikofaktoren jedoch für die Entstehung eines grauen Stars, ist das Alter. Zwei Drittel aller Erkrankungen werden bei Menschen über 70 Jahren diagnostiziert. Eine gesunde Linse gewährleistet durch Aufrechterhaltung ihres Wasser- und Elektrolythaushalts mithilfe einer selektiven semipermeablen Membran, absolute Transparenz. Im Zuge des Alterungsprozesses kann es zur Bildung von oxidativen Radikalen mit Destruktion dieser Pumpen kommen⁸. Es kommt zum Schwellen der Linsenfaser. Natrium und Kalzium wandern in die Zellen, während Kalium größtenteils verdrängt wird. Zusätzlich sinkt die antioxidative Kapazität der Linse durch einen

progredienten Verlust der Aktivität von Glutathion⁹ und durch die Menge an Vitamin C im Kammerwasser¹⁰. Die Linse trübt letztlich ein.

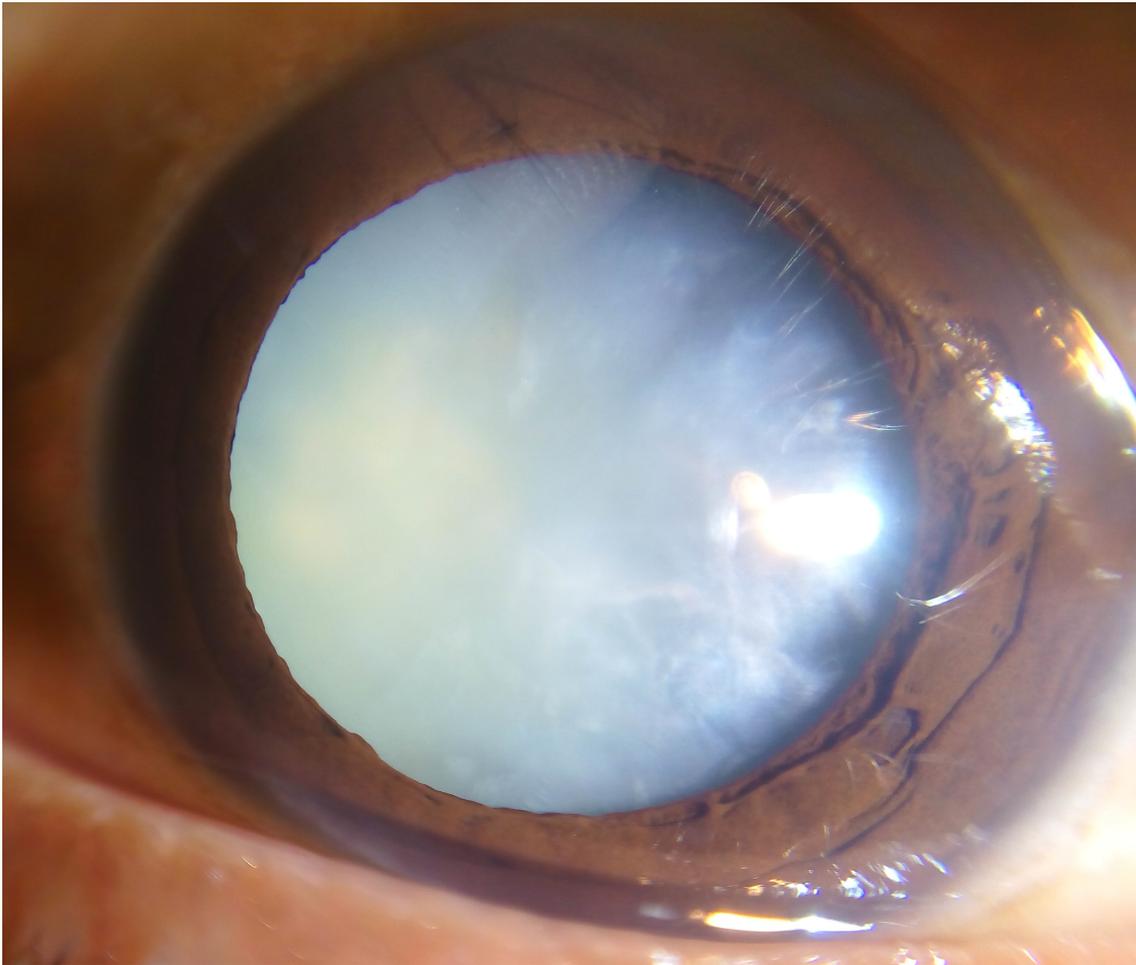


Abbildung I-1 Die Katarakt: Klinisches Bild einer Katarakt in der Spaltlampenuntersuchung (modifiziert nach American Academy of Ophthalmology)¹¹

1.3. Therapie der Katarakt

Die chirurgische Versorgung der Katarakt durch Implantation einer Intraokularlinse ist eine der häufigsten durchgeführten Operationen weltweit. Gleichzeitig gilt sie als eine der effektivsten Eingriffe der Medizin¹².

Sie erfolgt meist in lokaler Anästhesie. Dabei wird über eine kleine Inzision in der Kornea mit chirurgischen Instrumenten unter Ausübung möglichst wenig physikalischer Reizung in das Auge eingegangen. Die Eröffnung der Linse erfolgt durch eine zirkuläre Kapsulorhexis der vorderen Kapsel. Sämtliche Linsenfasern werden mittels ultraschallunterstützter Phakoemulsifikation oder eines Femtolasers zur Aufweichung der verhärteten Anteile entfernt. Residuale Linsenfasern werden nach Lockerung aspiriert und aus dem Kapselsack entfernt. Letztlich bleibt ein Kapselsack mit intakter hinterer Kapsel und einer kreisrund eröffneten vorderen Kapsel in situ erhalten. Der leere

Kapselsack wird mit einer Intraokularlinse befüllt, um weiterhin einen Beitrag zur Brechkraft des Auges zu leisten. Als Aufhängung dienen die zurückgebliebenen Zonulafasern, die den Kapselsack befestigen. Die Operationszeit beträgt ca. 10 – 15 Minuten¹³⁻¹⁵.

Neuere Femtolaser-assistierte Systeme sind bereits in klinischer Anwendung. Ursprünglich fanden diese Einsatz bei der Inzision der Kornea. Mittlerweile übernehmen sie unter anderem auch die Kapsulorhexis und die Linsenfragmentation. Bisher konnte eine Gleichwertigkeit der Femtolaser-assistierten Methode gegenüber der herkömmlichen Variante belegt werden¹⁶.

1.4. Nachstar

Nachstar ist die häufigste Komplikation nach einer Katarakt-Operation. Bei einem nicht unbeträchtlichen Anteil an Patienten entwickelt sich der Nachstar mit sekundärem Visusverlust, der wiederum eine Laserchirurgie zur Korrektur bedarf. In 5 Jahren nach einer Katarakt-Operation erkranken rund 45 % der über 60-jährigen an Nachstar¹⁷. In der Gruppe der unter 40-jährigen liegt die Rate mit 70 % höher. Bei Kindern bildet sich der Nachstar deutlich schneller aus¹⁸.

1.4.1. Pathophysiologie

Nach jeder durchgeführten Katarakt-Operation verbleiben residuale Linseneithelzellen auf der Vorderseite des Kapselsacks und am Kapseläquator, die für die Entwicklung des Nachstars verantwortlich sind¹⁹. Durch Proliferation, Migration, Epithelial-mesenchymale Transition (EMT), Kollagenveränderungen und Regeneration von Linsenfaser aus Linseneithelzellen kommt es zur zunehmenden Trübung der hinteren Kapsel²⁰. Die Katarakt-Operation ruft eine Wundheilungsreaktion in der Linse sowie in deren Kapsel hervor. Zurückgebliebene Linseneithelzellen proliferieren und migrieren über die hintere Kapsel (Abbildung I-2). Linsenfaser regenerieren sich und es kommt zur EMT²¹. In der Klinik unterscheidet man zwei morphologische Typen des Nachstars: Den proliferativen und den regenerativen Nachstar. Der proliferative Nachstar entsteht durch Proliferation und Migration der Linseneithelzellen, die eine EMT durchlaufen und letztendlich zu einer fibrösen Metaplasie mit ausgeprägtem Visusverlust durch Faltenbildung der hinteren Kapsel führen²². Der regenerative Nachstar entsteht aus den am Linsenäquator sitzenden Linseneithelzellen, die eine Regeneration und Fibrose der crystallin-freisetzenden Linsenfaser bewirken. Es kommt zur Bildung von Elschnig-Perlen und Soemmering-Ringen.¹⁹

Auf molekularer Ebene ist der Entwicklungsprozess des Nachstars noch nicht zur Gänze erforscht. Mehrere In-vitro-Studien und Experimente an Tieren schreiben verschiedenen Zytokinen sowie Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des Nachstars zu²³.

Als Vertreter der Wachstumsfaktoren seien TGF β (Transforming-Growth-Factor beta) und FGF (Fibroblast-Growth-Factor) genannt. Außerdem tragen hohe TGF β -Spiegel aktiv an der Formation des Nachstars bei²⁴. Verletzungen an okulärem Gewebe bewirken nachweislich erhöhte Spiegel an TGF β ²⁵. Des Weiteren spielen Matrix-Metalloproteinasen eine bedeutende Rolle in der Nachstar-Formation²⁶. Humane Linseneithelzellen werden durch Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen in ihrer Migration sowie der Kontraktion der Linsen-Kapsel gehindert²⁷.

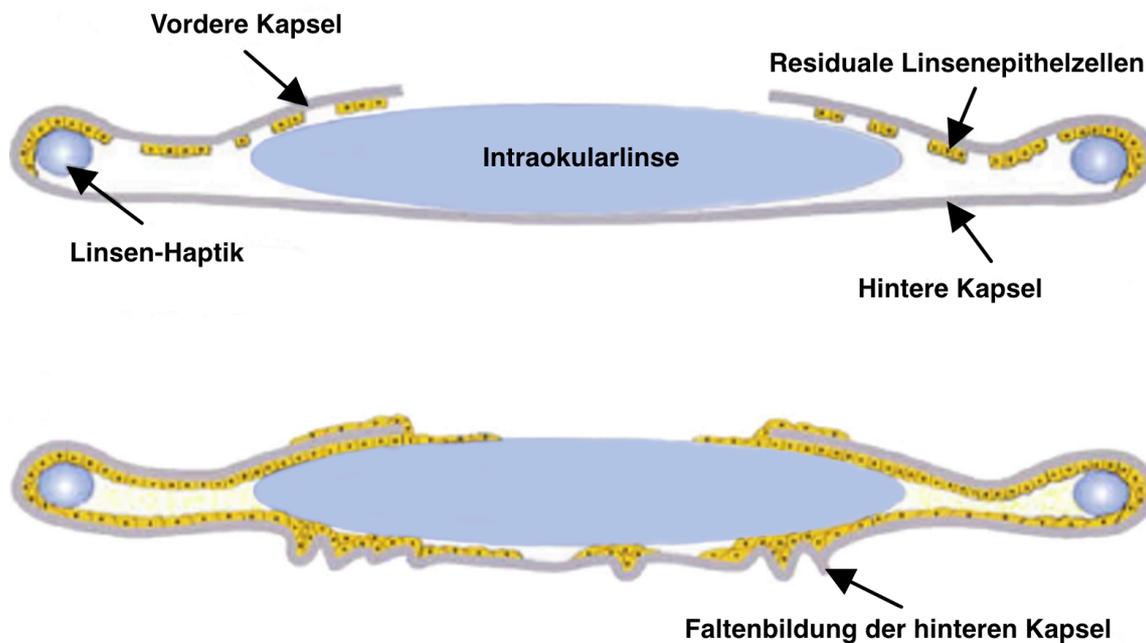


Abbildung I-2 Pathophysiologie des Nachstars (modifiziert nach Wormstone et al.²⁴): Dargestellt ist die Ausgangslage nach Katarakt-Operation und Einbringen einer Intraokularlinse. Es verbleiben wenige residuale Linseneithelzellen an der vorderen Kapsel. Diese wachsen im nächsten Schritt in Richtung Haptik und greifen auf die hintere Kapsel über. Es kommt zur Fibrose und Faltenbildung der hinteren Kapsel^{21, 24}.

1.5. Konventionelle Therapieverfahren des Nachstars

Das akzeptierte Standardverfahren zur Behandlung des Nachstars ist die sogenannte Neodymium:yttrium-aluminium-garnet Laser-Kapsulotomie (Nd:YAG)²⁸. Die Anwendung der Nd:YAG-Kapsulotomie in der Therapie des Nachstars wurde in den 1980er-Jahren von Fankhauser et al.²⁹ und Aron-Rosa et al.³⁰ beschrieben. Zuvor wurde der Nachstar durch chirurgische Spaltung der hinteren Kapsel noch während der

Katarakt-OP oder später therapiert³¹.

Bei der Nd:YAG-Kapsulotomie wird mittels Laser im infraroten Lichtspektrum eine Pulswelle auf der Innenseite der hinteren Linsenkapsel erzeugt. Dadurch kommt es zu einem Riss dieser dünnen Schicht³¹. Die Laser-Kapsulotomie birgt jedoch auch einige Risiken und Komplikationen. Es kann zu einem Anstieg des Augeninnendrucks, einer Netzhautablösung³², einem zystischen Makulaödem³¹, Uveitiden³³, einem Korneaödem³⁴ oder einer Irisblutung³¹ kommen. Des Weiteren sind Veränderungen der Intraokularlinse möglich: Das Verschieben der Intraokularlinse im Kapselsack³⁵ oder Veränderungen in der optischen Transparenz³⁶. Das Outcome der Nd:YAG-Kapsulotomie ist nach wie vor sehr gut. Terry et al. beschreiben in über 90 % der Fälle eine sofortige Besserung der Sehkraft³⁷.

Aufgrund der Häufigkeit des Nachstars¹⁷, den damit verbundenen hohen Kosten³⁸ und der Fülle an Komplikationen wird nach anderen Möglichkeiten der Nachstarprophylaxe gesucht.

2. Stand der Forschung: Aktuelle klinische Möglichkeiten der Nachstarprophylaxe

2.1. Design und Material von Intraokularlinsen

Es hat sich bestätigt, dass das Design von Intraokularlinsen eine entscheidende Rolle in der Formation des Nachstars spielt³⁹. Bereits Anfang der 90er-Jahre wurde ein signifikant geringeres Auftreten des Nachstars bei Intraokularlinsen mit kantigem Umschlag von der Vorder- auf die Rückseite entdeckt⁴⁰. Im Laufe der Zeit erkannte man, dass hauptsächlich die hintere optische Kante für die Entwicklung des Nachstar ausschlaggebend ist³⁹. Die hintere optische Kante entspricht dem Umschlagspunkt der hinteren Linsenfläche auf die Linsenkante. Letztlich konnten Nishi et al. in mehreren Studien, unter anderem am Hasenmodell zeigen, dass nicht vorrangig das Material (Silikon, Polymethylmethacrylat oder hydrophobes Acrylat) der Intraokularlinse, sondern die Form der Kante entscheidend für die Prophylaxe des Nachstars ist. Die geringste postoperative Inzidenz des Nachstars zeigte sich bei Intraokularlinsen mit der sogenannten scharfen Kante^{41, 42}. Mithilfe der scharfen Kante schafft es die Intraokularlinse den kontinuierlichen Verlauf der hinteren Kapsel etwas zu durchbrechen und damit den Kontakt zwischen migrierenden Linsenepithelzellen (LEC) zu vermindern⁴³.

Betreffend das Material unterscheidet man derzeit im Wesentlichen zwei Arten von

Intraokularlinsen: Acrylat mit hydrophilen bzw. hydrophoben Eigenschaften²⁰. Es konnte gezeigt werden, dass Intraokularlinsen mit hydrophilem Acrylat besser biokompatibel sind⁴⁴, gleichzeitig aber eine erhöhte Inzidenz von Nachstar⁴⁵ gegenüber PMMA-Intraokularlinsen oder Intraokularlinsen aus Silikon aufweisen, weswegen diese in der Klinik mittlerweile obsolet sind⁴⁶.

2.2. Chirurgische Möglichkeiten der Nachstarprophylaxe

Es wurden verschiedene chirurgische Techniken untersucht, um diese LEC möglichst vollständig mit der Linse zu entfernen. Zu den Methoden gehörten neben ultraschallunterstützter Entfernung der LEC verschiedenste Aspirationstechniken^{47, 48}. Obendrein wurde ein manuelles Säubern der verbliebenen Kapsel mit metallenen oder aus Silikon gefertigten Schabern sowie mit eigens gefertigten Küretten versucht⁴⁹. Nishi et al. beschreiben ein signifikant geringeres Auftreten von Nachstar bei Verwendung der ultraschallunterstützten Vakuumextraktion von residualen Linsenepithelzellen und –fasern⁴⁷. Khalifa et al. hingegen beschrieben keinen signifikanten Unterschied zwischen manuell bereinigter und nicht bereinigter Kapsel bezüglich des Langzeitauftritts von Nachstar⁵⁰. In einer anderen Studie wurden die Nachstar-Raten zwischen klassischer Phakoemulsifikation, Phakoemulsifikation kombiniert mit Vakuumextraktion sowie eine extrakapsuläre Katarakt-Extraktion (ECCE) verglichen. Es zeigte sich zwar eine signifikant geringere LEC-Zahl bei Phakoemulsifikation gegenüber der ECCE, die Zellproliferation der einzelnen Gruppen blieb davon aber unbeeinträchtigt, sodass für eine adäquate Prophylaxe des Nachstars eine fast 100 %-ige Entfernung der Linsenepithelzellen notwendig ist⁵¹.

3. Experimentelle Ansätze: Pharmakologische Nachstarprophylaxe

3.1. Potentielle Pharmaka in der Nachstarprophylaxe

Aufgrund der multifaktoriellen Pathogenese und zahlreicher molekularbiologischer Grundlagen in der Pathogenese des Nachstars bieten sich vielerlei pharmakologische Angriffspunkte zur Prophylaxe des Nachstars. Deshalb gibt es zahlreiche präklinische Arbeiten, die potenzielle Stoffe identifizieren⁵². Eine klinische Anwendung ist bisher noch nicht erfolgt.

Eine strukturierte Literaturrecherche auf PubMed konnte 62 Substanzen, die einen Einfluss auf den Nachstar haben sollten, identifizieren. Weiter evaluiert wurden lediglich

Stoffe, die durch die US Food and Drug Administration oder die Europäische Arzneimittel-Agentur zugelassen sind. Mutagene Substanzen bzw. Substanzen deren Träger ein Virus ist oder RNA enthält, wurden ebenso vom Screening ausgeschlossen. Voraussetzung war außerdem, dass die pharmakologischen Substanzen sicher im Labor zu verwenden sind und zellkultur-kompatibel sind⁵³.

Die 21 übriggebliebenen Stoffe wurden zum einen auf ihre proliferationshemmende Wirkung auf Linsenepithelzellen sowie möglicherweise auftretende toxische Effekte untersucht. Im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit (Herr Pongsthorn Piravej) in unserem Labor wurden potenzielle Pharmaka zur Nachstarprophylaxe systematisch miteinander verglichen. Schlussendlich zeigten sich folgende fünf Stoffe als ausreichend proliferationshemmend bei gleichzeitig nicht-toxischer Wirkung auf Linsenepithelzellen⁵³.

3.1.1. Disulfiram

Einer dieser Kandidaten ist der Aldehyddehydrogenase-Hemmer Disulfiram. Eigentlich eingesetzt bei Alkoholabusus⁵⁴ wirkt es unter anderem inhibierend auf Matrix-Metalloproteinasen⁵⁵ und damit reduktiv auf die Proliferation von Linsenepithelzellen²⁷. Überdies wurde in den 1970er-Jahren synergistische Effekte von Disulfiram mit einigen Chemotherapeutika in Bezug auf das Mammakarzinom beobachtet⁵⁶.

3.1.2. Retinsäure

Retinoide gelten als antiproliferativ wirkende Substanzen, die das Wachstum von epithelialen, mesenchymalen und neoplastischen Zellen hemmen⁵⁷. In der Ophthalmologie wird der Wirkstoff bereits seit einigen Jahren topisch bei Xerophthalmie angewandt⁵⁸. Inan et al. konnten in einer Studie an Hasen zeigen, dass es bei intrakapsulärer Anwendung von Retinsäure während der Phakoemulsifikation, zu signifikant geringerem Auftreten von Nachstar nach drei Monaten kommt⁵⁹.

3.1.3. Rapamycin

Ebenso ein potenzielles Pharmakon in der Nachstarprophylaxe ist Rapamycin. Rapamycin ist ein Immunsuppressivum mit antiproliferativer Wirkung⁶⁰. Rapamycin-freisetzende Koronarstents befinden sich bereits in klinischer Anwendung und zeigen bedeutend geringere Restenose-Raten⁶¹. Aus einer Studie von Liu et al. geht hervor, dass durch Rapamycin die Zeit bis zum Auftreten von Nachstar im Hasen-Modell signifikant verlängert werden konnte⁶².

3.1.4. Kaffeesäure-Phenethylester

Kaffeesäure-Phenethylester führte in einer Studie am Hasen-Modell nach intrakapsulärer Injektion zu einer signifikant geringeren Rate an Nachstar⁶³.

3.1.5. Methotrexat

Zuletzt sei noch Methotrexat (MTX) erwähnt, welches als Folsäure-Analogon in der Therapie von Neoplasien und Autoimmunerkrankungen angewandt wird⁶⁴. Hansen et al. zeigten, dass MTX in Kombination mit spezifischen Antikörpern gegen das Basalmembran-Kollagen effektiv das Wachstum von Linsenepithelzellen inhibiert⁶⁵. Es existieren bereits etliche Studien zur intravitrealen Anwendung von MTX bei ZNS-Lymphomen mit okulärer Beteiligung⁶⁶, proliferativer Vitreoretinopathie⁶⁷ und altersbedingter Makuladegeneration⁶⁸.

4. Stand der Forschung: Entwicklung von medikamentenfreisetzenden Intraokularlinsen

Die Oberflächenmodifikation von Intraokularlinsen wird als eine bequeme Methode der Nachstarprophylaxe diskutiert. Die modifizierte Intraokularlinse soll im Rahmen der Katarakt-Operation eingeführt werden und einen weiteren operativen Eingriff ersparen²⁰. Ziel ist es, durch die Beschichtung der Intraokularlinse mit Pharmaka einerseits deren Biokompatibilität aufrechtzuerhalten und andererseits einen Medikamententräger zu erstellen, der auch längerfristig einen konstanten Medikamentenspiegel gewährleistet⁶⁹.

Letztlich können drei Möglichkeiten der Modifikation von Intraokularlinsen unterschieden werden (Abbildung I-3): das Beschichten der Linsenoberfläche („Lens coating“), das Beladen des gesamten Linsenacrylates („Lens soaking“) und die Modifikation der Linsenoptik^{69, 70}.

Beim Lens soaking nutzt man die chemischen Eigenschaften der pharmakologischen Substanz sodass sie selbst mit der Oberfläche und dem Inneren der Intraokularlinse Verbindungen eingeht. Die Menge an Arzneimittel, die in die und auf der Linse aufgenommen wird, hängt von vielen Faktoren ab: Intraokularlinsen-Material (Silikon, hydrophiles oder hydrophobes Acrylat), Intraokularlinsen-Design (Größe, Optik-Design), die Beladungszeit mit Pharmakon, die chemische Struktur und die molekularen Eigenschaften sowie Umweltfaktoren wie die Temperatur^{71, 72}.

Optikmodifikationen wurden bereits in unterschiedlicher Form untersucht. Eperon et al. beluden PLGA mit Triamcinolon und gossen aus diesem Gemisch kleine Scheibchen.

Diese wurden wie eine Kette auf die Haptik gefädelt und im Hasen-Modell evaluiert. Es zeigte sich eine signifikant verringerte Entzündungsreaktion im Sinne einer Reduktion der Entzündungszellen und der Proteine im Kammerwasser⁷³.

Beim Verfahren des ‚Lens coating‘ werden Arzneistoffe häufig mit biokompatiblen Linkermolekülen (z.B. PLGA: Polylactid-co-Glycolid⁷⁴ oder pHEMA: poly-Hydroxyethylmethacrylat) kombiniert, um ein Maximum an Effizienz in der Beschichtung zu erreichen⁶⁹. Liu et al. beschichteten die Kanten von Intraokularlinsen mithilfe von Druckluft mit einem Gemisch aus Rapamycin und PLGA. Diese Intraokularlinsen wurden Hasen eingesetzt und im Follow-up die Entzündungszellen und Proteine im Kammerwasser bestimmt. Auch hier ließ sich ein signifikant geringer ausfallender Entzündungsprozess gegenüber den unbeschichteten Linsen finden⁶².

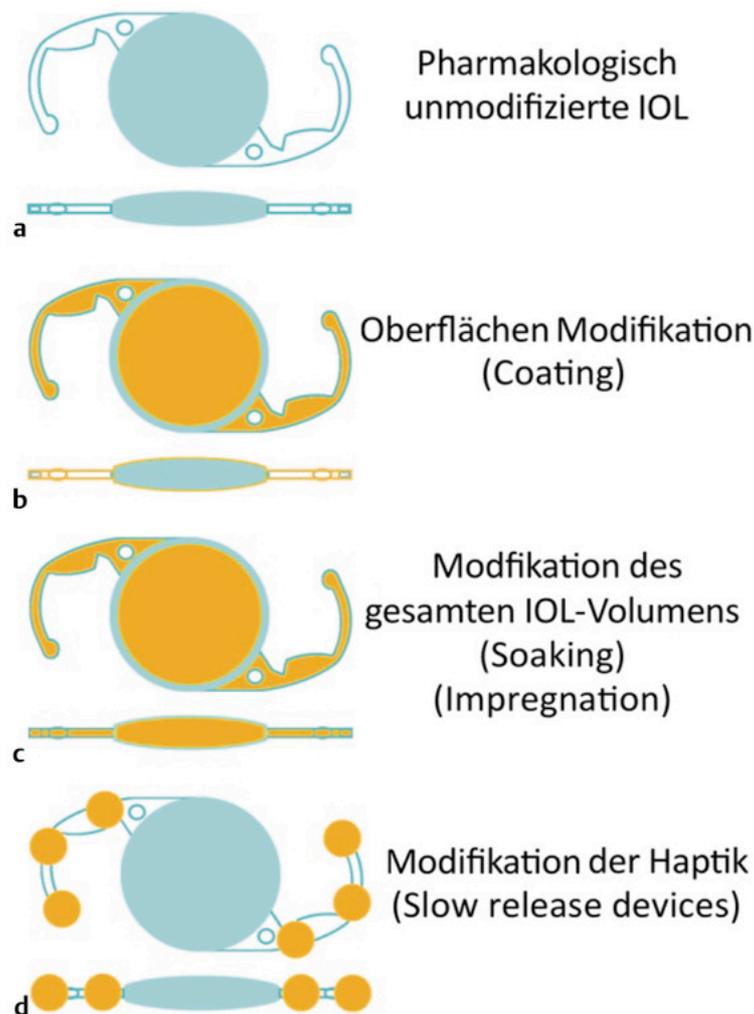


Abbildung I-3 Intraokularlinsen-Modifikationen: Dargestellt sind die verschiedenen Möglichkeiten der Modifikation von Intraokularlinsen. a: unmodifizierte Intraokularlinse; b: beschreibt das Verfahren des ‚Lens coating‘, wobei nur die Oberfläche der Intraokularlinse modifiziert wird; c: Mithilfe des ‚Lens soaking‘ wird das komplette Acrylat der Intraokularlinse mit Arzneimittel beladen; d: Haptikmodifikation

mittels zuvor präparierter Medikamenten-Träger (meist aus Linkermolekül und Arzneistoff)⁶⁹.

5. Ein Medizinprodukt – Die medikamentenfreisetzende Intraokularlinse

Die vorgelegte experimentelle Doktorarbeit beschäftigt sich nicht mit den molekularen Grundlagen der Medikamentenwirkung. Diese wurden in der Literatur schon weitestgehend beschrieben⁵². Das Ziel war die Durchführung eines translationalen Forschungsprojektes. Es soll ein geeignetes Trägersystem für eine pharmakologische Substanz gefunden werden, das zeitnah klinisch eingesetzt werden kann. Um diesen Prozess zu vereinfachen, sollten schon in den präklinischen Studien einige Überlegungen getroffen werden.

5.1. Einordnung der medikamententragenden Intraokularlinse als Medizinprodukt

Hinsichtlich des Zulassungsverfahrens unterscheidet das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) oder immer mehr die European Medicines Agency (EMA) neben vielen Besonderheiten grob zwei verschiedene Verfahren: Die Medizinproduktzulassung und die Arzneimittelzulassung⁷⁵.

Medizinprodukte sind Produkte mit medizinischer Zweckbestimmung, die primär nicht über pharmakologische, immunologische oder metabolische Wege wirken, sondern vielmehr zum Beispiel physikalisch. Ihre Anwendung ist durch den Hersteller für den Menschen bestimmt. Anders als Arzneimittel unterliegen diese dem Medizinproduktegesetz (MPG). Hierzu zählen vor allem Implantate, Produkte zur Infusion, Injektion, Dialyse, aber auch medizinische Software, Herzschrittmacher und viele mehr. Die exakte Definition ist über den § 3 des MPG geregelt⁷⁶.

Bei der Intraokularlinse als Medikamententräger ist die Produktabgrenzung zwischen Medizinprodukt und Arzneimittel nicht einfach, da sie sowohl ein Arzneimittel enthält als auch ein Medizinprodukt ist. Gesetzlich wird folgende Regel aufgeführt: „... die Entscheidung darüber, ob ein Produkt ein Arzneimittel oder ein Medizinprodukt ist, erfolgt insbesondere unter Berücksichtigung der hauptsächlichen Wirkungsweise des Produkts (...)“⁷⁷. Die Intraokularlinse als klassisches Medizinprodukt⁷⁸ hat die klare primäre Aufgabe zur Behebung der Katarakt und Wiederherstellung der Sehkraft. Die pharmakologische Modifizierung zur Verhinderung des Nachstars ist eine sekundäre Aufgabe.

Letztlich können die Gesetzesgrundlagen keine Empfehlungen zur Beachtung aufzeigen und niemals einen Anspruch auf Vollständigkeit oder gar Allgemeingültigkeit erheben⁷⁸. Die Bewertung des Produktes erfolgt als Einzelfallentscheidung⁷⁷. Jedoch werden ähnliche Implantate wie der medikamentenbeschichtete Stent als Medizinprodukt mit CE-Kennzeichnung bewertet⁷⁹.

5.2. Die wichtigsten Eckpunkte in der Medizinproduktzulassung

Auch die Zulassung eines Medizinproduktes sowie deren Zertifizierung unterliegt den gesetzlichen Regelungen des MPG. Im zweiten Abschnitt des MPG sind sämtliche Anforderungen an Medizinprodukte sowie Voraussetzungen für die Zulassung eines Medizinproduktes festgelegt⁷⁷:

- *Es darf kein Medizinprodukt in Umlauf gebracht werden, das Menschen schadet, abgelaufen ist oder nicht die versprochene Leistung erbringt, die ihm beigelegt wurde.*
- *Verantwortlich für das Inverkehrbringen eines Medizinproduktes ist der Hersteller.*
- *In Deutschland dürfen nur Medizinprodukte in den Verkehr gebracht werden, die mit der CE-Kennzeichnung versehen sind.*
- *Die CE-Kennzeichnung kann nur angebracht werden, wenn das implantierbare Medizinprodukt Anhang 9 der Richtlinie 90/385/EWG erfüllt.*
- *Ebenso muss eine Stelle benannt werden, die die Einhaltung der Kriterien nach Richtlinie 90/385/EWG prüft.*

Die Eignung eines Medizinproduktes für den veranschlagten Verwendungszweck muss anhand klinischer Daten belegt werden. Diese müssen unter anderem auch die Testung von unerwünschten Wirkungen beinhalten. Diese klinische Prüfung sieht zuvor ein Votum der Ethikkommission vor. Liegt dieses vor, kann ein Genehmigungsverfahren bei der Bundesoberbehörde eingereicht werden. Im Falle der medikamentenfreisetzenden Intraokularlinse ist dies das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte⁷⁷.

II. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, eine medikamentenfreisetzende Intraokularlinse zu entwickeln. Dabei wurde sich streng an den Anforderungen einer Medizinproduktentwicklung orientiert. Zunächst wurden im Rahmen einer anderen Doktorarbeit zahlreiche bereits publizierte Pharmaka⁵³ vorevaluiert. Diese Stoffe wurden so klassifiziert, dass eine klinische Anwendung mittelfristig wahrscheinlich ist. Im Anschluss sollte die Wirkung der Intraokularlinse auf die Verhinderung des Nachstars *in vitro* und *in vivo* getestet werden. Letztlich sollte die Intraokularlinse neben ihrer eigentlichen Funktion als transparenter Linsenersatz zu einem geeigneten Medikamententräger aufgewertet werden, ohne sie in ihrer ursprünglichen Funktion und Ergonomie für den Operateur einzuschränken. Ein wichtiges Kriterium der Medizinproduktentwicklung ist die Sicherheit. Diese sollte ebenfalls in dieser Arbeit untersucht werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Zellkultur

Arbeiten an der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer mit Lamina Air Flow ausgestatteten sterilen Arbeitsbank. Für alle Versuche wurde die spontan immortalisierte Zelllinie FHL-124 (M. Wormstone, Großbritannien)⁸⁰ sowie die Zelllinie CEC-SV40 (J. Bednarz, Deutschland)⁸¹ verwendet. Die Zellen wurden auf unbeschichteten Zellkulturflaschen (NUNC, Langenselbold, Deutschland) in 12 ml MEM Earle's (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) kultiviert. Das Zellkulturmedium (MEM Earle's) wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 50 IU Penicillin/ml und 50 µg Streptomycin/ml (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) versetzt. Die Zellkultivierung fand unter standardmäßigen Zellkulturbedingungen, in einem Inkubator (Hera Cell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 37°C und einem 5% Kohlenstoffdioxidgehalt, statt. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten Tag erneuert. Die Zellen wurden täglich unter dem Phasen-Kontrast-Mikroskop DFC 295 (Leica Microsystems, Solms, Deutschland) untersucht und nur bei deutlich sichtbarer Proliferation für weitere Versuchsvorhaben verwendet. Bei mikroskopischer Konfluenz des Zellrasens kam Versene 1 : 5000, angereichert mit Trypsin 2.5 % (Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Deutschland), zur Subkultivierung zum Einsatz.

2. Pharmaka

Mithilfe von Proliferations- und Toxizitäts-Assays konnten in unserem Forschungslabor im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit (Herr Pongsthorh Piravej) zuvor Pharmaka mit potenzieller Proliferationshemmung auf Linsenepithelzellen in nicht toxischer Konzentration eruiert werden (Daten hier nicht gezeigt). Diese wurden im Rahmen der folgenden Arbeit sowohl in In-vitro-Modellen, als auch in Ex-vivo-Modellen auf ihre proliferationshemmende Komponente untersucht und verglichen (Tabelle III.1).

Pharmakon	Hersteller	Trägerlösung	Konzentration in Trägerlösung	Für Versuch
Disulfiram	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	PBS Dulbecco's	> 10 µM	<ul style="list-style-type: none"> • Vorderaugenabschnittsmodell
Methotrexat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	PBS Dulbecco's	> 750 µM	<ul style="list-style-type: none"> • Vorderaugenabschnittsmodell • Humanes Kapselsackmodell

				<ul style="list-style-type: none"> • Laborchemische Konzentrationsbestimmung • Toxizitätsuntersuchung
		PLGA-2-Propanol	> 750 μM	<ul style="list-style-type: none"> • Vorderaugenabschnittsmodell • Humanes Kapselsackmodell • Laborchemische Konzentrationsbestimmung • Toxizitätsuntersuchung
Rapamycin (Sirolimus)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	PBS Dulbecco's	> 1 mM	<ul style="list-style-type: none"> • Vorderaugenabschnittsmodell • Humanes Kapselsackmodell • Toxizitätsuntersuchung
Retinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	PBS Dulbecco's	> 250 μM	<ul style="list-style-type: none"> • Vorderaugenabschnittsmodell • Humanes Kapselsackmodell • Toxizitätsuntersuchung
Kaffeesäure-Phenethylester	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	PBS Dulbecco's	> 100 μM	<ul style="list-style-type: none"> • Vorderaugenabschnittsmodell • Humanes Kapselsackmodell • Toxizitätsuntersuchung

Tabelle III.1 Pharmakologische Stoffe und deren Konzentration zur Untersuchung in unterschiedlichen Zellkulturmodellen

3. Verwendete Intraokularlinsen

3.1. Hoya YA-65BB

Die Intraokularlinse YA-65BB (Hoya Surgical Optics GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) wird aus hydrophobem Acrylat mit hydrophoben Oberflächeneigenschaften, scharfer Kante sowie einer C-förmigen Haptik gefertigt. Sie besitzt einen Gesamtdurchmesser von 13,0 mm bei einem optischen Durchmesser von 6,5 mm. Es handelt sich um eine monofokale, bikonvexe Intraokularlinse.

3.2. Rayner Raysoft 574R

Die Intraokularlinse Raysoft 574R (Rayner Intraocular Lenses Limited, Worthing, Großbritannien) besitzt hydrophile Oberflächeneigenschaften ebenso eine scharfe Kante, bei Fertigung aus hydrophilem Acrylat und V-förmiger Haptik. Der Wassergehalt der Intraokularlinse beträgt 26 %.

4. Pharmakologische Modifikation von Intraokularlinsen

4.1. Beladen des Linsen-Acrylats mit Pharmaka (Einlegemethode)

Beim Verfahren des Einlegens wurden zuvor unbehandelte, steril verpackte Intraokularlinsen aus hydrophilem und hydrophobem Acrylat mit Medikamenten beladen. Die Intraokularlinsen wurde mithilfe einer Pinzette in eine 12-Well Zellkulturplatten (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) überführt und in je 1 ml der zuvor hergestellten Lösung aus PBS und dem entsprechenden pharmakologischen Stoff eingelegt. Als Negativkontrollen fungierten mit reinem PBS Dulbecco's beladene Intraokularlinsen. Nach einer Beladungszeit von 72 Stunden, unter Wahrung der Sterilität, konnten die Intraokularlinsen für die weitere Untersuchung in den unten beschriebenen Zellkulturmodellen verwendet werden. Alle pharmakologischen Einlegelösungen wurden übersättigt, um ein ausreichendes Beladen der Intraokularlinse zu ermöglichen.

4.2. Modifikation von Intraokularlinsen mithilfe der Biomatrix PLGA (Beschichten)

Für diese Versuche wurde Polylactid-co-Glycolid (PLGA) [Resomer® RG 503 H (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)] mit einer Molekülmasse von 24000 – 38000 g/mol und einem Mischungsverhältnis zwischen Milchsäure und Glycolsäure von 50 : 50 verwendet. Gemeinsam mit 10 ml der Methotrexat-2-Propanol-Suspension wurden 200 mg PLGA in einen Glaskolben überführt. Ein Verflüchtigen des 2-Propanols wurde mithilfe von Parafilm verhindert. Bei einer Temperatur von rund 50 Grad Celsius und mäßiger Rührgeschwindigkeit verweilte der Glaskolben für 24 Stunden auf dem Magnetrührer (IKA, Staufen, Deutschland). Nur so konnte eine adäquate Verteilung des PLGA in Lösung erreicht werden. Auf dieselbe Weise wurde eine Methotrexat-freie Suspension aus 2-Propanol und PLGA hergestellt. Diese diente als eine der Negativkontrollen.

Das Beschichten der hydrophilen und hydrophoben Intraokularlinsen erfolgte durch Luftdruck mithilfe der Airbrush AT-AK-02 (Agora-Tec GmbH, Schmalkalden, Deutschland), angeschlossen an einen Kompressor (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland). Aus etwa 10 cm Entfernung wurden die Intraokularlinsen mit einem Arbeitsdruck von rund 3 bar für ca. 1 – 2 min gleichmäßig von allen Seiten mit der MTX-PLGA-2-Propanol-Suspension bzw. der PLGA-2-Propanol-Suspension besprüht. Daneben dienten mit reinem 2-Propanol beladene Intraokularlinsen als weitere Negativkontrolle. Nach einer Trocknungszeit von 24 Stunden konnten die beschichteten

Intraokularlinsen für die anschließenden Versuchsvorhaben verwendet werden.

Alle mittels Airbrush durchgeführten Arbeiten fanden ausschließlich unter einem Laborsystem mit Chemikalien-Abzug und Schutzglaswand statt.

5. Vorderaugenabschnittsmodell

Das In-Vitro-Modell des vorderen Augenabschnittes wurde nach Gotoh et al.⁸² modifiziert und durchgeführt. Ähnlich dem vorderen Augenabschnitt ist das Modell in zwei Kammern aufgeteilt: Eine imitiert die Vorderkammer, die zweite den Kapselsack. Letztere wird durch ein Zellkulturinsert (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), das eine modifizierte Intraokularlinse enthält, welche durch ein Ein-Gramm-Gewicht (Häfner GmbH, Oberrot, Deutschland) auf einer semipermeablen Membran fixiert wird, gebildet. Dieses Insert wird in das Well einer 12-Well-Platte überführt, welches 1 ml Zellkulturmedium enthält. Die Membran ermöglichte ein freies Diffundieren des Zellkulturmediums zwischen den beiden Kammern. Dies simuliert die Situation nach einer Katarakt-Operation im menschlichen Kapselsack und letztlich die Ausgangslage zur Formation des Nachstars. Die Fixierung der IOL mittels eines Feingewichtes soll einen durchgehenden Kontakt der Intraokularlinse auf der Membran des Zellkulturinserts gewährleisten (Abbildung III-1).

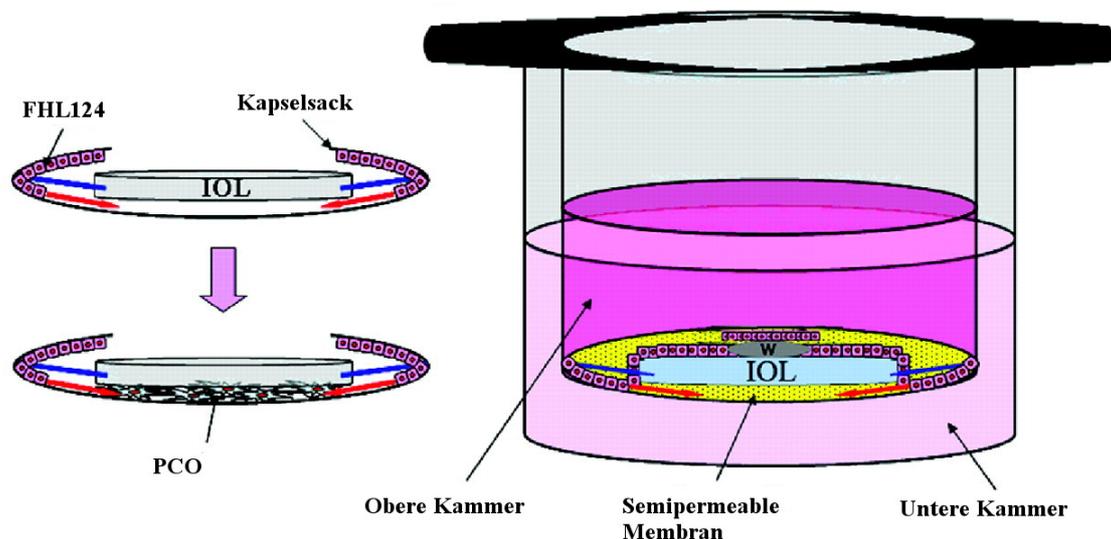


Abbildung III-1 Vorderaugenabschnitts Modell nach Gotoh et al.⁸²: li.: In-Vivo-Situation bei Nachstar im humanen Kapselsack; re.: Versuchsaufbau des Vorderaugenabschnittsmodell IOL: Intraokularlinse; PCO: Nachstar (posterior capsule opacification).

Die Zellen wurden vorsichtig über die Oberfläche und an den Rand der Intraokularlinsen geträufelt. Unter Vermeidung von Erschütterungen wurde die 12-Well-Zellkulturplatte in

den Inkubator versetzt. Das Zellwachstum richtet sich von den Rändern der Intraokularlinsen in Richtung des Zentrums hinter der Intraokularlinse, ähnlich der In-Vivo-Situation des Nachstars. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Proliferation und Migration der FHL-124 Zellen analysiert und ausgewertet.

Bei den Versuchen zur ‚Einlegemethode‘ wurden pro behandelter Intraokularlinse zwei Negativkontrollen mit reinem PBS erstellt. Insgesamt wurden pro Medikament je drei Versuchsreihen sowohl für hydrophile, als auch für hydrophobe Intraokularlinsen durchgeführt.

Für die Airbrush-Methode wurden drei verschiedene Negativkontrollen verwendet: eine unbehandelte, eine rein mit 2-Propanol beschichtete sowie eine mit 2-Propanol und PLGA modifizierte Intraokularlinse. Gesamt wurden je vier Versuchsreihen für hydrophile und hydrophobe Intraokularlinsen vorgenommen.

6. Zellwachstum hinter Intraokularlinsen

Das Vorderaugenabschnittsmodell simuliert den pathophysiologischen Vorgang bei Nachstar⁸². Gemessen wurde quantitativ das Wachstum der FHL-124 Zellen auf der Membran hinter der Intraokularlinse. Hierzu wurde die mit Zellen bedeckte Oberfläche mittels fotografischer Auswertung der zuvor gefärbten Membranen gemessen.

6.1. Färbung mit Kristallviolett

Nach Entfernen der Feingewichte und der Intraokularlinsen wurde das Zellkulturmedium aus den Zellkulturinserts abgenommen. Die darauf adhärenen FHL-124 Zellen wurden durch eine zehnminütige Behandlung mit Methanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Nach einer Trocknungszeit von einer Minute wurden die Inserts mit 0.1 % Kristallviolett-Citrat-Lösung bedeckt. Die Herstellung der Kristallviolett-Lösung erfolgte nach Freshney⁸³. Nach 10 Minuten wurden die Inserts mit deionisiertem Wasser gespült. Danach folgte eine 24-stündige Trocknung bei Raumluft.

Nach der Trocknungsphase wurden die Membranen der Zellkulturinserts vorsichtig und vollständig ausgeschnitten und auf einem Objektträger angeordnet. Auf 50 Grad Celsius erhitztes Kaisers Glycerol-Gelatine diente als endgültige Fixierung unter dem Deckglas. Im Anschluss wurden die fertigen Objektträger bei Raumluft getrocknet und gelagert.

6.2. Fotografische Analyse mit ImageJ

Die Bilder der gefärbten Inserts wurden mit der Kamera Canon 5D Mark III (Canon Inc., Tokio, Japan) und dem Objektiv EF 100mm/2.8L bei konstanter Entfernung (Canon Inc.,

Tokio, Japan) aufgenommen.

Die weitere Auswertung wurde mit der Software ImageJ 1.50c4 (Rasband, W., National Institutes of Health, USA) vorgenommen. Basierend auf einer Farbdichte-Kontrast-Messung wurde die bedeckte Oberfläche der Inserts mit FHL-124 Zellen quantitativ bestimmt. Hierzu wurde das Bild in ImageJ bearbeitet. Mit der Funktion ‚RGB Stack‘ wurde das Bild in die Farbspektren Rot, Blau und Grün aufgeteilt. Die einzelnen Farbspektren wurden automatisch in je ein Graustufen-Bild konvertiert. Für die Messung der Zellausbreitung eignete sich das Grün-Spektrum als kontrastreichstes am besten. Die Funktion ‚Threshold‘ legte einen roten Farbschleier über die gefärbten Zellen (Abbildung III-2).

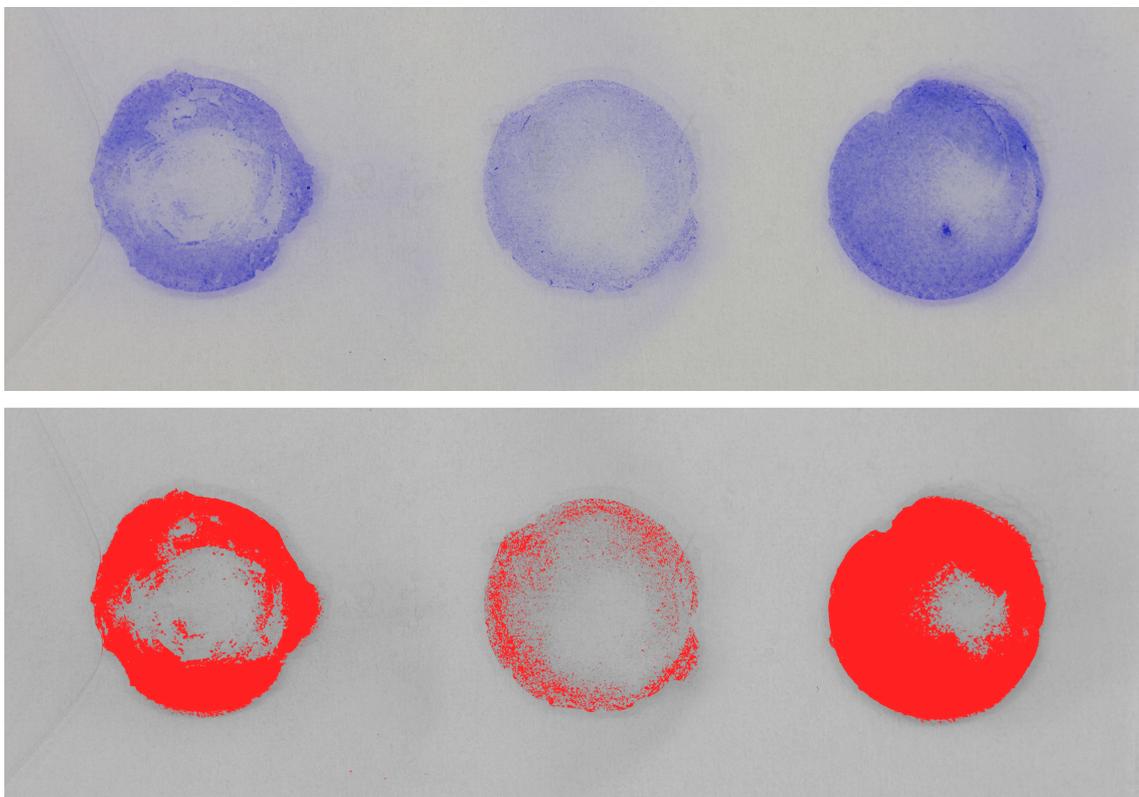


Abbildung III-2 Ausgeschnittene Inlays auf Objektträgern: o.: Fixierte und mit Kristallviolett gefärbte Inlays; u.: Mit der Threshold-Funktion in ImageJ maskierte Inlays.

Das Ellipsen-Werkzeug eignete sich am besten zur Maskierung der rot überlagerten Zellen auf der Membran. Die rot eingefärbten Pixel konnten quantitativ zur Bestimmung der bewachsenen Fläche gemessen werden.

Diese Methode wurde bei allen drei bzw. vier Inserts pro Objektträger durchgeführt. Die erhobenen Daten wurden in Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corp., Redmond, USA) zur weiteren statistischen Auswertung überführt.

7. Toxizitäts-Untersuchung mittels XTT-Assay

Der XTT-Assay wurde angelehnt an seinen Erstbeschreiber Scudiero⁸⁴ und angepasst an die ophthalmologische Zellkultur nach Spitzer⁸⁵ durchgeführt. Er basiert auf der Reduktion von 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid (XTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem gelblich-bräunlichem Formazan-Produkt.

Zur Untersuchung der Toxizität auf Zellen des vorderen Augenabschnittes, wurden für die folgende Versuchsreihe eine korneale Endothelzelllinie (CEC-SV40) verwendet.

CEC-SV40 wurden bis zur Konfluenz unter üblichen Laborbedingungen inkubiert. Bei Erreichen eines durchgängigen Zellrasens wurde für 24 Stunden serumfreies Medium appliziert. Im Anschluss wurden analog zum Vorderaugenabschnittsmodell Zellkultur-Inserts (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) mit modifizierten Intraokularlinsen sowie unbehandelten Intraokularlinsen, die als Kontrollen fungierten, über den konfluenten Zellrasen überführt und für 72 Stunden inkubiert.

Nach Abnehmen der Zellkulturinserts und des Zellkulturmediums erfolgte die Auswertung durch die Hinzugabe von 700 µl einer Lösung aus 1 mg/ml XTT in Medium 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sowie 20 µl des Aktivierungsreagens 5 mM Phenazin-Methosulfat (PMS) in PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Inkubation für ca. 90 Minuten bei 37°C und letztlich Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels ELISA-Reader (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

8. Laborchemische Methotrexat-Spiegel-Bestimmung

Zur Bestimmung der Methotrexat-Konzentration wurde der Siemens EMIT® Methotrexat Assay (Siemens AG, München, Deutschland) analog zu den Angaben des Herstellers in der zugehörigen Anleitung verwendet.

Sowohl mit Methotrexat und PLGA modifizierte Intraokularlinsen, als auch lediglich methotrexatbeladene Intraokularlinsen wurden in jeweils 1 ml PBS in einer Zellkulturschale eingelegt und im Inkubator aufbewahrt.

Täglich fand ein Wechsel der Flüssigkeit statt. Das abgenommene PBS wurde in Mikroreaktionsgefäße überführt und nach adäquater Etikettierung gekühlt an das Institut für Laboratoriumsmedizin überstellt, wo die Bestimmung der Methotrexat-Konzentration mithilfe des genannten Assays vorgenommen wurde.

Der Versuch wurde sowohl mit hydrophilen als auch mit hydrophoben Intraokularlinsen jeweils dreimal durchgeführt.

9. Humanes Kapselsackmodell

60 humane Spenderaugen von 30 Organspendern im Alter von 21 bis 77 Jahren (mittleres Alter: 56 Jahre) wurden von der Hornhautbank der Münchner Universitätsklinik zur Verfügung gestellt. Das Spendermaterial wurde innerhalb 12 bis 24 Stunden post-mortem verarbeitet. Aus der Krankengeschichte aller Organspender waren keine Erkrankungen des visuellen Apparates bekannt. Die Gewinnung des humanen Spendergewebes erfolgte unter Wahrung der menschlichen Würde sowie einem vorab eingeholten Einverständnis, entsprechend der Deklaration von Helsinki und der Zustimmung der lokalen Ethikkommission (Projektnummer 734-16).

Die Präparation der Kapselsäcke erfolgte angelehnt an die Erstbeschreibung von Liu et al.⁸⁶. Für Transplantationszwecke wurde initial die Kornea inklusive eines schmalen Sklerarings entfernt. Zu Beginn wurde die Iris an ihrem Ansatz abpräpariert und entfernt. Darauf folgte eine kontinuierliche, kreisrunde Kapsulorhexis mit anschließender Hydroexpression der Linse. Im Anschluss wurde die hintere Kapsel von sämtlichen residualen Linsenresten befreit und mit PBS gespült. Als nächstes wird die modifizierte Intraokularlinse bzw. die Kontrolllinse in den Kapselsack eingesetzt. Im Anschluss wird der Kapselsack durch Durchtrennen der Zonulafasern vorsichtig ausgelöst und mithilfe von entomologischen Nadeln (Bioform, Nürnberg, Deutschland) unter mäßiger Spannung auf der Zellkulturplastik fixiert (Abbildung III-3). Es war wichtig, dass die Kante der Kapsulorhexis die Kante der Linse nicht überragt, um den Effekt der scharfen Kante zu gewährleisten. Nach Hinzugabe von MEM Earle's mit 10 % FCS wurden die Kapselsäcke bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

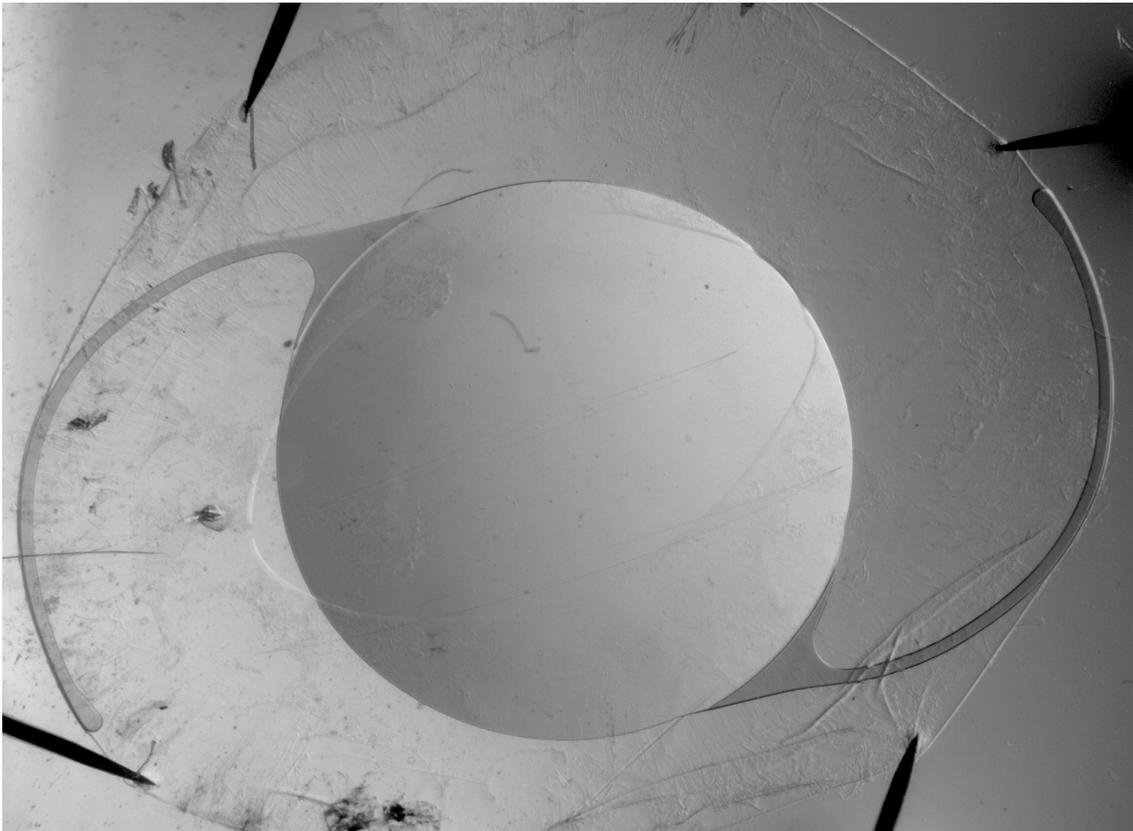


Abbildung III-3 Aufgespannter Kapselsack einer mit Methotrexat beladenen Intraokularlinse: Gezeigt ist eine in einen humanen Kapselsack eingesetzte modifizierte Intraokularlinse am ersten Tag.

Ein Experiment bestand aus beiden Kapselsäcken eines Spenders: Einer diente als Kontrolle, der andere wurde mit einer pharmakologisch modifizierten Intraokularlinse versehen. Das Zellwachstum wurde täglich unter einem Stereomikroskop Stemi 508 (Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) evaluiert und jeden zweiten Tag fotografisch dokumentiert. Die Zeit bis zum Erreichen eines durchgängigen Zellrasens der hinteren Kapsel wurde dokumentiert.

Der Versuch wurde für jeden pharmakologischen Stoff und Linsentyp (hydrophil und hydrophob) jeweils dreimal durchgeführt.

10. Zell-Scratch-Assay

Der Zell-Scratch-Assay dient der Visualisierung und Analyse der Zellproliferation und –migration⁸⁷. Zellen neigen dazu einen durchgängigen Zellrasen zu bilden⁸⁷. Wird dieser durch einen artifiziellen Spalt unterbrochen, beginnen Zellen in Richtung des Spaltes zu migrieren, um letztlich wieder Zell-Zell-Kontakte zu bilden⁸⁷. Diese Zellwanderung lässt sich fotografisch durch Messen der ursprünglichen Spaltbreite und Vergleichen mit der Spaltbreite nach mehreren Stunden quantifizieren⁸⁷.

Er wurde modifiziert nach Liang et al.⁸⁷ durchgeführt. Die aus der Subkultivierung hervorgehenden Zellen wurden bis zur Konfluenz inkubiert. Um bei der Auswertung immer den gleichen Ausschnitt aufzufinden, wurden Markierungen als Referenzpunkte vorgenommen.

Bei Konfluenz wurde mit einer 10 µl – Pipettenspitze (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) unter sanftem Druck ein Riss in den kontinuierlichen Zellrasen geschaffen (Abbildung III-4). Im Anschluss wurde zweimal mit ca. 2 ml PBS gespült, um residualen Zellschutt zu beseitigen.

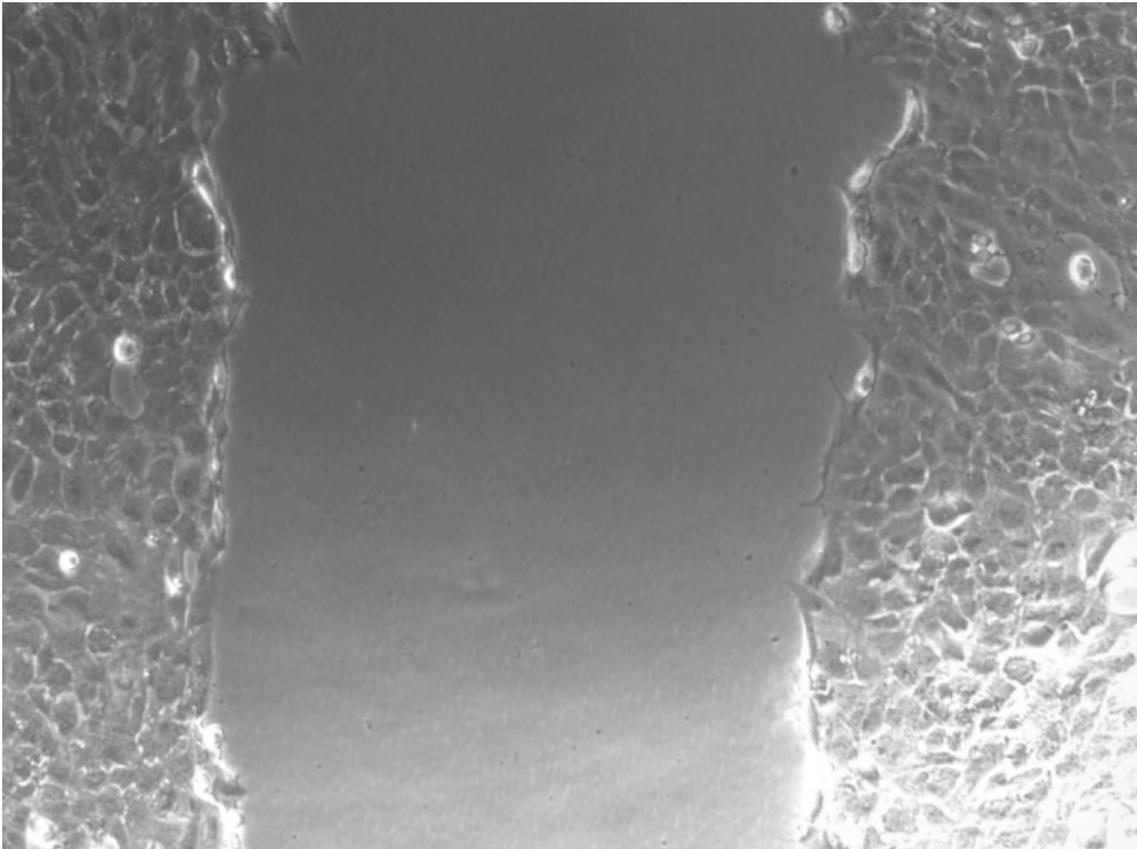


Abbildung III-4 Wunde (Spaltbreite) eines Zell-Scratch-Assay: Ausgangslage: Dargestellt ist ein Ausschnitt unmittelbar nach Kratzen mit der Pipettenspitze.

Unbehandelte Gruppen wurden mit 1 ml Zellkulturmedium versehen. Behandelte Gruppen enthielten Methotrexat in den Konzentrationen 100 µM und 10 µM sowie Zellkulturmedium.

Zum Zeitpunkt 0, also direkt nach Behandlung wurden unter einem Phasenkontrast-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) Fotos des festgelegten Ausschnitts aufgenommen. Nach Inkubation für 8 Stunden wurden erneut Aufnahmen des selbigen Ausschnitts angefertigt.

Die Spaltbreite zwischen Ausgangspunkt (am Zeitpunkt 0) und Endpunkt (nach 8 Stunden) wurde mittels Entfernungsmessung in ImageJ bestimmt. Die Spaltbreite in Pixel wurde in Microsoft Excel zur weiteren statistischen Auswertung überführt. Insgesamt wurde dieser Versuch für beide Konzentrationen jeweils dreimal durchgeführt.

11. Statistische Analyse

Die gesamte statistische Analyse wurde mit SPSS 23.0 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt. Der statistische Vergleich zwischen zwei einzelnen experimentellen Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Beim Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde ein ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test durchgeführt. Bei allen Analysen wurde ein p-Wert kleiner als 0.05 als statistisch signifikant mit einem Konfidenzintervall von 95 % angenommen. Alle Graphen zeigen die zugehörige Standardabweichung durch einen Fehlerindikator. Sie wurden mithilfe von Microsoft Excel 2011 erstellt.

IV. ERGEBNISSE

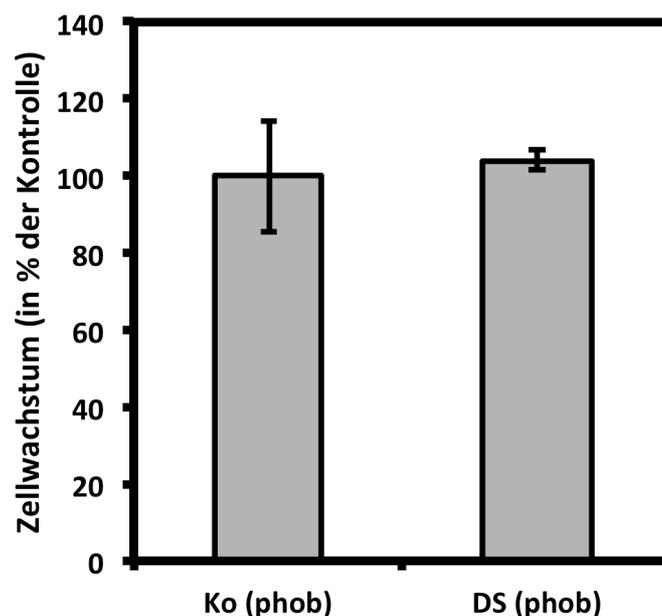
1. Zellwachstum hinter Intraokularlinsen im Vorderaugenabschnittsmodell

Alle Grafiken zeigen das Zellwachstum hinter der Intraokularlinse (IOL) der behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Zellwachstum der Kontrolle wurde auf 100% festgelegt. In Abhängigkeit dieser wurde das prozentuale Wachstum von Linsenepithelzellen der behandelten Gruppe angegeben.

1.1. Disulfiram

Der Wirkstoff Disulfiram konnte weder auf Intraokularlinsen mit hydrophilen ($p = 1.00$) Oberflächeneigenschaften noch auf solchen mit hydrophoben ($p = 0.44$) eine statistisch signifikante Hemmung des Zellwachstums hinter der Intraokularlinse gegenüber der Kontrollgruppe erzielen (Abbildung IV-1).

Aufgrund der fehlenden Hemmung von Disulfiram auf die Zellproliferation von Linsenepithelzellen im durchgeführten Vorderaugenabschnittsmodell wurde von weiterführenden Untersuchungen im humanen Kapselsackmodell mit diesem Wirkstoff abgesehen.



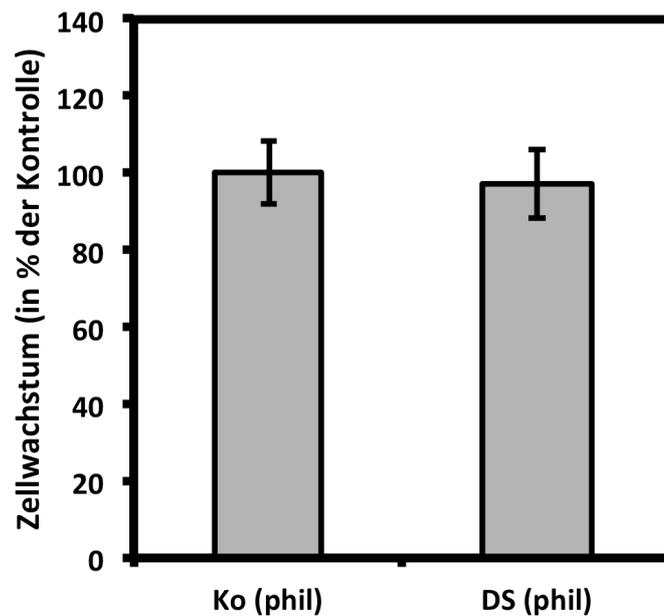
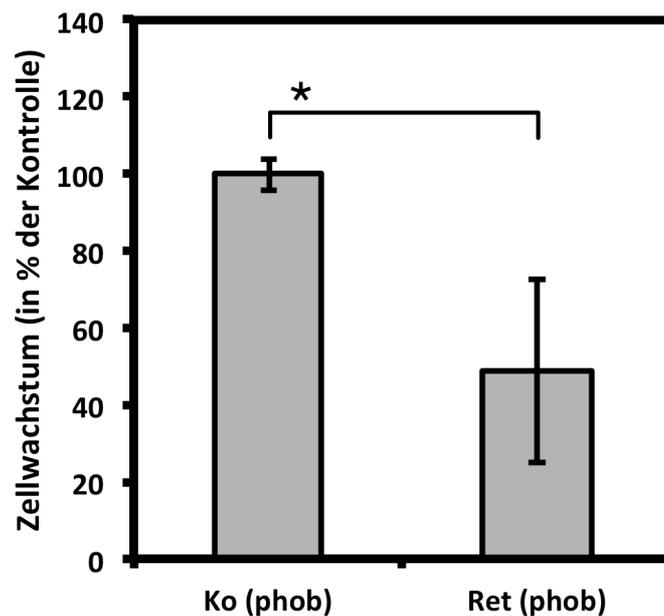


Abbildung IV-1 Vorderaugenabschnittsmodell Disulfiram: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 85.54–114.47 %), behandelte Gruppe 104 % der Kontrolle (95 % Konfidenzintervall (KI): 101.44–106.56 %); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 91.74–108.26), behandelte Gruppe 97 % der Kontrolle (95 % KI: 88.00–106.00 %); Co: Kontrolle, DS: Disulfiram, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

1.2. Retinsäure

Die Retinsäure zeigte für Intraokularlinsen mit hydrophilen ($p = 0.02$) und hydrophoben ($p = 0.02$) Oberflächeneigenschaften eine signifikante Hemmung des Wachstums von Linsenepithelzellen im Vorderaugenabschnittsmodell (Abbildung IV-2).



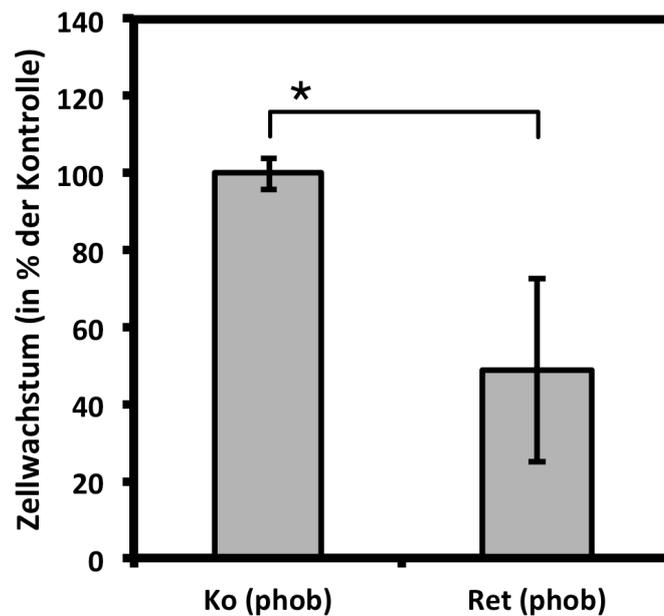
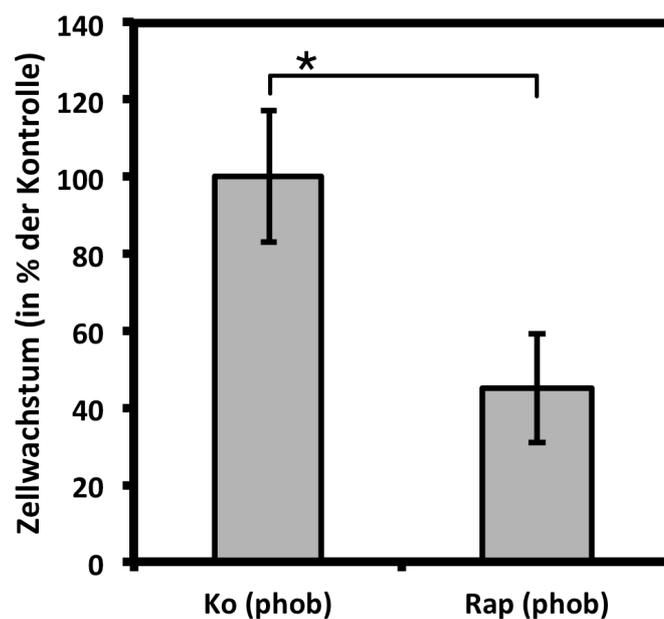


Abbildung IV-2 Vorderaugenabschnittsmodell Retinsäure: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 95.79–104.21 %), behandelte Gruppe 49 % der Kontrolle (95 % KI: 25.05–72.95 %); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 88.16–111.84), behandelte Gruppe 11 % der Kontrolle (95 % KI: -4.21–26.21 %); Co: Kontrolle, Ret: Retinsäure, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

1.3. Rapamycin (Sirolimus)

Im Vorderaugenabschnittsmodell konnte Rapamycin sowohl auf hydrophilen ($p = 0.02$) Intraokularlinsen als auch auf hydrophoben ($p = 0.02$) Intraokularlinsen einen signifikanten Unterschied des Zellwachstums hinter der Intraokularlinse zwischen der behandelten Gruppe und der Kontrolle erzielen (Abbildung IV-3).



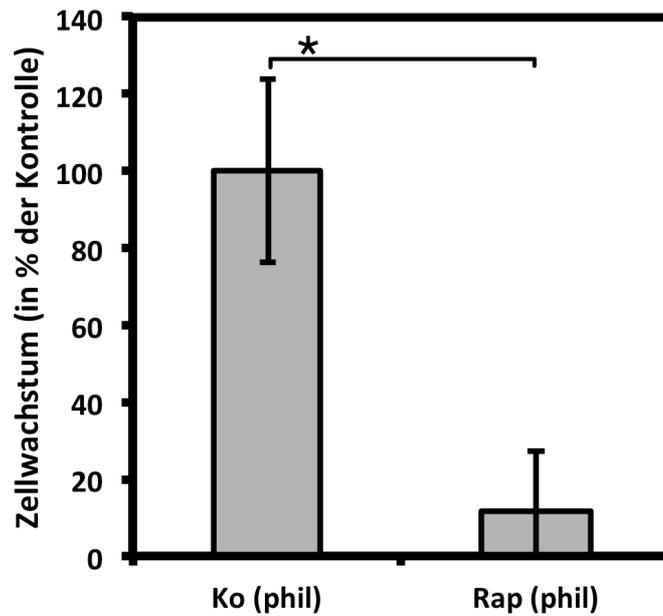
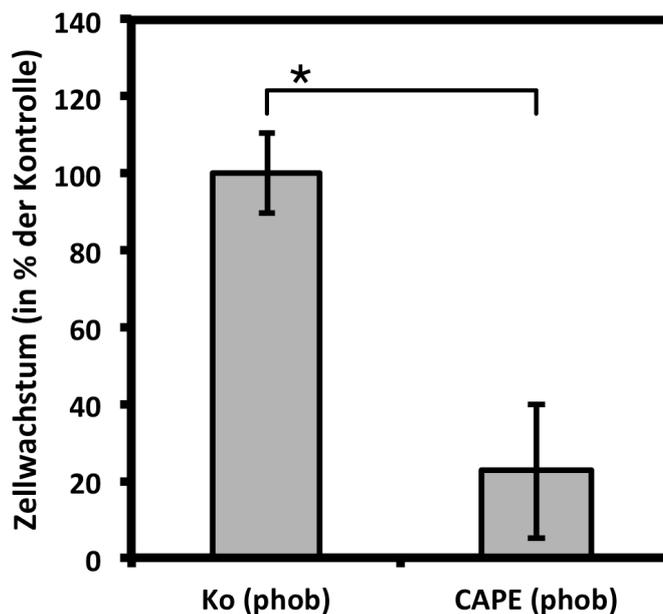


Abbildung IV-3 Vorderaugenabschnittsmodell Rapamycin (Sirolimus): Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 83.20–116.20 %), behandelte Gruppe 45 % der Kontrolle (95 % KI: 30.59–59.41 %); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 76.00–124.00), behandelte Gruppe 11 % der Kontrolle (95 % KI: -4.55–26.55 %); Co: Kontrolle, Rap: Rapamycin, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

1.4. Kaffeesäure-Phenethylester

Bei Kaffeesäure-Phenethylester ergaben sowohl hydrophile ($p = 0.02$) als auch hydrophobe ($p = 0.02$) beladene Intraokularlinsen eine signifikante Wachstumshemmung der Linsenepithelzellen auf den Zellkulturinserts hinter der Intraokularlinse (Abbildung IV-4).



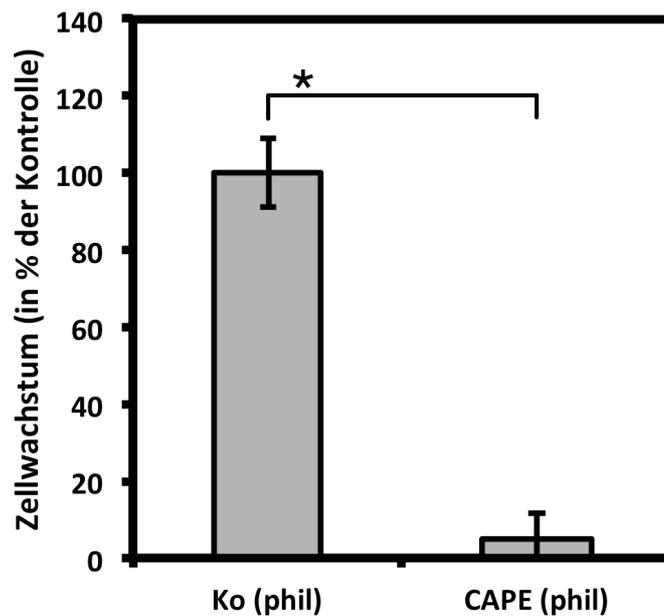


Abbildung IV-4 Vorderaugenabschnittsmodell Kaffeesäure-Phenethylester: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 89.51.60–110.49 %), behandelte Gruppe 22 % der Kontrolle (95 % KI: 4.62–39.38 %); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 90.88–109.12), behandelte Gruppe 5 % der Kontrolle (95 % KI: -1.71–11.71 %); Co: Kontrolle, CAPE: Kaffeesäure-Phenethylester, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

1.5. Methotrexat

Mit Methotrexat beladene hydrophile ($p = 0.02$) und hydrophobe ($p = 0.02$) Intraokularlinsen zeigten eine signifikante Reduktion des Zellwachstums von Linsenepithelzellen unter der Intraokularlinse gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung IV-5).

Aufgrund der signifikanten Hemmung von Methotrexat auf das Zellwachstum hinter Intraokularlinsen im Vorderaugenabschnittsmodell wurde dieser Wirkstoff in weiterer Folge in Kombination mit PLGA auf Intraokularlinsen geschichtet. Im Anschluss erfolgte dann eine weitere Evaluation im Vorderaugenabschnittsmodell sowie dem humanen Kapselsackmodell.

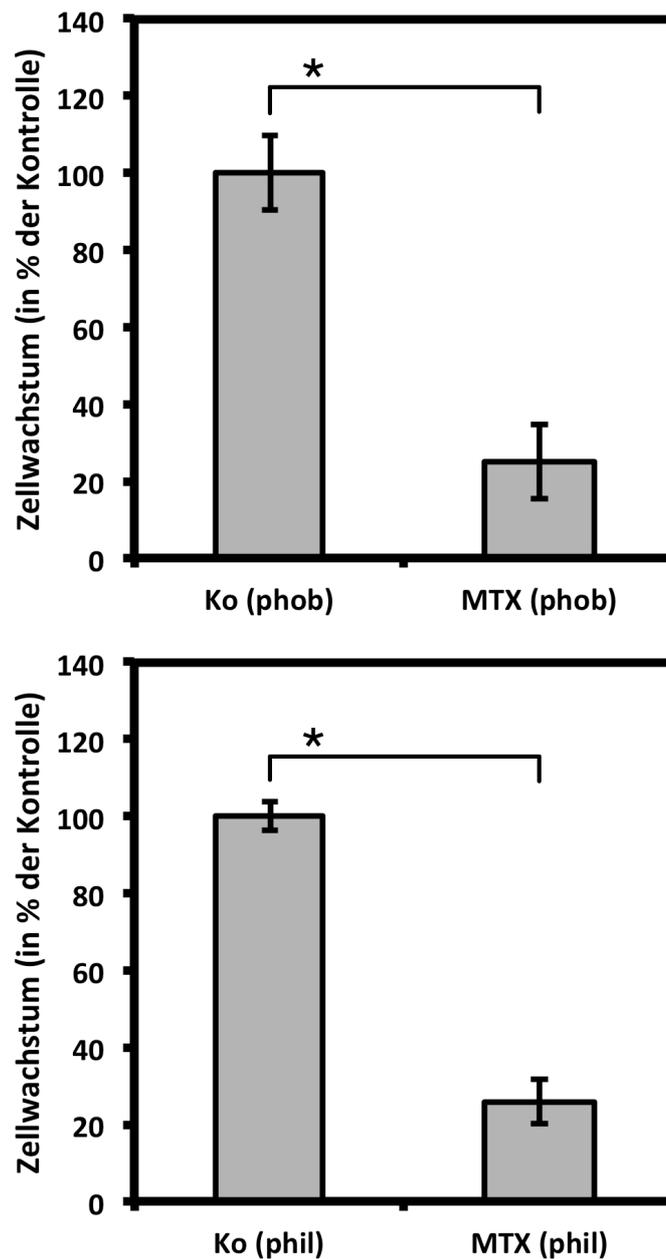


Abbildung IV-5 Vorderaugenabschnittsmodell Methotrexat: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 90.33–109.67 %), behandelte Gruppe 25 % der Kontrolle (95 % KI: 15.47–34.53 %); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 96.34–103.66), behandelte Gruppe 26 % der Kontrolle (95 % KI: 20.12–31.88 %); Co: Kontrolle, MTX: Methotrexat, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

1.6. Methotrexat mit PLGA

Intraokularlinsen, die zuvor mit Methotrexat und PLGA beschichtet wurden, erzielten einen statistisch signifikanten Unterschied des Zellwachstums von Linseneithelzellen im Vergleich zu allen Kontrollgruppen (hydrophob $p < 0.001$, hydrophil $p < 0.001$) (Abbildung IV-6).

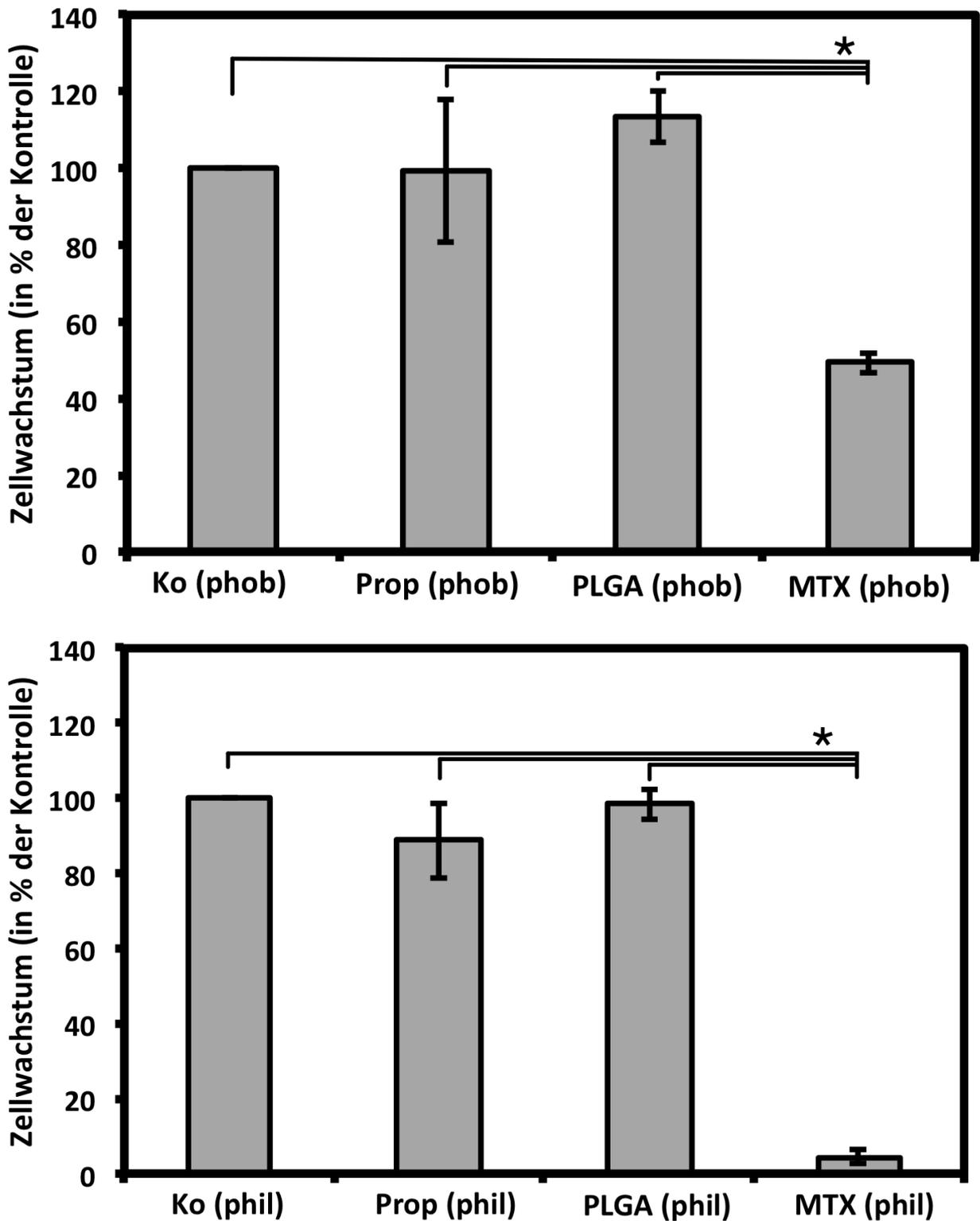


Abbildung IV-6 Vorderaugenabschnittsmodell Methotrexat-PLGA: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 100 %, Propanol-Gruppe 89 % (95 % KI: 79.08–98.92), Propanol-PLGA-Gruppe 99 % (95 % KI: 94.89–103.11), behandelte Gruppe 4 % der Kontrolle (95 % KI: 2.17–5.83 %); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 100 %, Propanol-Gruppe 99 % (95 % KI: 80.34–117.66), Propanol-PLGA-Gruppe 113 % (95 % KI: 106.15–119.85), behandelte Gruppe 49 % der Kontrolle (95 % KI: 46.42–51.58 %); Co: Kontrolle, Prop: 2-Propanol, PLGA: 2-Propanol + PLGA, MTX: Methotrexat, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

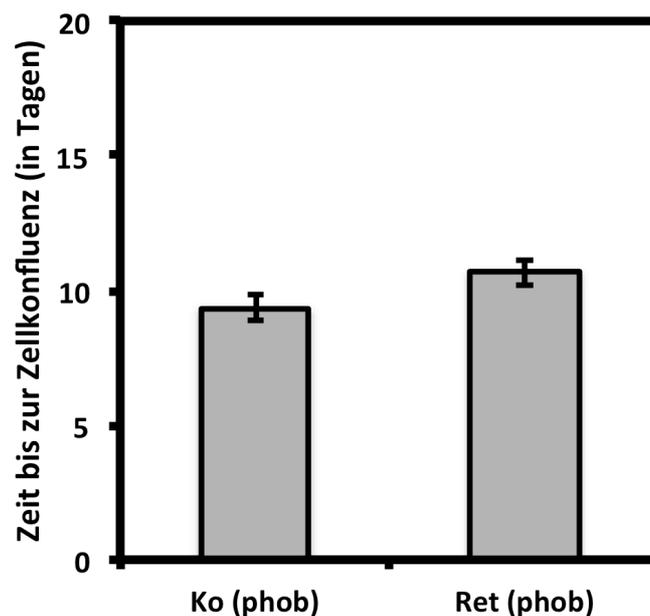
2. Humanes Kapselsackmodell

Das humane Kapselsackmodell ermöglichte es, die genaue Formation des Nachstars inklusive ihrer Zellmigration und -proliferation zu beobachten⁸⁸. Die residualen Linsenepithelzellen breiteten sich an den Kanten der Intraokularlinse aus und wanderten langsam auf der Linsenhinterseite in Richtung des Zentrums⁸⁸.

Gemessen wurde die Zeit in Tagen, bis zu der die Linsenepithelzellen einen durchgehenden Zellrasen auf der hinteren Kapsel gebildet hatten. Alle Intraokularlinsen wiesen bis zur vollständigen Zellkonfluenz keine Trübung auf.

2.1. Retinsäure

Die Retinsäure-modifizierte IOL führten zu keiner signifikanten Zunahme der Anzahl der Tage, bis ein vollständiger Zellrasen hinter der Intraokularlinse gebildet wurde (hydrophob $p = 0.068$, hydrophil $p = 0.105$) (Abbildung IV-7).



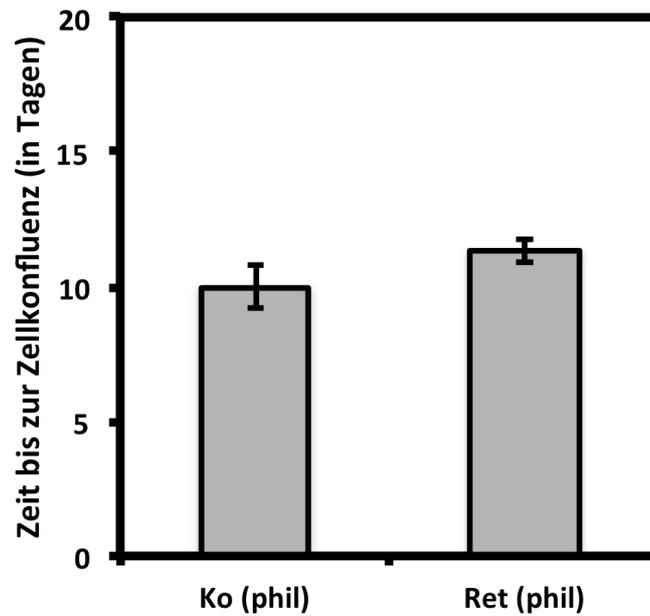
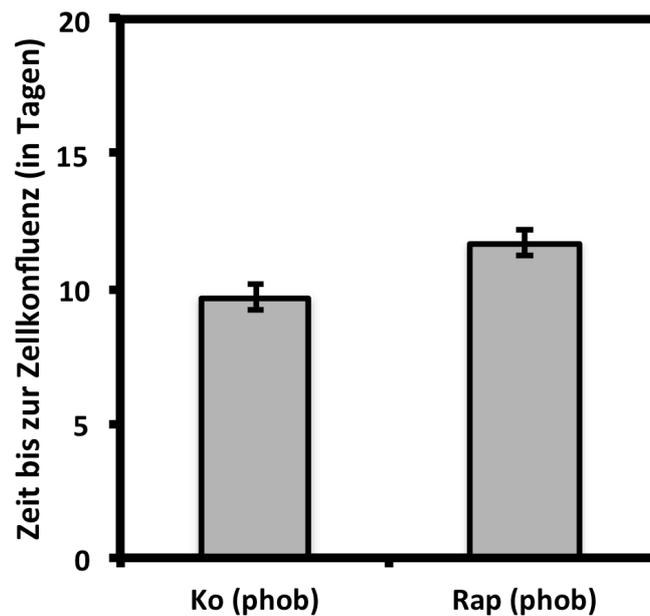


Abbildung IV-7 Humanes Kapselsackmodell Retinsäure: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 9.3 d (95 % KI: 8.86–9.80 d), behandelte Gruppe 10.7 d (95 % KI: 10.20–11.14 d); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 10.0 d (95 % KI: 9.18–10.82), behandelte Gruppe 11.3 d (95 % KI: 10.83–11.77 d); Co: Kontrolle, Ret: Retinsäure, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

2.2. Rapamycin (Sirolimus)

Intraokularlinsen, die mit Rapamycin beladen wurden, konnten ebenso keine signifikante Hemmung des Zellwachstums und der Zellmigration im humanen Kapselsackmodell erreichen (hydrophob $p = 0.063$, hydrophil $p = 0.261$) (Abbildung IV-8).



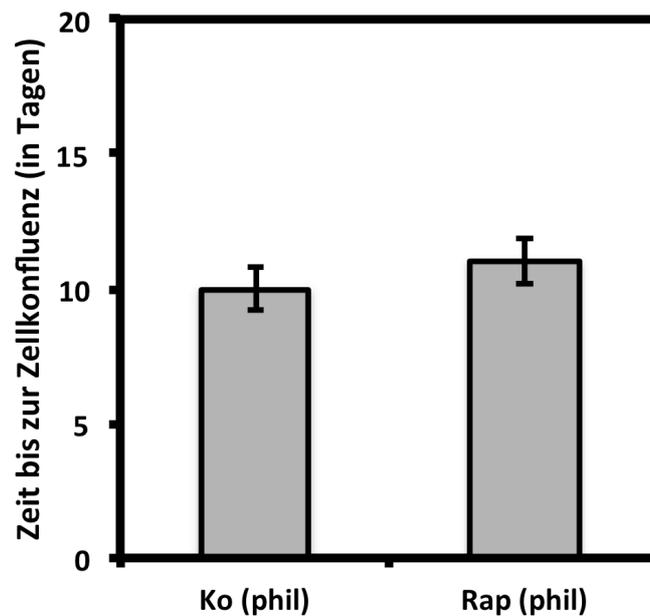
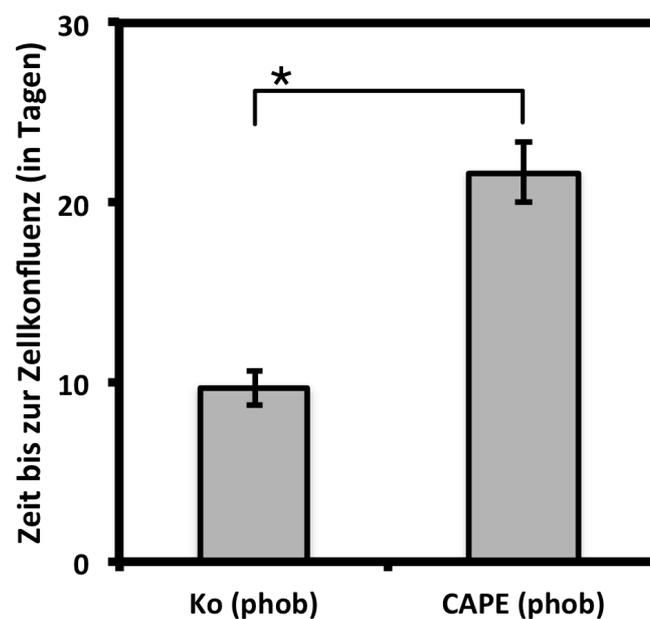


Abbildung IV-8 Humanes Kapselsackmodell Rapamycin: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 9.7 d (95 % KI: 9.23–10.17 d), behandelte Gruppe 11.7 d (95 % KI: 11.23–12.17 d); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 10.0 d (95 % KI: 9.18–10.82), behandelte Gruppe 11.0 d (95 % KI: 10.18–11.82 d); Co: Kontrolle, Rap: Rapamycin, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

2.3. Kaffeesäure-Phenethylester

Mit Kaffeesäure-Phenethylester gelang eine statistisch signifikante Verlängerung der Zeit bis zur Entstehung eines vollständigen Zellrasens an der Hinterseite der Intraokularlinse sowohl für hydrophile ($p = 0.046$) als auch für hydrophobe ($p = 0.046$) IOL (Abbildung IV-9).



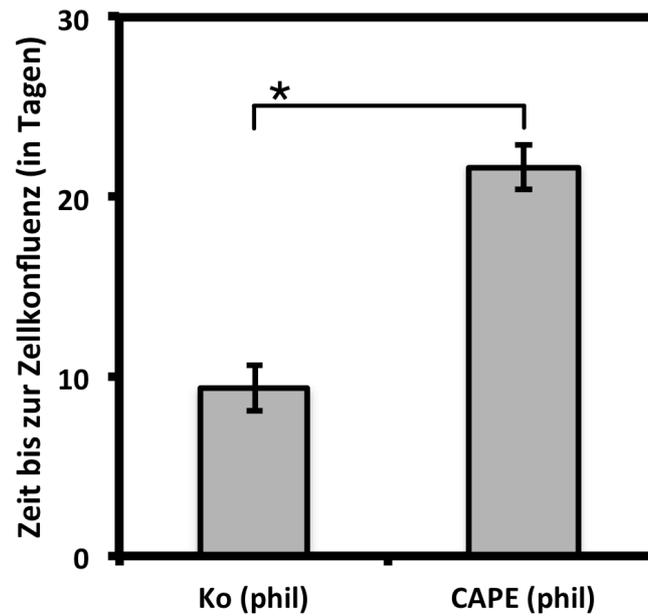
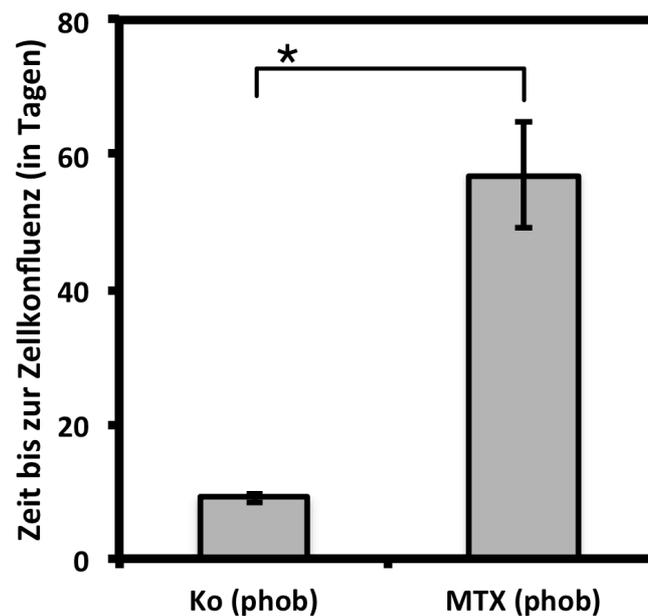


Abbildung IV-9 Humanes Kapselsackmodell Kaffeesäure: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 9.7 d (95 % KI: 8.76–10.64 d), behandelte Gruppe 21.7 d (95 % KI: 20.00–23.40 d); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 9.3 d (95 % KI: 8.05–10.55 d), behandelte Gruppe 21.7 d (95 % KI: 20.45–22.95 d); Co: Kontrolle, CAPE: Kaffeesäure-Phenethylester, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

2.4. Methotrexat und Methotrexat-PLGA

Sowohl mit reinem Methotrexat beladene (hydrophob $p = 0.046$, hydrophil $p = 0.046$) (Abbildung IV-10) als auch mit Methotrexat und PLGA beschichtete Intraokularlinsen (hydrophob $p = 0.046$, hydrophil $p = 0.046$) (Abbildung IV-11) konnten die mittlere Zeit bis zur Zellkonfluenz der hinteren Kapsel signifikant anheben (Abbildung IV-12).



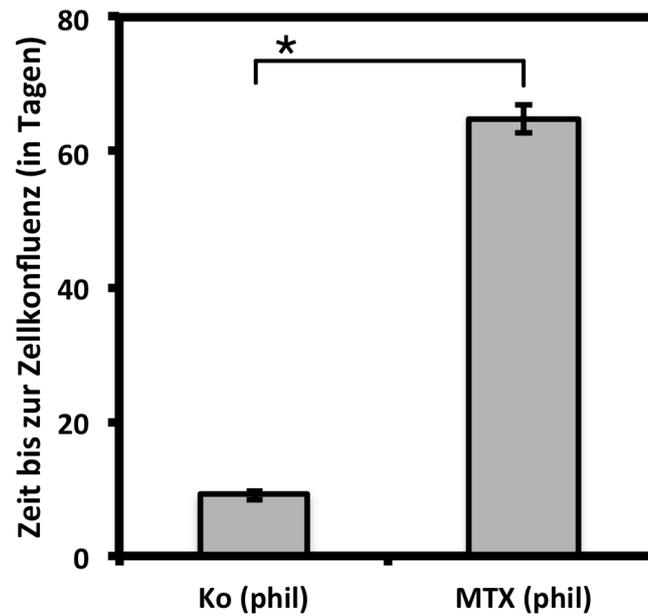
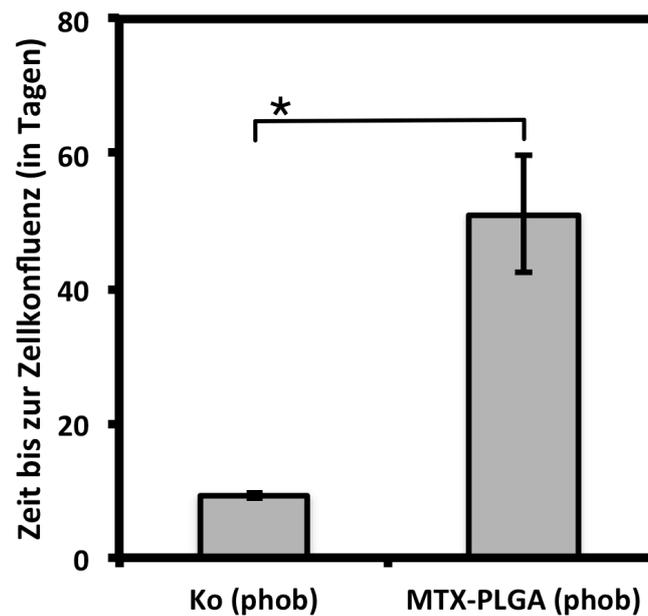


Abbildung IV-10 Humanes Kapselsackmodell Methotrexat: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 9.0 d (95 % KI: 8.18–9.82 d), behandelte Gruppe 57.0 d (95 % KI: 49.13–64.87 d); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 9.0 d (95 % KI: 8.18–9.82 d), behandelte Gruppe 65.0 d (95 % KI: 62.84–67.16 d); Co: Kontrolle, MTX: Methotrexat, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob



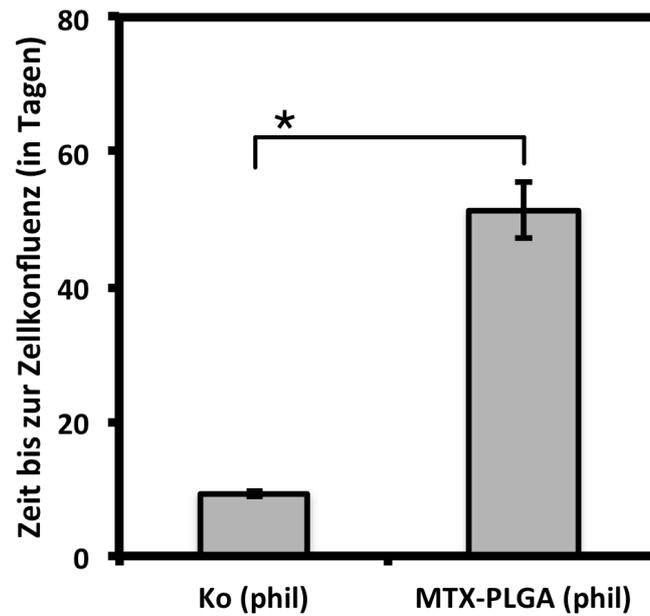


Abbildung IV-11 Humanes Kapselsackmodell Methotrexat-PLGA: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 9.3 d (95 % KI: 8.83–9.77 d), behandelte Gruppe 51.0 d (95 % KI: 42.40–59.60 d); hydrophile IOL: Kontrollgruppe 9.3 d (95 % KI: 8.83–9.77 d), behandelte Gruppe 51.3 d (95 % KI: 47.19–55.41 d); Co: Kontrolle, MTX-PLGA: Methotrexat und PLGA, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

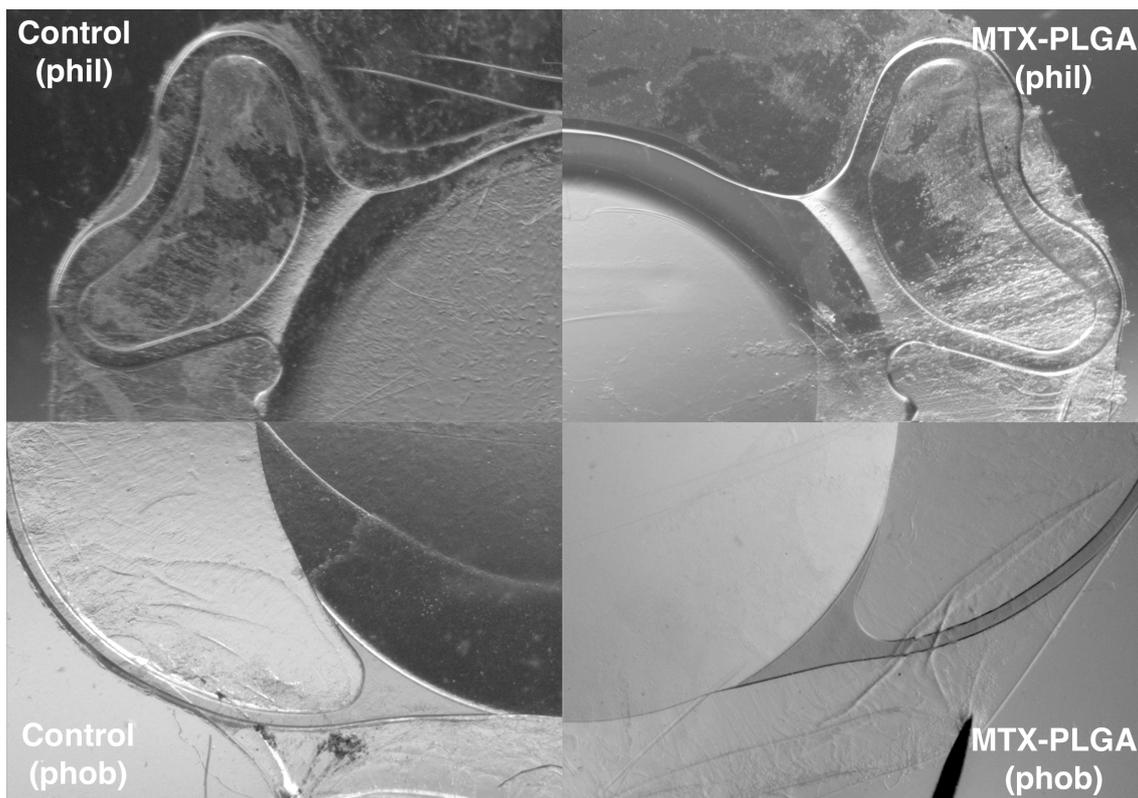


Abbildung IV-12 Humanes Kapselsackmodell Methotrexat und Methotrexat-PLGA: Die Abbildung zeigt konfluente Kapselsäcke bei eingesetzter Kontroll-Intraokularlinse und zum gleichen Zeitpunkt fotografierten Kapselsäcken mit behandelter Intraokularlinse (MTX oder MTX-PLGA), MTX: Methotrexat, PLGA: Polylactid-Glycolsäure, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

Aufgrund der hoch signifikanten Ergebnisse sowohl im Vorderaugenabschnittsmodell als

auch im humanen Kapselsackmodell wurde Methotrexat und die Kombination mit PLGA einer weiterführenden Konzentrationsbestimmungs- und Toxizitätsstudie unterzogen. Ebenso wurde zur weiteren Evaluation der Fähigkeit der Wundheilung von Linsenepithelzellen ein Zell-Scratch-Assay durchgeführt.

3. Zell-Scratch-Assay

Im Zell-Scratch-Assay zeigte sich eine signifikante Hemmung der Wundheilung durch beide Konzentrationen von Methotrexat im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 6 Stunden ($p < 0.021$ für 100 μM Methotrexat sowie $p < 0.021$ für 10 μM Methotrexat) (Abbildung IV-13).

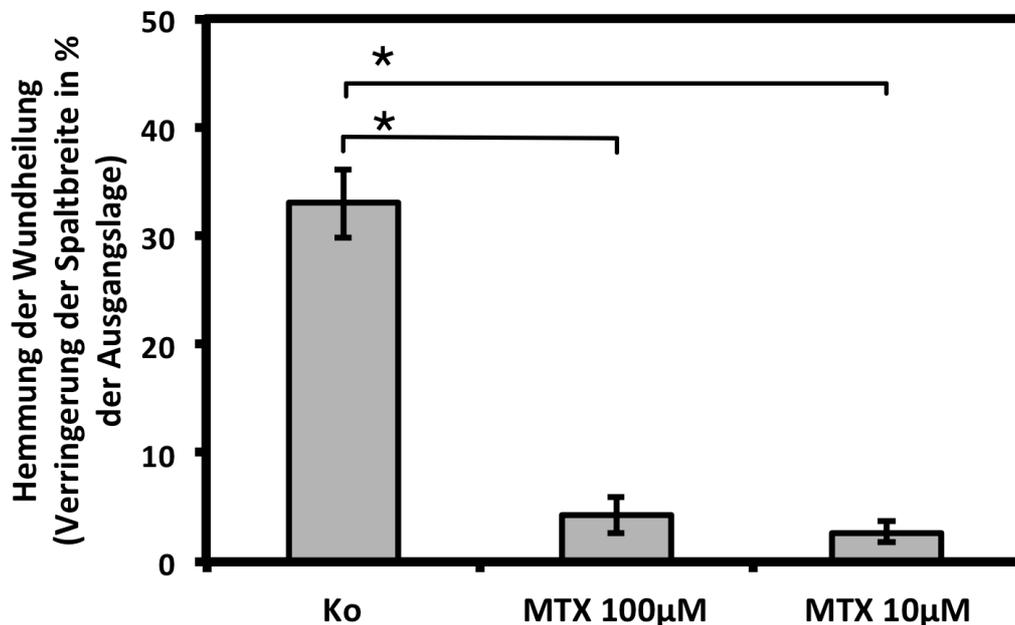


Abbildung IV-13 Zell-Scratch-Assay mit Methotrexat: Kontrollgruppe 33 % (95 % KI: 29.89-36.11 %), Methotrexat 100 μM 4 % (95 % KI: 2.33-5.67 %), Methotrexat 10 μM 3 % (95 % KI: 1.94-4.06 %), Co: Kontrolle, MTX μM : Methotrexat inkl. Konzentration

4. Toxizitätsuntersuchung mittels XTT-Assay

Aufgrund möglicher toxischer Effekte auf Zellen der vorderen Augenkammer wurde anhand von kornealen Endothelzellen deren Lebensfähigkeit unter Einwirkung der verwendeten Pharmaka untersucht.

4.1. Beladene Intraokularlinsen

Hydrophile und hydrophobe mit Retinsäure und hydrophile mit Rapamycin beladene Intraokularlinsen führten zu einer signifikanten Reduktion der Lebensfähigkeit von

kornealen Endothelzellen verglichen mit der Kontrolle (Retinsäure: hydrophil $p < 0.001$, hydrophob $p < 0.009$; Rapamycin: hydrophil $p < 0.01$). Alle restlichen Stoffe konnten keine signifikanten Effekte erzielen (Abbildung IV-14).

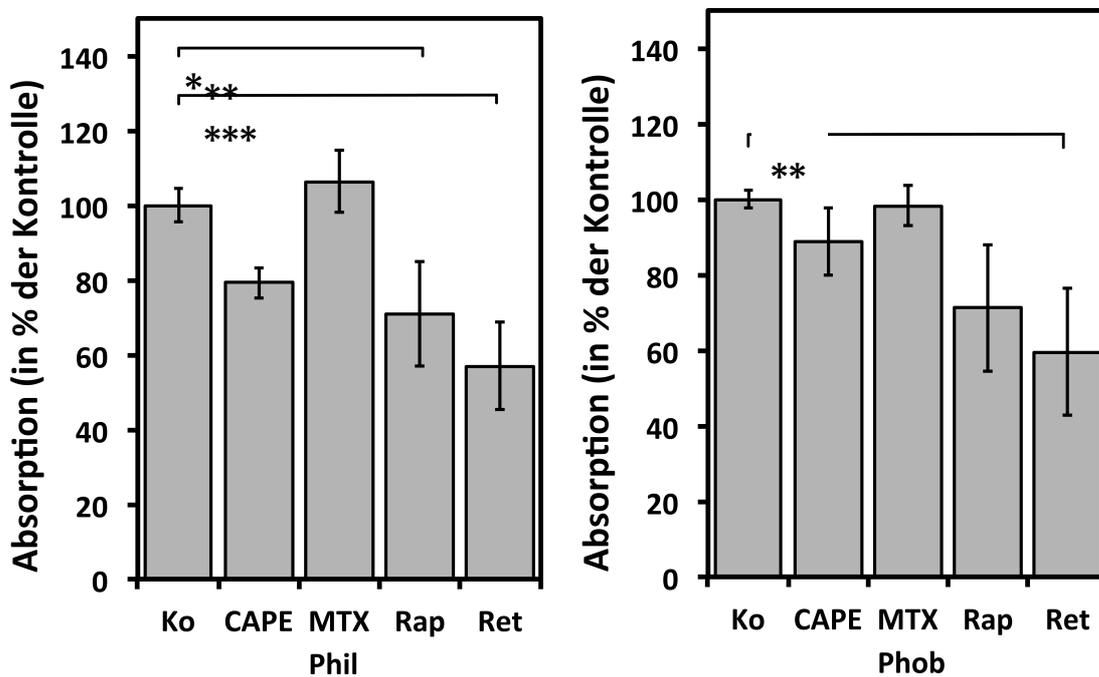


Abbildung IV-14 Toxizitätsmessung pharmakologisch beladener Intraokularlinsen: Hydrophile IOL: Kontrollgruppe: 100 % (95 % KI: 95.44 – 104.56 %), CA: 79 % (95 % KI: 74.92 – 83.08 %), MT: 106 % (95 % KI: 97.73 – 114.27 %), RA: 71 % (95 % KI: 57.10 – 84.90 %), RE: 57 % (95 % KI: 45.31 – 68.69 %), hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 97.61 – 102.39 %), CA: 89 % (95 % KI: 80.07 – 97.93 %), MTX: 98 % (95 % KI: 92.75 – 103.25 %), RA: 71 % (95 % KI: 54.16 – 87.84 %), RE: 60 % (95 % KI: 43.25 – 76.75 %), Co: Kontrolle, CA: Kaffeesäure-Phenethylester, MT: Methotrexat, RA: Rapamycin, RE: Retinsäure, phil: hydrophil, phob: hydrophob

4.2. Methotrexat-PLGA-beschichtete Intraokularlinsen

Sowohl hydrophile als auch hydrophobe mit Methotrexat und PLGA beladene Intraokularlinsen zeigten keinen signifikanten Unterschied der Lebensfähigkeit von kornealen Endothelzellen im Versuchsaufbau (hydrophob: $p = 0.439$ und hydrophil: $p = 0.606$) (Abbildung IV-15).

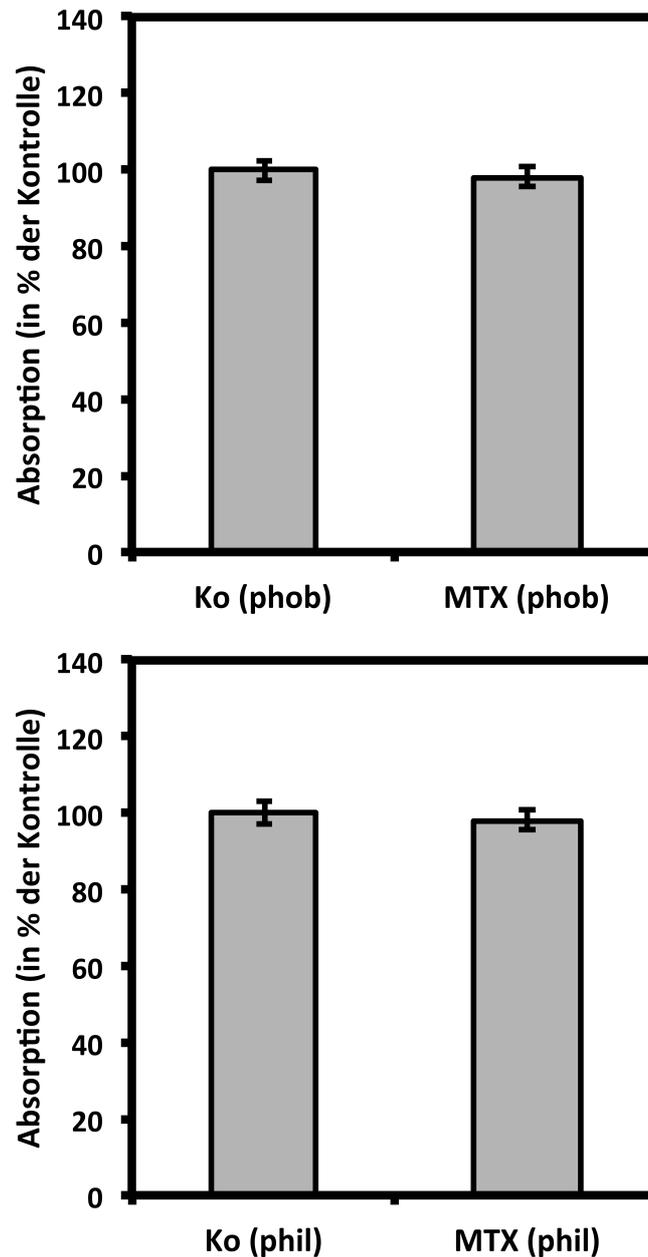


Abbildung IV-15 Toxizitätsmessung an kornealen Endothelzellen unter Methotrexat-PLGA: Hydrophobe IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 97.28-102.72 %), behandelte Gruppe 98 % (95 % KI: 95.24-100.76 %), hydrophile IOL: Kontrollgruppe 100 % (95 % KI: 97.14-102.86 %), behandelte Gruppe 98 % (95 % KI: 95.37-100.63), Co: Kontrolle, MTX: Methotrexat, (phil): hydrophil, (phob): hydrophob

5. Methotrexat-Konzentrationsbestimmung

Es zeigte sich für alle Linsen- und Modifikationstypen eine initiale Konzentrationsspitze, gefolgt von einem raschen Abfall der täglich freigesetzten Methotrexat-Konzentration in der Probelösung. Dargestellt ist die kumulierte Dosis in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen. Mithilfe der Konzentrationsbestimmung konnte dargestellt werden, dass die freigesetzte Dosis zu jeder Zeit über der bereits in unserem Labor im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit (Herrn Pongsthorn Piravej) errechneten EC50 lagen.

5.1. Methotrexat-beladene Intraokularlinsen

Nach anfänglicher Freisetzung hoher Dosen Methotrexat zeigten mit reinem Methotrexat beladene Intraokularlinsen eine gleichmäßige Abgabe des Pharmakons über 14 Tage (Abbildung IV-16).

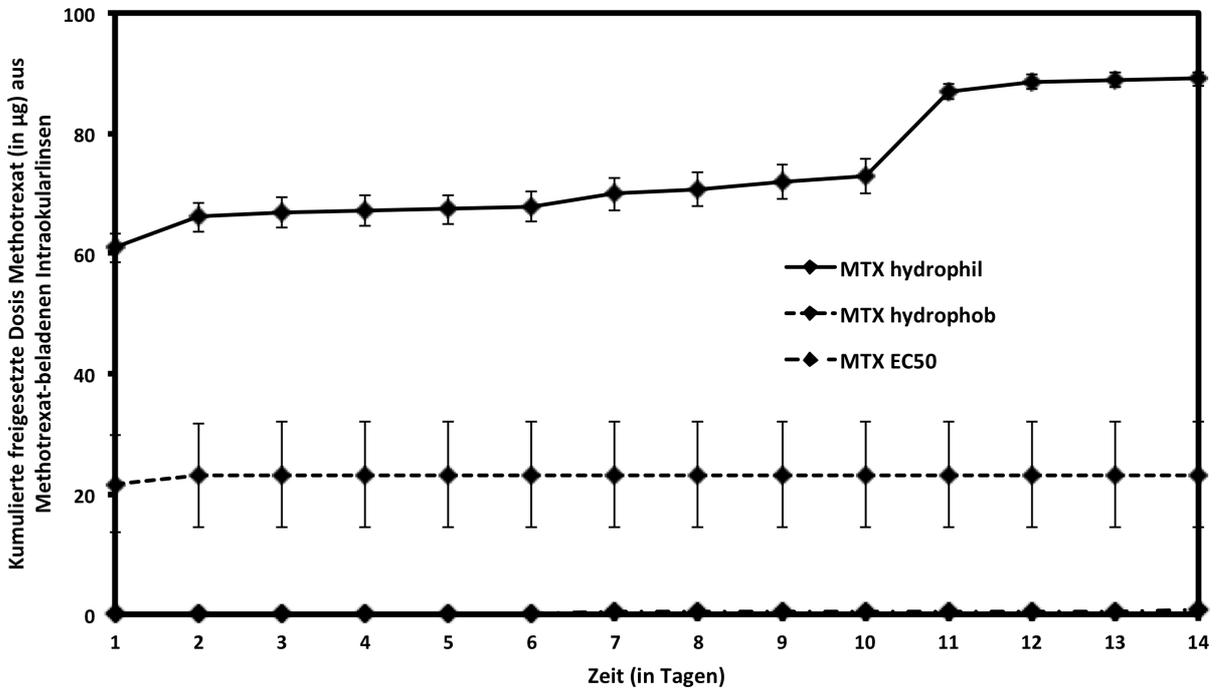


Abbildung IV-16 Methotrexat-Konzentrationsbestimmung für mit Methotrexat beladene Intraokularlinsen

5.2. Methotrexat-und-PLGA-modifizierte IOL

Intraokularlinsen, die zuvor mit Methotrexat und dem Linkermolekül PLGA beschichtet wurden, konnten, verglichen mit den rein mit Methotrexat beladenen IOL, im vorliegenden Versuchsaufbau nach einer geringeren Dosisfreisetzung am ersten Tag eine konstantere Dosisabgabe erzielen (Abbildung IV-17).

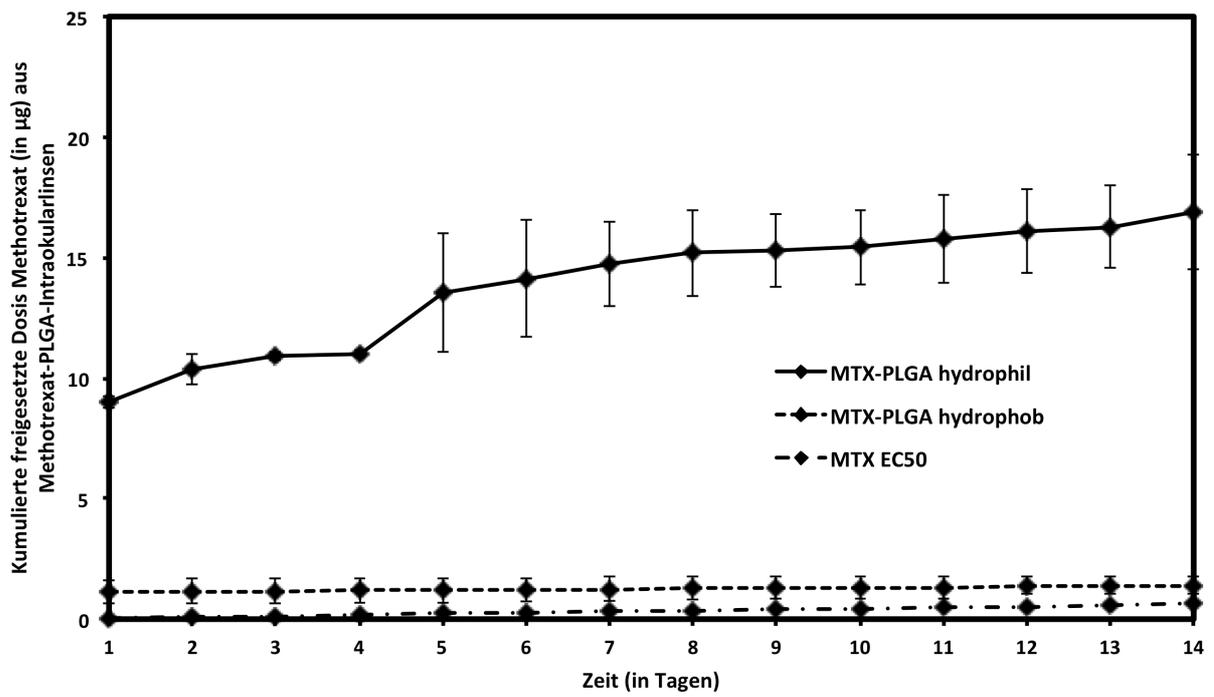


Abbildung IV-17 Methotrexat-Konzentrationsbestimmung für mit Methotrexat und PLGA beschichtete Intraokularlinsen

V. DISKUSSION

1. Zusammenfassung der erhobenen Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten innovative medikamentenfreisetzende Intraokularlinsen als Medizinprodukt entwickelt werden. Diese Intraokularlinsen sollten dann auf ihre Wirksamkeit in der Zellkultur untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle medikamentenfreisetzenden Intraokularlinsen außer jene, die mit Disulfiram modifiziert wurden, eine Wachstumshemmung der immortalisierten Linsenepithelzelllinie FHL-124 hervorrufen konnten. An der primären humanen Kapselsack Langzeitorgankultur aus menschlichen Spenderaugen gelang uns ebenfalls die Testung der neuen Intraokularlinsen zur Prophylaxe des Nachstars⁸⁹. Schlussendlich zeigten in diesem Modell Methotrexat und Kaffeesäure-Phenetylester eine Verzögerung der Zeit in Tagen bis zum Auftreten des Nachstars. Aufgrund der eindrücklicheren Ergebnisse wurde Methotrexat weiter untersucht und mit dem Linkermolekül PLGA kombiniert. Diese Linsen waren ebenfalls wirksam und zeigten eine konstante Stoffabgabe in einer Konzentration oberhalb des Wirkungsbereichs über 14 Tage. Mit Methotrexat beschichtete Intraokularlinsen wiesen im Vergleich zu Retinsäure und Rapamycin keine Toxizität gegenüber einer kornealen Endothelzelllinie auf.

2. Medikamentenfreisetzende Intraokularlinsen

Medikamententräger werden in der Medizin klinisch in mehreren Fachgebieten regelmäßig angewandt. Sind es in der Kardiologie die medikamentenbeschichteten („drug-eluting“) Stents⁹⁰ oder in der Gynäkologie der hormonfreisetzende Vaginalring (NuvaRing®)⁹¹, so existieren auch in der Ophthalmologie klinisch angewandte Medikamententräger, wie Ozurdex®⁹². Beschichtet oder belädt man eine Intraokularlinse mit Pharmaka, bietet dies sowohl für den Patienten, als auch den Operateur eine bequeme Art, dem Nachstar vorzubeugen. Durch die Freisetzung direkt in den Kapselsack werden systemische Effekte⁹³, wie bei Anwendung von Augentropfen mit hoher Medikamentendosis, minimiert. Gleichzeitig ist keine Patient compliance notwendig. Aus chirurgischer Sicht ergibt sich trotz Modifikation der Intraokularlinse keine Veränderung der Operationstechnik. Damit stellt dieses Verfahren wahrscheinlich eine sichere Möglichkeit der intrakameralen Medikamentenapplikation in der Kataraktchirurgie dar⁹⁴.

Aktuell gibt es mehrere Möglichkeiten Intraokularlinsen zu modifizieren. Hierzu zählen als bisher besser erforschte Möglichkeiten das Beladen („Lens soaking“), und das Beschichten („Lens coating“) von Intraokularlinsen, die Haptikmodifikation sowie die „hypercritical fluid“-Impregnation⁶⁹.

2.1. Lens soaking (Dip coating)

Beim lens soaking geht man davon aus, dass es abhängig von den physiochemischen Eigenschaften des Pharmakons und der Beschaffenheit des Linsenacrylats beim zur Bindung des Stoffes auf dieses kommt⁷¹. Das Verfahren ist aus der Materialkunde als dip coating bekannt⁹⁵. Es kann postuliert werden, dass nach Implantation der Intraokularlinse die pharmakologische Substanz frei in und um den Kapselsack diffundieren kann. Ein Vorteil der Methode des „Lens soaking“ ist die Unabhängigkeit von weiteren Verfahren, die Energie in Form von Wärme, Elektrizität oder Druck benötigen. Reaktivität, Polarität und die biologische IC50 spielen bei der Beladung der Intraokularlinse eine Rolle⁹⁶.

2.2. Lens coating mittels Linkermolekülen

Es gibt verschiedene Linkermoleküle und Crosslinking-Verfahren bei denen chemische Stoffe kovalent oder langfristig an die Linsenoberfläche gebunden werden kann⁹⁷. Ein Kandidat ist das PLGA⁶², das aufgrund seiner besonders eindrücklichen Eigenschaften hier ausführlicher diskutiert wird. Beschichten von Linsen mithilfe der Biomatrix Polylactid-co-Glycolid (PLGA) wurde bereits in mehreren Studien untersucht⁹⁴. Seit den 1970er-Jahren wird PLGA als Nahtmaterial in der Chirurgie angewandt⁹⁸. Im Auge wird PLGA durch Eingehen von Esterbindung im Rahmen einer Hydrolyse abgebaut⁹⁹. Die Zeit, die dieser Prozess in Anspruch nimmt, hängt von der Zusammensetzung des Polymers sowie den verwendeten Pharmaka ab¹⁰⁰. Aufgrund seiner Biokompatibilität, der guten biologischen Abbaubarkeit und dem nachhaltigen Freisetzungsmuster wurde PLGA von der FDA für mehrere therapeutische Anwendungen zugelassen¹⁰¹. Durch Veränderung der Zusammensetzung lässt sich letztlich ein geeigneter Medikamententräger mit langsamer Stofffreisetzung bilden¹⁰². In Zusammenschau der erhobenen Ergebnisse kann postuliert werden, dass PLGA gut an die Oberfläche von Intraokularlinsen bindet. In Grundsatzstudien des Nachstars wurde PLGA in Zusammenhang mit Intraokularlinsen in Tierversuchen bereits verwendet. Liu et al.⁶² konnten Intraokularlinsen mit PLGA und Rapamycin beschichten und diese in Hasen einsetzen. Verglichen mit der Kontrollgruppe konnte nach 6 Monaten die Rate der an Nachstar erkrankten Hasen signifikant reduziert werden. Ein Vergleich mit Methotrexat ist auf Basis der erhobenen Daten nicht möglich, zumal, wie bereits erwähnt,

Unterschiede in der Pharmakon-PLGA-Interaktion¹⁰⁰ sowie im Einfluss auf die Formation des Nachstars, eine Rolle spielen.

2.3. Hypercritical-fluid-Imprägnation

Wenn man Druck und Temperatur eines Stoffes, zum Beispiel Kohlendioxid, immer weiter erhöht, geht es zunächst vom festen in den flüssigen Zustand über und liegt dann je nach Temperatur und Druck als Gas oder Flüssigkeit vor. Wenn man den Druck und die Temperatur noch weiter erhöht, erreicht man die superkritische Region. Hyperkritische Flüssigkeiten haben die Eigenschaften von beiden Phasenzuständen. Hyperkritisches Kohlendioxid kann pharmakologische Substanzen ausgezeichnet als organische Lösungsmittel lösen und ist dabei nicht toxisch¹⁰³. Gleichzeitig kann es die Linse wie ein Gas durchströmen. So ist die Anreicherung von hohen Mengen an Pharmakon in der Linse bei sehr guter Biokompatibilität des Lösungsmittels möglich¹⁰⁴. Nachteile sind der hohe technische Aufwand und die niedrige Verfügbarkeit des Verfahrens¹⁰⁵.

2.4. Haptikmodifikation von Intraokularlinsen

Verschiedene Autoren haben versucht, Medikamententräger ausschließlich in die Haptik zu integrieren. Dieses Verfahren ist anspruchsvoll, da die Haptiken klein sind. Es bietet jedoch den Vorteil, dass die Optik der Intraokularlinse mit ihren wichtigen Eigenschaften für das Sehen nicht beeinflusst wird⁷⁰.

Für alle Verfahren gilt, dass, um einen Effekt auf das Nachstarwachstum zu erzielen, das Pharmakon in ausreichender Konzentration auf die Intraokularlinse binden muss, die mitunter durch die Beladungszeit beeinflusst wird¹⁰⁶. Diese Arbeit zeigte immer wieder Unterschiede in den Einflüssen der Substanzen, je nachdem, ob hydrophile oder hydrophobe Intraokularlinsen verwendet wurden. Auf Intraokularlinsen gebundenes Disulfiram beispielsweise konnte im Vorderaugenabschnittsmodell keine Reduktion des Zellwachstums erzielen. Möglicherweise ist dies auf eine inadäquate Bindung des Disulfirams auf die Linsenoberfläche bzw. das Linsenacrylat zurückzuführen oder auf die deutlich höhere EC50 im Vergleich zu den anderen Substanzen.

3. Langfristige Nachstar-Prophylaxe

Von den vier verbleibenden, getesteten Arzneimitteln konnten schlussendlich nur Methotrexat allein und mit PLGA und Kaffeesäure-Phenethylester in der Langzeitorgankultur im humanen Kapselsackmodell das Nachstarwachstum verhindern.

Grund hierfür mögen abermals schlechte Bindungseigenschaften oder eine zu niedrige Konzentration des Pharmakons auf der Intraokularlinse sein. Des Weiteren wurden im Vorderaugenabschnittsmodell immortalisierte Linsenepithelzelllinien verwendet, während das Kapselsackmodell mit primären humanen Zellen arbeitet. Dies kann Unterschiede in der zellbiologischen Reaktion auf Medikamenteneinflüsse ergeben. Betrachtet man die Pathogenese des Nachstars, könnte sich eine frühzeitige therapeutische Intervention auch langfristig auf die Bildung von Nachstar auswirken. Mehrere Studien zeigen erhöhte Spiegel von Wachstumsfaktoren im Kammerwasser unmittelbar nach Katarakt-Operation^{107, 108}. Möglicherweise kann mittels Antagonisierung dieser frühen Entzündungs- und Wundheilungsreaktion eine längerfristige Inhibition des Zellwachstums erreicht werden. Anhaltspunkte hierfür gibt es mehrere. Die Konzentrationen von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und inflammatorischen Botenstoffen sind nur kurz nach der Kataraktoperation erhöht^{107, 108}.

Die Rolle dieser Stoffe in der Entstehung des Nachstars wurde oben schon ausführlich dargelegt. Wormstone et al. lieferten einen weiteren Hinweis und konnten zeigen, dass eine kurze Exposition von humanen Kapselsäcken mit TGF beta für 24h eine langfristige, stärkere fibrotische Reaktionen über 28 Tage hervorruft. Im Zuge dieser Arbeit konnten für Methotrexat und Kaffeesäure-Phenethylester Langzeiteffekte zwischen 20 und 60 Tagen im Vergleich zu 8 bis 10 Tagen der Kontrollen erreicht werden. Sowohl mit Methotrexat beladene als auch mit PLGA zusätzlich modifizierte hydrophile Intraokularlinsen zeigten in der Freisetzungskinetik einen initialen Konzentrationspeak, gefolgt von einer kontinuierlichen Abgabe der Substanz über 14 Tage, die über der errechneten EC50 lag. Hydrophobe Intraokularlinsen gaben nach dem dritten Tag keine relevante Menge mehr an Methotrexat mehr ab. Trotz dieser teilweise kurzzeitigen Exposition der Linsenepithelzellen gegenüber Methotrexat kam es zu einer langfristigen Hemmung des Zellwachstums. Diese anderen Untersuchungen decken sich letztlich mit unserem Abgabeschema der entwickelten Intraokularlinsen und den daraus resultierenden Ergebnissen. Die molekularen Mechanismen hierfür müssen noch weiter untersucht werden.

4. Toxizität von Methotrexat

Methotrexat stellte sich in Zusammenschau der Ergebnisse als potentestes Medikament in der Prophylaxe des Nachstars dar. Nichts desto trotz darf die Toxizität nicht außer Acht gelassen werden. Die amerikanische ‚Food and Drug Administration (FDA)‘ hat

Methotrexat bereits 1950 in der Therapie diverser Erkrankungen zugelassen, weswegen multiple Untersuchungen zur Biokompatibilität und klinischen Langzeiteffekten und Erfahrungen erfolgt sind^{109, 110}. Intravitreale Anwendung findet Methotrexat unter anderem in der off-label Therapie des Lymphoms⁶⁶. Ebenso sind Studien zur Evaluation von Systemen mit intravitrealer Abgabe von Methotrexat in der Therapie der Uveitis¹¹¹ und Chorioiditis¹¹² erfolgt. Mehrere klinische Studien schreiben Methotrexat einen positiven Effekt gegenüber fibrotischen Prozessen, wie der proliferativen Vitreoretinopathie⁶⁷, ähnlich des Nachstars^{64, 65} zu. Mit Methotrexat und PLGA beschichtete sowie rein mit Methotrexat beladene Intraokularlinsen zeigten in der durchgeführten Toxizitätsmessung keine signifikanten Unterschiede des Zellüberlebens von kornealen Endothelzellen in der Zellkultur zur Kontrollgruppe. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer 2016 durchgeführten klinischen Studie von Ghasemi et al.¹¹³. Nach intravitrealer Injektion von 400 µg Methotrexat zur Behandlung des diabetischen Makulaödems konnten im Verlauf von 6 Monaten keine signifikanten toxischen Effekte am Endothel entdeckt werden.

5. Pharmakologie und Materialeigenschaften von Methotrexat

Die Bindung von Methotrexat an die beiden Oberflächen des hydrophilen und hydrophoben Acrylats sind unseres Wissens noch nicht untersucht. Jedoch kann man anhand der chemischen Eigenschaften Rückschlüsse darauf ziehen, warum der Stoff an der Linse bindet und über mehrere Tage mittels Diffusion in die Zellkultur abgegeben wird. Methotrexat ist ein stark lipophiler Stoff, der schlecht in Wasser und anderen lipophilen Stoffen lösbar ist. Dies liegt hauptsächlich an den beiden Kohlenstoff-Stickstoffringen, die stark hydrophob sind¹¹⁴. Am anderen Ende des Moleküls sind jedoch die sauren Carbonsäure-Reste zu sehen, die den hydrophilen Teil des Moleküls bilden¹¹⁵. Diese amphiphilen Eigenschaften könnten zu einer Mizellen-Bindung um das hydrophobe Acrylat in der wässrigen Lösung führen¹¹⁶. Diese Methotrexat-Mizellen könnten sich ähnlich bilden, wie von Ren J. et al. beschrieben¹¹⁷. Das durch die Gruppe eingesetzte Poloxamer könnte hier nicht von Bedeutung sein, da die hydrophobe IOL eine Bindungsfläche für den lipophilen Teil darstellen könnte.

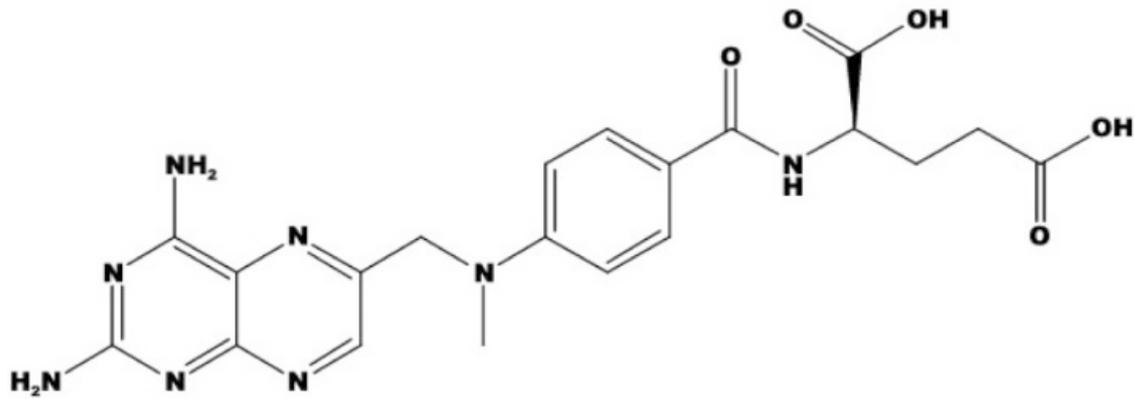


Abbildung V-1 Strukturformel von Methotrexat¹¹⁸

Die Carboxylgruppen des Methotrexat können zwar kovalente Bindungen eingehen, jedoch wurde das hydrophile und hydrophobe Acrylat der Intraokularlinsen wurde so entwickelt, dass eine hohe Biokompatibilität gegeben ist und damit eine möglichst geringe Reaktionsfreudigkeit¹¹⁹. Dies bestätigt sich auch bei genauem Studium der Strukturformeln. Eine kovalente Bindung erscheint unwahrscheinlich.

Die wahrscheinlichste chemische Bindung sind die klassischen Van-der-Waals-Kräfte. Das hydrophile und hydrophobe Acrylat hat verschiedene Gruppen mit unterschiedlichen dipolaren Eigenschaften dank Verschiebungen in der Elektronegativität. Bei Methotrexat sind diese Gruppen die beiden Carboxygruppen¹²⁰. Die Dipolbildung ist bei hydrophilem Acrylat naturgemäß höher, was letztlich auch zu den hydrophilen Eigenschaften führt. Ein Indiz hierfür ergibt sich auch aus der Konzentrationsbestimmung, da die hydrophilen Intraokularlinsen eine längerfristige Medikamentenfreisetzung gegenüber hydrophoben Intraokularlinsen zeigen. Grund hierfür könnten die stärkeren Van-der-Waals-Kräfte des hydrophilen Acrylats sein, sodass mehr Methotrexat gebunden wird¹²¹.

6. Intraokulare Pharmakokinetik

Ähnlich den klinisch angewandten intravitrealen Injektionen von Methotrexat wurden diverse Studien an Menschen- und Hasenaugen zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Methotrexat durchgeführt. Nach Injektion von 400 µg des Pharmakons zeigen sich in den ersten 48 Stunden suprathérapeutische Medikamentenspiegel, gefolgt von einer zweitägigen therapeutischen Dosis (0.2 – 2.0 µg Methotrexat pro Tag) und anschließend subtherapeutischem Medikamentenspiegel^{122, 123}. Zum Vergleich: Die im Rahmen einer anderen Arbeit in unserem Labor errechnete EC50 für Methotrexat in-vitro liegt bei 98

nM (dies entspricht ca. 45 µg Methotrexat pro Tag). Betrachtet man die Daten der Konzentrationsbestimmung dieser Arbeit, zeigte sich nach initialer hoher Dosis bei hydrophilen Intraokularlinsen eine relativ konstante Abgabe innerhalb der therapeutischen Breite für mindestens 14 Tage. Diese Überschneidung könnte ein Grund für die langfristige Hemmung des Wachstums der Linsenepithelzellen mittels der beschriebenen mit Methotrexat modifizierten Intraokularlinsen darstellen.

In der translationalen Forschung im Rahmen der Medizinproduktentwicklung müssen zahlreiche Schritte durchlaufen werden. In dieser Arbeit wurde mit der Entwicklung der medikamententragenden Intraokularlinse und den ersten Ergebnissen zur klinischen Wirksamkeit der erste Grundstein gelegt.

In der Zellkultur blieben trotz allem viele Fragen offen. Insbesondere hinsichtlich Toxizität und Biokompatibilität sowie der Langzeit-Anwendung können aktuell keine Antworten gegeben werden. Der nächste Schritt wäre nun der Übergang vom Ex-vivo-zum Tiermodell ähnlich dem Projekt von Liu et al.: Ein geeignetes Versuchstier wären ca. 8 Wochen alte, weiße Neuseeland-Kaninchen⁶². Diesen soll die Intraokularlinse implantiert werden, um bessere Ergebnisse bezüglich der genannten Punkte zu erhalten. Die Machbarkeitsstudien sind erst der Anfang einer langen Kaskade bis zur klinischen Zulassung. Anschließend muss ein Prototyp entwickelt und eine Risikoklassifikation vorgenommen werden. Nach ausreichender Risikoanalyse und Bewertung wird zunächst die Sicherheit mit technischen Tests nach speziellen Prüfnormen untersucht⁷⁸.

Nach Abschluss der Testungen hinsichtlich Sicherheit und Biokompatibilität werden klinische Studien zur Wirksamkeit durchgeführt. Danach folgt das Zulassungsverfahren um die CE-Kennzeichnung, die Voraussetzung für eine Markteinführung ist¹²⁴.

7. Klinischer Ausblick

In der folgenden Arbeit haben sich medikamentenfreisetzende Intraokularlinsen, die mit Methotrexat beladen waren, als eine vielversprechende Möglichkeit in der klinischen Nachstarprophylaxe herauskristallisiert. Aufgrund der einfachen Herstellung modifizierter Intraokularlinsen und deren Ergonomie hat diese Technik Potenzial, die Ergebnisse hinsichtlich des Nachstars in der Kataraktchirurgie zu verbessern. Methotrexat im Speziellen bietet dank seiner langjährig erprobten klinischen Anwendung (auch intraokulär) eine bedeutende Möglichkeit zur Anwendung auf Intraokularlinsen in der Nachstarprophylaxe. Bezugnehmend auf die erhobenen Daten sollten weiterführend präklinische Studien und ggf. klinische Studien zur Evaluation der Langzeitergebnisse

erfolgen. Der Weg bis zur Einführung des Medizinprodukts ist nichts desto trotz noch lang.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung

Der Nachstar ist eine der häufigsten Komplikationen nach der Katarakt-Operation. In der Literatur wurden bereits Medikamente mit potenzieller Wirkung auf die Bildung des Nachstars beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es, geeignete pharmakologische Stoffe und die Modifikationen von Intraokularlinsen als Medikamententräger mithilfe verschiedener In-vitro- und In-vivo-Modelle weiter zu evaluieren.

Methoden

Intraokularlinsen wurden entweder durch Einlegen in pharmakologische Lösung beladen oder mittels Airbrush und der Biomatrix PLGA mit Medikamenten beschichtet. Im Vorderaugenabschnittsmodell und dem humanen Kapselsackmodell wurde das Wachstum von Linsenepithelzellen (LEC) *in vitro* sowie *ex vivo* unter Einfluss der modifizierten Intraokularlinsen beobachtet. Überdies wurden die verwendeten Pharmaka hinsichtlich ihrer Toxizität auf einer kornealen Endothelzellreihe mittels XTT-Assay untersucht. Die Wirkung von Methotrexat auf die Wundheilung wurde mithilfe eines Zell-Scratch-Assays dargestellt. Zur Evaluation der therapeutischen Anwendung wurde die Freisetzung von Methotrexat aus modifizierten Intraokularlinsen gemessen.

Ergebnisse

Von den fünf getesteten Substanzen konnten abschließend nur Kaffeesäure-Phenethylester (CAPE) und Methotrexat (MTX) (und die Kombination mit PLGA) eine signifikante Hemmung des Wachstums von Linsenepithelzellen *in-vitro* und *ex-vivo* erzielen (CAPE: $p = 0.02$, MTX: $p = 0.02$). Des Weiteren zeigte Methotrexat eine signifikante Hemmung der Wundheilung an LEC ($p = 0.021$) bei ausbleibender toxischer Wirkung auf CEC-SV40 ($p = 0.606$ bzw. $p = 0.439$). Rapamycin und Retinsäure hingegen zeigten eine signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit von kornealen Endothelzellen. Die Konzentrationsbestimmung ergab einen initialen Konzentrationsanstieg, gefolgt von einer konstanten Abgabe von Methotrexat, die zu jedem Messzeitpunkt oberhalb der errechneten IC50 lag.

Diskussion

Die erhobenen Ergebnisse bieten Ansatzpunkte für weitere Anwendungen am Tiermodell sowie in klinischen Studien. Des Weiteren sollten Langzeitstudien bezüglich der

Nebenwirkungen und der nachhaltigen Effekte, im Speziellen von Methotrexat, in der Nachstarprophylaxe erfolgen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 The Ophthalmic Study Guide Field Dorothy and Forbes Marina The Ophthalmic Study Guide 272pp pound45 m&k publishing 9781905539642 1905539649 [Formula: see text]. *Emerg Nurse* 2016; 24: 17
- 2 Langston DP. *Manual of ocular diagnosis and therapy*. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2008
- 3 Abraham AG, Condon NG, West Gower E. The new epidemiology of cataract. *Ophthalmol Clin North Am* 2006; 19: 415-425
- 4 Prokofyeva E, Wegener A, Zrenner E. Cataract prevalence and prevention in Europe: a literature review. *Acta Ophthalmol* 2013; 91: 395-405
- 5 Khairallah M, Kahloun R, Bourne R, Limburg H, Flaxman SR, Jonas JB, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, Pesudovs K, Price H, White RA, Wong TY, Resnikoff S, Taylor HR, Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease S. Number of People Blind or Visually Impaired by Cataract Worldwide and in World Regions, 1990 to 2010. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56: 6762-6769
- 6 Asbell PA, Dualan I, Mindel J, Brocks D, Ahmad M, Epstein S. Age-related cataract. *Lancet* 2005; 365: 599-609
- 7 Trevor-Roper PD. Cataracts. *Br Med J* 1970; 3: 33-35
- 8 Kanski JJ, Bowling B, Nischal KK, Pearson A. *Clinical ophthalmology : a systematic approach*. Edinburgh ; New York, Elsevier/Saunders, 2011
- 9 Giblin FJ. Glutathione: a vital lens antioxidant. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2000; 16: 121-135

- 10 Canadananovic V, Latinovic S, Barisic S, Babic N, Jovanovic S. Age-related changes of vitamin C levels in aqueous humour. *Vojnosanit Pregl* 2015; 72: 823-826

- 11 Feldman BH. Cataract. In: DelMonte DW, ed <http://www.eyewiki.org/>, American Academy of Ophthalmology, 2017

- 12 Thompson J, Lakhani N. Cataracts. *Prim Care* 2015; 42: 409-423

- 13 Watkinson S, Seewoodhary R. Cataract management: effect on patients' quality of life. *Nurs Stand* 2015; 29: 42-48

- 14 Day AC, Wormald R, Coronini-Cronberg S, Smith R, Royal College of Ophthalmologists Cataract Surgery Commissioning Guidance Development G. The Royal College of Ophthalmologists' Cataract Surgery Commissioning Guidance: executive summary. *Eye (Lond)* 2016; 30: 498-502

- 15 Wormstone IM, Eldred JA. Experimental models for posterior capsule opacification research. *Exp Eye Res* 2016; 142: 2-12

- 16 Abell RG, Kerr NM, Vote BJ. Femtosecond laser-assisted cataract surgery compared with conventional cataract surgery. *Clin Exp Ophthalmol* 2013; 41: 455-462

- 17 Schaumberg DA, Dana MR, Christen WG, Glynn RJ. A systematic overview of the incidence of posterior capsule opacification. *Ophthalmology* 1998; 105: 1213-1221

- 18 Knight-Nanan D, O'Keefe M, Bowell R. Outcome and complications of intraocular lenses in children with cataract. *J Cataract Refract Surg* 1996; 22: 730-736

- 19 Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, Assia EI, Holland EY, Legler UF, Tsai JC, Castaneda VE, Hoggatt JP, Kostick AM. Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol* 1992; 37: 73-116

- 20 Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem

reduced but not yet eradicated. *Arch Ophthalmol* 2009; 127: 555-562

21 Wormstone IM. Posterior capsule opacification: a cell biological perspective. *Exp Eye Res* 2002; 74: 337-347

22 McDonnell PJ, Zarbin MA, Green WR. Posterior capsule opacification in pseudophakic eyes. *Ophthalmology* 1983; 90: 1548-1553

23 Meacock WR, Spalton DJ, Stanford MR. Role of cytokines in the pathogenesis of posterior capsule opacification. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 332-336

24 Wormstone IM, Wang L, Liu CS. Posterior capsule opacification. *Exp Eye Res* 2009; 88: 257-269

25 Schlotzer-Schrehardt U, Zenkel M, Kuchle M, Sakai LY, Naumann GO. Role of transforming growth factor-beta1 and its latent form binding protein in pseudoexfoliation syndrome. *Exp Eye Res* 2001; 73: 765-780

26 Sugita M, Kato S, Sugita G, Oshika T. Migration of lens epithelial cells through haptic root of single-piece acrylic-foldable intraocular lens. *Am J Ophthalmol* 2004; 137: 377-379

27 Wong TT, Daniels JT, Crowston JG, Khaw PT. MMP inhibition prevents human lens epithelial cell migration and contraction of the lens capsule. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 868-872

28 Karahan E, Er D, Kaynak S. An Overview of Nd:YAG Laser Capsulotomy. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* 2014; 3: 45-50

29 Fankhauser F, Roussel P, Steffen J, Van der Zypen E, Chrenkova A. Clinical studies on the efficiency of high power laser radiation upon some structures of the anterior segment of the eye. First experiences of the treatment of some pathological conditions of the anterior segment of the human eye by means of a Q-switched laser system. *Int Ophthalmol* 1981; 3: 129-139

-
- 30 Aron-Rosa D, Aron JJ, Griesemann M, Thyzel R. Use of the neodymium-YAG laser to open the posterior capsule after lens implant surgery: a preliminary report. *J Am Intraocul Implant Soc* 1980; 6: 352-354
- 31 Murrill CA, Stanfield DL, Van Brocklin MD. Capsulotomy. *Optom Clin* 1995; 4: 69-83
- 32 Ficker LA, Vickers S, Capon MR, Mellerio J, Cooling RJ. Retinal detachment following Nd:YAG posterior capsulotomy. *Eye (Lond)* 1987; 1 (Pt 1): 86-89
- 33 Keates RH, Steinert RF, Puliafito CA, Maxwell SK. Long-term follow-up of Nd:YAG laser posterior capsulotomy. *J Am Intraocul Implant Soc* 1984; 10: 164-168
- 34 Wasserman EL, Axt JC, Sheets JH. Neodymium: YAG laser posterior capsulotomy. *J Am Intraocul Implant Soc* 1985; 11: 245-248
- 35 Findl O, Drexler W, Menapace R, Georgopoulos M, Rainer G, Hitzenberger CK, Fercher AF. Changes in intraocular lens position after neodymium: YAG capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25: 659-662
- 36 Stark WJ, Worthen D, Holladay JT, Murray G. Neodymium: YAG lasers. An FDA report. *Ophthalmology* 1985; 92: 209-212
- 37 Terry AC, Stark WJ, Maumenee AE, Fagadau W. Neodymium-YAG laser for posterior capsulotomy. *Am J Ophthalmol* 1983; 96: 716-720
- 38 Steinberg EP, Javitt JC, Sharkey PD, Zuckerman A, Legro MW, Anderson GF, Bass EB, O'Day D. The content and cost of cataract surgery. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 1041-1049
- 39 Buehl W, Findl O. Effect of intraocular lens design on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 1976-1985

-
- 40 Ursell PG, Spalton DJ, Pande MV, Hollick EJ, Barman S, Boyce J, Tilling K. Relationship between intraocular lens biomaterials and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24: 352-360
- 41 Nishi O, Nishi K. Preventing posterior capsule opacification by creating a discontinuous sharp bend in the capsule. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25: 521-526
- 42 Nishi O, Nishi K, Sakanishi K. Inhibition of migrating lens epithelial cells at the capsular bend created by the rectangular optic edge of a posterior chamber intraocular lens. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998; 29: 587-594
- 43 Nishi O, Nishi K, Wickstrom K. Preventing lens epithelial cell migration using intraocular lenses with sharp rectangular edges. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26: 1543-1549
- 44 Hollick EJ, Spalton DJ, Ursell PG. Surface cytologic features on intraocular lenses: can increased biocompatibility have disadvantages? *Arch Ophthalmol* 1999; 117: 872-878
- 45 Tognetto D, Toto L, Ballone E, Ravalico G. Biocompatibility of hydrophilic intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28: 644-651
- 46 Hollick EJ, Spalton DJ, Ursell PG, Meacock WR, Barman SA, Boyce JF. Posterior capsular opacification with hydrogel, polymethylmethacrylate, and silicone intraocular lenses: two-year results of a randomized prospective trial. *Am J Ophthalmol* 2000; 129: 577-584
- 47 Nishi O, Nishi K. Intercapsular cataract surgery with lens epithelial cell removal. Part III: Long-term follow-up of posterior capsular opacification. *J Cataract Refract Surg* 1991; 17: 218-220
- 48 Nishi O. Intercapsular cataract surgery with lens epithelial cell removal. Part I: Without capsulorhexis. *J Cataract Refract Surg* 1989; 15: 297-300

-
- 49 Mathey CF, Kohnen TB, Ensikat HJ, Koch HR. Polishing methods for the lens capsule: histology and scanning electron microscopy. *J Cataract Refract Surg* 1994; 20: 64-69
- 50 Khalifa MA. Polishing the posterior capsule after extracapsular extraction of senile cataract. *J Cataract Refract Surg* 1992; 18: 170-173
- 51 Davidson MG, Morgan DK, McGahan MC. Effect of surgical technique on in vitro posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26: 1550-1554
- 52 Nibourg LM, Gelens E, Kuijjer R, Hooymans JM, van Kooten TG, Koopmans SA. Prevention of posterior capsular opacification. *Exp Eye Res* 2015; 136: 100-115
- 53 Wertheimer C, Kassumeh S, Piravej NP, Nilmayer O, Braun C, Priglinger C, Luft N, Wolf A, Mayer WJ, Priglinger SG, Eibl-Lindner KH. The Intraocular Lens as a Drug Delivery Device: In Vitro Screening of Pharmacologic Substances for the Prophylaxis of Posterior Capsule Opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58: 6408-6418
- 54 Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res* 2006; 66: 10425-10433
- 55 Cvek B. Targeting malignancies with disulfiram (Antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr Cancer Drug Targets* 2011; 11: 332-337
- 56 Lewison EF. Spontaneous regression of breast cancer. *Prog Clin Biol Res* 1977; 12: 47-53
- 57 Araiz JJ, Refojo MF, Arroyo MH, Leong FL, Albert DM, Tolentino FI. Antiproliferative effect of retinoic acid in intravitreal silicone oil in an animal model of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 522-530
- 58 Sommer A. Treatment of corneal xerophthalmia with topical retinoic acid. *Am J Ophthalmol* 1983; 95: 349-352

- 59 Inan UU, Ozturk F, Kaynak S, Ilker SS, Ozer E, Guler C. Prevention of posterior capsule opacification by retinoic acid and mitomycin. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2001; 239: 693-697
- 60 Liu H, Feng G, Wu L, Fu S, Liu P, Yang W, Zhang X. The effects of rapamycin on lens epithelial cell proliferation, migration, and matrix formation: an in vitro study. *Mol Vis* 2010; 16: 1646-1653
- 61 Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE, Investigators S. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 2003; 349: 1315-1323
- 62 Liu H, Wu L, Fu S, Hou Y, Liu P, Cui H, Liu J, Xing L, Zhang X. Polylactide-glycolic acid and rapamycin coating intraocular lens prevent posterior capsular opacification in rabbit eyes. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2009; 247: 801-807
- 63 Hepsen IF, Bayramlar H, Gultek A, Ozen S, Tilgen F, Evereklioglu C. Caffeic acid phenethyl ester to inhibit posterior capsule opacification in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 1997; 23: 1572-1576
- 64 Sternberg K, Terwee T, Stachs O, Guthoff R, Lobler M, Schmitz KP. Drug-induced secondary cataract prevention: experimental ex vivo and in vivo results with disulfiram, methotrexate and actinomycin D. *Ophthalmic Res* 2010; 44: 225-236
- 65 Hansen TJ, Tyndall R, Soll DB. Methotrexate-anticollagen conjugate inhibits in vitro lens cell outgrowth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28: 1206-1209
- 66 Huang YC, Jou JR. Intravitreal injections of methotrexate in treatment of primary central nervous system lymphoma with intraocular involvement. *Kaohsiung J Med Sci* 2016; 32: 638-639

- 67 Sadaka A, Sisk RA, Osher JM, Toygar O, Duncan MK, Riemann CD. Intravitreal methotrexate infusion for proliferative vitreoretinopathy. *Clin Ophthalmol* 2016; 10: 1811-1817
- 68 Soheilian M, Movaseghi M, Ramezani A, Peyman GA. Pilot study of safety and effect of combined intravitreal bevacizumab and methotrexate for neovascular age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol* 2011; 21: 77-82
- 69 Eibl-Lindner KH, Wertheimer C, Kampik A. [Intraocular Lens as a Drug Delivery Device: State of the Art and Future Perspective]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2016; 233: 172-178
- 70 Liu YC, Wong TT, Mehta JS. Intraocular lens as a drug delivery reservoir. *Curr Opin Ophthalmol* 2013; 24: 53-59
- 71 Davis JL, Yi NY, Salmon JH, Charlton AN, Colitz CM, Gilger BC. Sustained-release celecoxib from incubated acrylic intraocular lenses suppresses lens epithelial cell growth in an ex vivo model of posterior capsule opacity. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2012; 28: 359-368
- 72 González-Chomón C, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Drug-Eluting Intraocular Lenses. *Materials* 2011; 4: 1927-1940
- 73 Eperon S, Bossy-Nobs L, Petropoulos IK, Gurny R, Guex-Crosier Y. A biodegradable drug delivery system for the treatment of postoperative inflammation. *Int J Pharm* 2008; 352: 240-247
- 74 Lee SS, Hughes P, Ross AD, Robinson MR. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. *Pharm Res* 2010; 27: 2043-2053
- 75 Union E. Manual in borderline and classification in the community regulatory framework for medical devices. In: Committee E, ed <http://www.ec.europa.eu/>, European Union, 2017

-
- 76 Deutschland B. Gesetz über Medizinprodukte. In: Bundesgesetz, ed, 2017
- 77 Deutschland B. Gesetz über Medizinprodukte. In: Bundesgesetz, ed, 2017
- 78 Krummenauer F. [Differences between clinical trials according to the German law on pharmaceuticals (Arzneimittelgesetz) and trials according to the German law on medical products (Medizinproduktegesetz)]. *Ophthalmologie* 2003; 100: 150-154
- 79 Scheller B, Levenson B, Joner M, Zahn R, Klauss V, Naber C, Schächinger V, Elsässer A. Medikamente freisetzende Koronarstents und mit Medikamenten beschichtete Ballonkatheter. *Der Kardiologe* 2011; 5: 411-435
- 80 Wormstone IM, Tamiya S, Marcantonio JM, Reddan JR. Hepatocyte growth factor function and c-Met expression in human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 4216-4222
- 81 Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K. Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 2000; 78: 130-136
- 82 Gotoh N, Perdue NR, Matsushima H, Sage EH, Yan Q, Clark JI. An in vitro model of posterior capsular opacity: SPARC and TGF-beta2 minimize epithelial-to-mesenchymal transition in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4679-4687
- 83 Freshney RI. *Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*. Hoboken, N.J., Wiley-Blackwell, 2010
- 84 Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48: 4827-4833
- 85 Spitzer MS, Yoeruek E, Sierra A, Wallenfels-Thilo B, Schraermeyer U, Spitzer

B, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2007; 245: 1837-1842

86 Liu CS, Wormstone IM, Duncan G, Marcantonio JM, Webb SF, Davies PD. A study of human lens cell growth in vitro. A model for posterior capsule opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 906-914

87 Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007; 2: 329-333

88 Wertheimer C, Siedlecki J, Kook D, Mayer WJ, Wolf A, Klingenstein A, Kampik A, Eibl-Lindner K. EGFR inhibitor Gefitinib attenuates posterior capsule opacification in vitro and in the ex vivo human capsular bag model. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2015; 253: 409-417

89 Wertheimer C, Brandlhuber U, Kook D, Mayer WJ, Laubichler P, Wolf A, Kampik A, Eibl-Lindner K. Erufosine, a phosphoinositide-3-kinase inhibitor, to mitigate posterior capsule opacification in the human capsular bag model. *J Cataract Refract Surg* 2015; 41: 1484-1489

90 Greenhalgh J, Hockenhull J, Rao N, Dunder Y, Dickson RC, Bagust A. Drug-eluting stents versus bare metal stents for angina or acute coronary syndromes. *Cochrane Database Syst Rev* 2010: CD004587

91 Nguyen BT, Jensen JT. Evaluating the efficacy and safety of a progestin- and estrogen-releasing ethylene vinyl acetate copolymer contraceptive vaginal ring. *Expert Opin Drug Saf* 2014; 13: 1423-1430

92 Pommier S, Meyer F, Guigou S, Barthelemy T, Gobert F, Hajjar C, Merite PY, Parrat E, Rouhette H, Matonti F. Long-Term Real-Life Efficacy and Safety of Repeated Ozurdex(R) Injections and Factors Associated with Macular Edema Resolution after

Retinal Vein Occlusion: The REMIDO 2 Study. *Ophthalmologica* 2016; 236: 186-192

93 Novack GD, Robin AL. Ocular pharmacology. *J Clin Pharmacol* 2016; 56: 517-527

94 Eibl-Lindner KH, Liegl R, Wertheimer C, Kampik A. [Intraocular lens as a drug delivery device]. *Ophthalmologie* 2013; 110: 990-994

95 Scriven L. Physics and applications of dip coating and spin coating. *MRS Online Proceedings Library Archive* 1988; 121

96 Huang Q, Cheng GP, Chiu K, Wang GQ. Surface Modification of Intraocular Lenses. *Chin Med J (Engl)* 2016; 129: 206-214

97 Kasemo B. Biological surface science. *Surface science* 2002; 500: 656-677

98 Horton CE, Adamson JE, Mladick RA, Carraway JH. Vicryl synthetic absorbable sutures. *Am Surg* 1974; 40: 729-731

99 Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 1995; 16: 305-311

100 Siegel SJ, Kahn JB, Metzger K, Winey KI, Werner K, Dan N. Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 64: 287-293

101 Biondi M, Ungaro F, Quaglia F, Netti PA. Controlled drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 229-242

102 Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* 2011; 3: 1377-1397

103 Potter C, Tian Y, Walker G, McCoy C, Hornsby P, Donnelly C, Jones DS, Andrews GP. Novel supercritical carbon dioxide impregnation technique for the

production of amorphous solid drug dispersions: a comparison to hot melt extrusion. *Molecular pharmaceutics* 2015; 12: 1377-1390

104 Duarte AR, Simplicio AL, Vega-Gonzalez A, Subra-Paternault P, Coimbra P, Gil MH, de Sousa HC, Duarte CM. Impregnation of an intraocular lens for ophthalmic drug delivery. *Curr Drug Deliv* 2008; 5: 102-107

105 Masmoudi Y, Azzouk LB, Forzano O, Andre J-M, Badens E. Supercritical impregnation of intraocular lenses. *The Journal of Supercritical Fluids* 2011; 60: 98-105

106 Lipnitzki I, Bronshtein R, Ben Eliahu S, Marcovich AL, Kleinmann G. Hydrophilic acrylic intraocular lens as a drug delivery system: influence of the presoaking time and comparison to intracameral injection. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2013; 29: 414-418

107 Xu H, Chen M, Forrester JV, Lois N. Cataract surgery induces retinal pro-inflammatory gene expression and protein secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 249-255

108 Wallentin N, Wickstrom K, Lundberg C. Effect of cataract surgery on aqueous TGF-beta and lens epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1410-1418

109 Haustein UF, Rytter M. Methotrexate in psoriasis: 26 years' experience with low-dose long-term treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2000; 14: 382-388

110 Kremer JM, Lee JK. The safety and efficacy of the use of methotrexate in long-term therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 822-831

111 Manna S, Banerjee RK, Augsburger JJ, Al-Rjoub MF, Correa ZM. Ultrasonographical assessment of implanted biodegradable device for long-term slow release of methotrexate into the vitreous. *Exp Eye Res* 2016; 148: 30-32

-
- 112 Julian K, Langner-Wegscheider BJ, Haas A, De Smet MD. Intravitreal methotrexate in the management of presumed tuberculous serpiginous-like choroiditis. *Retina* 2013; 33: 1943-1948
- 113 Ghasemi Falavarjani K, Golabi S, Hadavandkhani A. Effect of Intravitreal Injection of Methotrexate on Human Corneal Endothelial Cells. *Cornea* 2016; 35: 217-219
- 114 Hawley GG, Lewis RJ. *Hawley's condensed chemical dictionary*. Hoboken, N.J., Wiley, 2007
- 115 Schnell JR, Dyson HJ, Wright PE. Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2004; 33: 119-140
- 116 Gelbart W, Ben-Shaul A, Roux D. *Micelles, membranes, microemulsions, and monolayers*. New York, Springer-Verlag, 1994
- 117 Ren J, Fang Z, Yao L, Dahmani FZ, Yin L, Zhou J, Yao J. A micelle-like structure of poloxamer-methotrexate conjugates as nanocarrier for methotrexate delivery. *Int J Pharm* 2015; 487: 177-186
- 118 Jouyban A, Shaghghi M, Manzoori JL, Soleymani J, JalilVaez-Gharamaleki J. Determination of methotrexate in biological fluids and a parenteral injection using terbium-sensitized method. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 2011; 10: 695
- 119 Abela-Formanek C, Amon M, Schild G, Schauersberger J, Heinze G, Kruger A. Uveal and capsular biocompatibility of hydrophilic acrylic, hydrophobic acrylic, and silicone intraocular lenses. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2002; 28: 50-61
- 120 Neumüller O. *Römpps Chemie-Lexikon*; Franckh'sche Verlagshandlung W. Keller & Co, Stuttgart 1988
- 121 Manna S, Banerjee RK, Augsburger JJ, Al-Rjoub MF, Donnell A, Correa ZM.

Biodegradable chitosan and polylactic acid-based intraocular micro-implant for sustained release of methotrexate into vitreous: analysis of pharmacokinetics and toxicity in rabbit eyes. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie 2015; 253: 1297-1305

122 Velez G, Yuan P, Sung C, Tansey G, Reed GF, Chan CC, Nussenblatt RB, Robinson MR. Pharmacokinetics and toxicity of intravitreal chemotherapy for primary intraocular lymphoma. Arch Ophthalmol 2001; 119: 1518-1524

123 Palakurthi NK, Krishnamoorthy M, Augsburger JJ, Correa ZM, Banerjee RK. Investigation of kinetics of methotrexate for therapeutic treatment of intraocular lymphoma. Curr Eye Res 2010; 35: 1105-1115

124 Soskuty G. Datentransparenz bei Medizinprodukten—Ideen der Medizinprodukteindustrie. Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen 2011; 105: 189-193

VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
CAPE	Kaffeensäure-Phenetylester (caffeic acid phenethyl ester)
CEC	Korneale Endothelzellen
DS	Disulfiram
EC50	Mittlere effektive Konzentration
ECCE	Extrakapsuläre Katarakt-Extraktion
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FGF	Fibroblast Growth Factor
IOL	Intraokularlinse
KO	Kontrolle
LEC	Linsenepithelzellen
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MTX	Methotrexat
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCO	Nachstar (Posterior Capsule Opacification)
pHEMA	Polyhydroxyethylmethacrylat
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PMMA	Polymethylmethacrylat
RAP	Rapamycin
RET	Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
TGF β	Transforming Growth Factor beta
UV	Ultraviolett
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid

IX. PUBLIZIERTE ERGEBNISSE

Originalartikel

Kassumeh S, Wertheimer C, von Studnitz A, Hillenmayer A, Priglinger C, Wolf A, Mayer W, Teupser D, Holdt LM, Priglinger S, Eibl-Lindner K. Poly(lactic-co-glycolic) acid as a slow-release drug-carrying matrix for methotrexate coated onto intraocular lenses to conquer posterior capsule opacification.

In: Current Eye Research, Januar 2018, Impact Factor gemäß Journal Citation Reports 2016 der Ophthalmologie: 2.238, Listenplatz: 23

Wertheimer C, **Kassumeh S**, Piravej N, Nilmayer O, Braun C, Priglinger C, Luft N, Wolf A, Mayer W, Priglinger S, Eibl-Lindner K. **The intraocular lens as a drug delivery device: In-vitro screening of pharmacological substances for the prophylaxis of posterior capsule opacification.**

In: Investigative Ophthalmology & Visual Science, Dezember 2017, Impact Factor gemäß Journal Citation Reports 2016 der Ophthalmologie: 3.303, Listenplatz 11

Kongressbeiträge

Kassumeh S, Wertheimer C, Wolf A, Priglinger C, Priglinger S, Eibl-Lindner K. Pharmacologically pre-soaked intraocular lens as a drug delivery system in posterior capsule opacification prophylaxis. ESCRS; Copenhagen 2016.

Wertheimer C, **Kassumeh S**, Wolf A, Priglinger C, Priglinger S, Eibl-Lindner K. **Pharmacologically loaded biomatrices spray-coated on intraocular lenses as drug carriers in prophylaxis of posterior capsule opacification.** ESCRS; Copenhagen 2016.

Wertheimer C, **Kassumeh S**, Wolf A, Priglinger C, Priglinger S, Eibl-Lindner K. **Die Entwicklung einer Intraokularlinse mit pharmakologisch beladenem Biomatrix-Coating als Arzneimittelträger in der Prophylaxe des Nachstars.** DOG; Berlin 2016

X. DANKSAGUNG

Allen voran danke ich meiner Doktormutter Prof. Dr. Kirsten Eibl-Lindner für die umsichtige Betreuung und die Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Ausdrücklich danken möchte ich meinem Betreuer Dr. Christian Wertheimer für seine unermüdliche, liebevolle und hilfsbereite Art, dem guten Zuspruch in schwierigen Zeiten und dem teilweise notwendigen Druck. Danke für die unzähligen Labormeetings, Freizeitaktivitäten sowie die stundenlangen Telefonate, ohne die die Entstehung der Dissertation in wesentlichen Zügen erschwert gewesen wäre.

Dank gebührt meiner Familie: Meinen Eltern Dr. Notburga Kassumeh sowie Dr. Yassin Kassumeh für ihre aufbauenden Worte sowie die nötige seelische und finanzielle Stütze. Danke auch an meine beiden Brüder, Thomas und Andreas Kassumeh, die immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danke an die technische Assistentin, Laure Djaleu, alle Doktoranden und ärztliche Mitarbeiter, die jederzeit ein offenes Ohr für persönliche und labortechnische Anliegen hatten und zu einer humorvollen und hilfsbereiten Zusammenarbeit beitrugen.

Ein großer Dank gilt meinem geschätzten Kumpel und Mit-Doktoranden Alexander Kueres. Danke für die unzähligen Labortage (und -nächte), die ‚Lernsessions‘ in Prüfungsphasen, die Kaffeepausen, Shopping-Touren, handwerkliche Aktionen und tiefgründigen Gespräche.

Besonderer Dank gilt außerdem meinen engsten Freunden Benedikt Hiebl und Daniel Stelzl, die durch kreative Vorschläge und die notwendige Ablenkung das Schreiben der Dissertation wesentlich vereinfachten.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Annabel von Studnitz für ihre Geduld, ihre Selbstlosigkeit und den mir entgegengebrachten Rückhalt auch in inspirationsarmen Zeiten und während Motivationstiefs. Danke für den notwendigen Halt, deine umsichtige Art und sämtliches aufgebrachtes Verständnis.

XI. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Eidesstattliche Versicherung

Kassumeh Stefan Amin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Ein innovatives Medizinprodukt: Die biologisch aktive, medikamentenfreisetzende Intraokularlinse zur Modulierung des Nachstars

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 16.11.2018

Ort, Datum

Stefan Amin Kassumeh

Unterschrift Doktorandin/Doktorand