

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

**Entwicklung einer medikamentenfreisetzenden
Intraokularlinse mit den EGFR-Inhibitoren
Erlotinib und Gefitinib**

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

vorgelegt von
Alexander Klaus Kueres
aus Pfaffenhofen an der Ilm

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

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

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Daniel Kook
Prof. Dr. Arthur Müller**

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

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2019

Gewidmet meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	11
1	Anatomische Grundlagen.....	11
2	Die Katarakt.....	12
2.1	Begriffsdefinition	12
2.2	Epidemiologie	12
2.3	Pathogenese und Ätiologie der Katarakt	13
2.4	Klinik der Katarakt.....	14
2.5	Therapie der Katarakt	15
2.5.1	Herkömmliche Operationstechnik.....	15
2.5.2	Femtosekundenlaser-assistierte Kataraktoperation (FLACS)	16
3	Nachstar	16
3.1	Begriffsdefinition	16
3.2	Epidemiologie	17
3.3	Pathogenese des Nachstars	17
3.4	Konventionelle Behandlung mit Nd:YAG-Laser	19
4	Möglichkeiten der Nachstarprophylaxe	20
4.1	Design von IOL	20
4.2	Operationstechnik	20
4.3	Pharmakologische Nachstarprophylaxe	21
4.4	Die IOL als Medikamententräger	22
II	ZIELSETZUNG & HYPOTHESENFORMULIERUNG	25
III	MATERIAL UND METHODEN	26
1	Zellkultur	26
1.1	Zelllinie FHL 124.....	26
1.2	Zelllinie CEC-SV40	26
1.3	Zell- und Gewebekultivierung.....	26
2	Erlotinib.....	27
3	Gefitinib	27

4	Intraokularlinsen	27
4.1	Hydrophile Intraokularlinsen	27
4.2	Hydrophobe Intraokularlinsen.....	28
4.3	Hydrophile Intraokularlinsen mit hydrophober Oberfläche	28
5	Pharmakologische Linsenmodifikation	28
6	Liberationsbestimmung von Erlotinib aus der IOL	30
7	Vorderaugenabschnittsmodell	31
8	Humanes Kapselsackmodell.....	33
9	Toxizität an cornealen Endothelzellen.....	35
10	Statistische Analyse	36
IV	ERGEBNISSE.....	37
1	Liberation von Erlotinib aus der IOL	37
2	Vorderaugenabschnittsmodell	38
2.1	Vorderaugenabschnittsmodell mit Erlotinib-modifizierten IOL.....	38
2.2	Vorderaugenabschnittsmodell mit Gefitinib-modifizierten IOL	40
3	Humanes Kapselsackmodell.....	42
3.1	Humanes Kapselsackmodell mit Erlotinib-modifizierten IOL.....	42
3.2	Humanes Kapselsackmodell mit Gefitinib-modifizierten IOL	43
4	Toxizitätsbestimmung von EGFR-Inhibitoren an Corneaendothelzellen	44
4.1	Toxizität von Erlotinib-modifizierten IOL an cornealen Endothelzellen ...	44
4.2	Toxizität von Gefitinib-modifizierten IOL an cornealen Endothelzellen ...	45
V	DISKUSSION.....	46
1	Zusammenfassung der Ergebnisse	46
2	Wirkspiegel.....	46
3	Diskussion der Toxizität	47
4	Bedeutung der Ergebnisse	48
4.1	Die medikamentenfreisetzende IOL	48
4.2	Rechtliche Grundlagen der medikamentenfreisetzenden IOL als	

Medizinprodukt	49
4.3 Die Rolle des EGF-Rezeptors in der Pathogenese des Nachstars.....	50
4.4 Fixierung der IOL im Kapselsack.....	51
5 Offene Fragestellungen.....	52
5.1 Chemische Grundlagen der Stoffbindung an die IOL.....	52
5.2 Wirkstoffverteilungsmuster der Intraokularlinse	52
6 Ausblick	54
VI LITERATURVERZEICHNIS.....	55
VII PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	61
VIII DANKSAGUNG	62
IX EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	63

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Lage & dreidimensionale Architektur der Linse	11
Abbildung 2 Akkommodationsbreite in Dioptrien im Lebensverlauf	12
Abbildung 3 Klinische Präsentation der Katarakt in verschiedenen Stadien	15
Abbildung 4 Herkömmliche Katarakt-OP-Technik	15
Abbildung 5 FLACS Modifiziert nach Liu et al. ³⁷	16
Abbildung 6 Übersicht über die Pathogenese des Nachstar	18
Abbildung 7 Entwicklung des Nachstars	19
Abbildung 8 Möglichkeiten der IOL-Modifikation	24
Abbildung 9 IOL-Modifikation	29
Abbildung 10 Vorderaugenabschnittsmodell	31
Abbildung 11 Humanes Kapselsackmodell – Beispielfotografie	34
Abbildung 12 Erlotinibliberation aus IOL über 14 Tage	37
Abbildung 13 Zellwachstum im Vorderaugenabschnittsmodell mit Erlotinib	38
Abbildung 14 Membranausschnitte des Vorderaugenabschnittsmodells Erlotinib	39
Abbildung 15 Zellwachstum im Vorderaugenabschnittsmodell mit Gefitinib	40
Abbildung 16 Membranausschnitte des Vorderaugenabschnittsmodells Gefitinib	41
Abbildung 17 Humanes Kapselsackmodell mit Erlotinib-modifizierten IOL	42
Abbildung 18 Humanes Kapselsackmodell mit Gefitinib-modifizierten IOL	43
Abbildung 19 Toxizität von Erlotinib-IOL an HCEC	44
Abbildung 20 Toxizität von Gefitinib-IOL an HCEC	45

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMG.....	<i>Arzneimittelgesetz</i>
bzw.	<i>beziehungsweise</i>
dpt	<i>Dioptrien</i>
EDPRG.....	<i>The Eye Diseases Prevalence Research Group</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERK.....	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FCS	<i>Fetales Kälberserum</i>
FHL 124.....	<i>Fetale Humane Linsenepithelzellen 124</i>
FLACS	<i>Femtosekundenlaser assistierte Kataraktoperation</i>
HCEC	<i>Humane corneale Endothelzellen</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IC ₅₀	<i>Mittlere inhibitorische Konzentration</i>
IOL	<i>Intraokularlinse(n)</i>
IU	<i>International Unit (Internationale Einheit)</i>
Ko.....	<i>Kontrolle</i>
LC.....	<i>Linsenkapsel</i>
LE	<i>Linsenepithel</i>
LEC	<i>Linsenepithelzellen</i>
LF	<i>Linsenfasern</i>
Mio M1	<i>Müller-Glia-Zelllinie</i>
mm	<i>Millimeter</i>
MPG.....	<i>Medizinproduktegesetz</i>
Nd:YAG-Laser.....	<i>Neodym-dotierte Yttrium-Aluminium-Granat Laser-Kapsulotomie</i>
OFZ	<i>Organellenfreie Zone</i>
p	<i>p-Wert</i>
p38-MAP-Kinase	<i>p38-mitogen aktivierte Proteinkinase</i>
pax6	<i>Paired box protein Pax-6</i>
PBS.....	<i>Phosphate buffered saline</i>

Phi.....	<i>Hydrophile Intraokularlinse</i>
Pho.....	<i>Hydrophobe Intraokularlinse</i>
Phophi	<i>Hydrophile Intraokularlinse mit hydrophober Oberfläche</i>
PLGA	<i>Poly(lactid-co-glycolid)</i>
PMMA.....	<i>Polymethylmethacrylat</i>
RPE.....	<i>Retinales Pigmentepithel</i>
RT-PCR	<i>reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMA	<i>Smooth muscle actin</i>
SSSS	<i>Supersaturated Soaking Solution</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
USS.....	<i>Unsaturated Soaking Solution</i>
WHO	<i>Weltgesundheitsorganisation</i>
μm	<i>Mikrometer</i>
μM	<i>μ-Molar</i>

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung

Der Nachstar ist die häufigste Komplikation nach Kataraktoperation und führt zu einer sukzessiven Trübung des Kapselsacks. Zugrunde liegt eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) von residuellen Linsenepithelzellen (LEC), die unter anderem durch den EGF-Rezeptor (Epidermal Growth Factor-Rezeptor) ausgelöst und moduliert wird. Erlotinib und Gefitinib sind selektive Inhibitoren des EGF-Rezeptors und können direkt mit der implantierten Intraokularlinse (IOL) in das Auge eingebracht werden, um vor Ort zu wirken. Dabei ist das angrenzende Corneaendothel besonders zu schützen.

Methoden

Erlotinib und Gefitinib wurden auf unterschiedliche gängige IOL-Typen aufgebracht und die medikamentenfreisetzende IOL als Transportmedium für das Pharmakon untersucht. Dies geschah *in vitro* in einem Vorderaugenabschnittsmodell und außerdem in einem humanen *ex vivo* Kapselsackmodell. Dabei wurde das Zellwachstum nach 72 Stunden respektive die Dauer bis zur vollständigen Konfluenz der humanen Kapselsäcke gemessen. Der Einfluss von medikamentenfreisetzenden IOL auf corneale Endothelzellen wurde in einem Zellkulturmodell untersucht. Zusätzlich wurde die Freisetzung des Pharmakons aus der IOL durch Spektrometrie bestimmt.

Resultate:

IOL mit EGFR-Inhibitoren (Epidermal Growth Factor Receptor) mindern das Zellwachstum von Linsenepithelzellen sowohl *in vitro* als auch im humanen Kapselsackmodell. *In vitro* nimmt das Zellwachstum, in Abhängigkeit von Konzentration und Oberflächenmaterial um 40% bis 90% ab. Im Kapselsackmodell konnte die Zeit bis zur vollständigen Konfluenz in etwa verdoppelt werden. Dabei sind die modifizierten IOL nicht schädlich für das corneale Endothel. Die medikamentenfreisetzende IOL können den Wirkstoff in relevanten Konzentrationen über einen Zeitraum von mindestens 9 Tagen abgeben.

Diskussion

Mit EGFR-Inhibitoren beladene IOL können die Nachstarbildung effizient und sicher vermindern. Genauere Aussagen zu systemischer Verfügbarkeit, Pharmakokinetik und Wirksamkeit bedürfen weiterer Untersuchungen im Tierversuch.

I EINLEITUNG

1 Anatomische Grundlagen

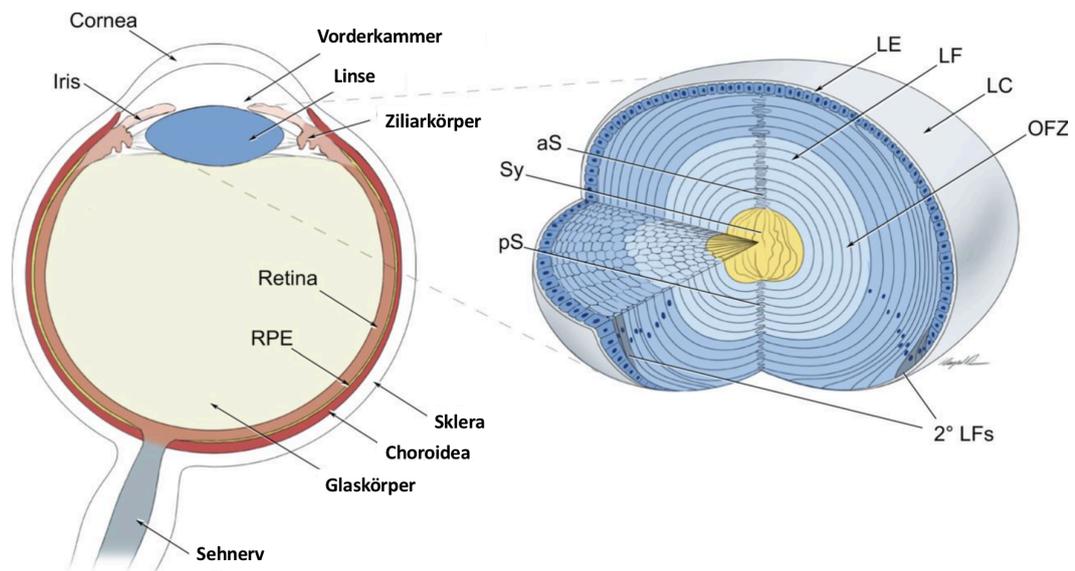


Abbildung 1 Lage & dreidimensionale Architektur der Linse

Die Linse liegt im vorderen Augenabschnitt und besteht aus Linsenepithel (LE) und Linsenfasern (LF) umgeben von der Linsenkapsel (LC). Neu gebildete Linsenfasern lagern sich um die alten zentral gelegenen Fasern und bilden so eine radiale Schichtung, die im Inneren immer kompakter wird und die Zellorganellen verliert (OFZ). Modifiziert nach Cvekl et al.¹

Die Linse ist Teil des refraktiven Apparats. Im Gegensatz zur Cornea, die etwa +43dpt Brechkraft hat, hat die Linse bei Säuglingen die Möglichkeit ihre fernakkommodierte Brechkraft durch Veränderung der Brechungsradien anzupassen. Diesen Vorgang nennt man Akkommodation². Diese, über die Zonulafasern vermittelte Formänderung, dient dazu Objekte in unterschiedlichen Entfernungen auf der Retina fokussieren zu können³. Die Akkommodationsbreite nimmt, wie in Abbildung 2 dargestellt, mit nachlassender Linsenelastizität im Laufe des Lebens ständig ab, so dass ab dem 40. Lebensjahr häufig eine Lesebrille benötigt wird⁴. Dies wird Presbyopie genannt^{5, 6}.

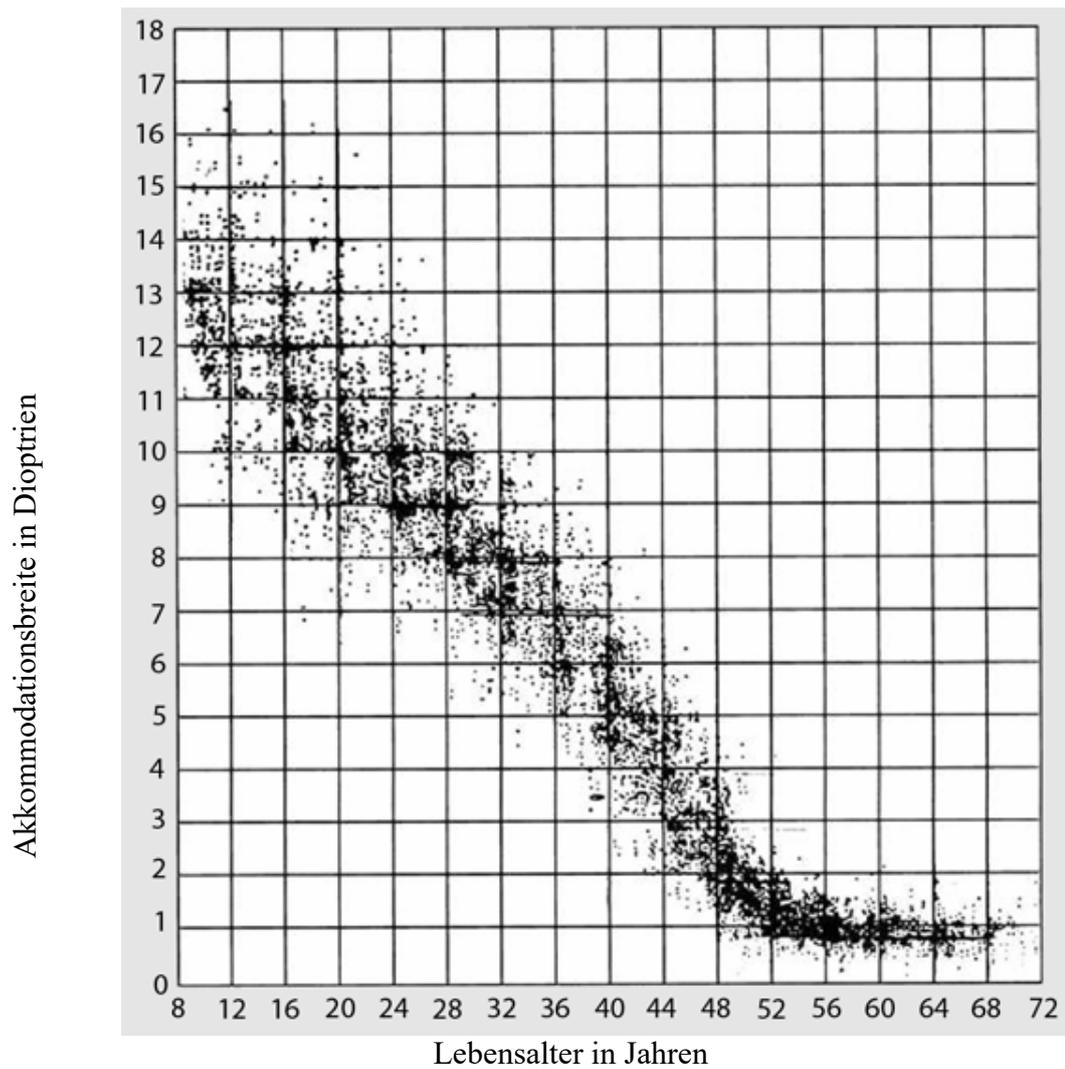


Abbildung 2 Akkommodationsbreite in Dioptrien im Lebensverlauf

Akkommodationsbreite von 4200 Probanden zeigt eine deutliche Abnahme der Akkommodationsfähigkeit bis zum 50. Lebensjahr. (nach Baumeister⁴)

2 Die Katarakt

2.1 Begriffsdefinition

Die Katarakt ist definiert als eine Trübung der kristallinen Linse im Auge und einer damit einhergehenden Verschlechterung ihrer optischen Eigenschaften, die meist mit dem Alter des Betroffenen assoziiert ist⁷.

2.2 Epidemiologie

Die Zahl der Blinden oder erblindeten Menschen auf der Welt wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahre 2010 auf 39 Millionen geschätzt.

Darüber hinaus sind 285 Millionen sehbehindert, weitere 246 Millionen haben einen schlechten Visus. 82% aller Blinden sind älter als 50 Jahre. Hauptursache für die Erblindung ist mit großem Abstand die Katarakt (51%), die neben Refraktionsfehlern (43%) auch für 33% aller Sehbehinderten verantwortlich ist⁸. Bourne et al.⁹ zeigen außerdem, dass Erblindung durch Katarakt vor allem ein Problem ärmerer Länder ist. So lag die Prävalenz von Erblindungen bei Erwachsenen, die größtenteils durch Katarakt verursacht ist, in Afrika südlich der Sahara bei 4,3%-5,1% während sie in entwickelten Ländern kleiner als 0,5% ist. Die Prävalenz der Katarakt bei über 40-Jährigen liegt gemäß EDPRG (The Eye Diseases Prevalence Research Group) bei 17,2%. Mit der gesellschaftlichen Alterung soll dieser Wert bis 2020 um etwa 50% steigen¹⁰.

In Deutschland ist die Kataraktoperation mit etwa 600.000 bis 800.000 Eingriffen jährlich die am häufigsten durchgeführte Operation^{11, 12}.

2.3 Pathogenese und Ätiologie der Katarakt

Je nach Lokalisation können drei verschiedene Arten von Katarakt unterschieden werden: Die Kernkatarakt, die kortikale Katarakt und die subkapsuläre Katarakt¹³. Normalerweise wird die optische Durchlässigkeit der Linse durch die Aktivität von semipermeablen Membranen und durch die Natrium-Kalium-Pumpen des Linsenepithels aufrechterhalten¹⁴. Im Rahmen von Alterungsprozessen kommt es zur Bildung von oxidativ aktiven Radikalen, die dieses komplexe Gleichgewicht zerstören¹⁵. Dieser oxidative Stress führt zur häufigsten Form der Katarakt, der senilen Katarakt, deren Auftreten mit steigendem Alter zunimmt¹⁶. Risikofaktoren für eine Beschleunigung dieser Prozesse sind Rauchen^{17, 18}, Diabetes mellitus¹⁸⁻²⁰ und das weibliche Geschlecht, wobei hier dem postmenopausalen Abfall des Östrogenspiegels die Ursache zugeschrieben wird²¹.

Auch verschiedene Strahlenarten können die Entwicklung einer Katarakt fördern. Insbesondere UV-Strahlung²² hat durch ihre Omnipräsenz einen großen Einfluss²³, aber auch Infrarotstrahlung²⁴, etwa bei Glasbläsern als Berufserkrankung, oder radioaktive Strahlung²⁴ können zur Entwicklung einer Katarakt führen.

Außerdem sind autosomal-rezessive und autosomal-dominante Erbgänge für die kongenitale Katarakt bekannt²⁵. Besonders häufig sind dabei die Gene PITX3,

CRYGC und CRYAA betroffen, die unter anderem verschiedene Kristalline und Konnexine der Linse kodieren und für die Funktion der Gap-Junctions benötigt werden²⁶⁻²⁸.

Neben der erworbenen und kongenitalen primären Katarakt, kann sie auch als sekundäre Katarakt im Rahmen von anderen systemischen oder okulären Erkrankungen auftreten. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Uveitis²⁹, die isoliert oder im Rahmen systemischer rheumatischer Erkrankungen auftreten kann^{30, 31}. Das Glaukom tritt überdurchschnittlich häufig in Zusammenhang mit einer Katarakt auf³².

Okuläre Traumata stellen eine weitere mögliche Ätiologie der Katarakt dar. Meist handelt es sich um stumpfe Verletzungen des Auges oder der Linsenkapsel, zum Beispiel Schläge oder Bälle³³. Der postoperative Visus ist im Vergleich mit einer atraumatischen Genese der Katarakt meist schlechter³⁴. Überdurchschnittlich häufig sind junge Männer im Rahmen ihrer Arbeit oder beim Sport betroffen³⁵.

2.4 Klinik der Katarakt

Die Katarakt präsentiert sich meist mit einer langsam progredienten Trübung der Linse, die nach und nach zu einer Einschränkung der Sehfähigkeit führt. Frühe Stadien werden oft bei Routineuntersuchungen entdeckt. Die stadienabhängige klinische Präsentation wird in Abbildung 3 gezeigt. Ein Frühsymptom ist oft eine erhöhte Blendempfindlichkeit gefolgt von Abnahme der Sehschärfe sowie monookulären Doppelbildern und einer Myopisierung. Die genaue Symptomatik hängt auch vom Untertyp der Katarakt ab^{3, 13, 36, 37}.



Abbildung 3 Klinische Präsentation der Katarakt in verschiedenen Stadien

(a) zeigt eine leichte Trübung (Cataracta incipiens), (b) eine fortgeschrittene Trübung (Cataracta protracta) der optischen Achse und (c) eine mature Katarakt mit kompletter Eintrübung der Linse. Modifiziert nach Nam et al.³⁸

2.5 Therapie der Katarakt

Die Therapie der Katarakt ist die operative Entfernung der getrübten Linse und die Implantation einer künstlichen IOL, um die Integrität des optischen Apparats so gut wie möglich wiederherzustellen³⁷.

2.5.1 Herkömmliche Operationstechnik



Abbildung 4 Herkömmliche Katarakt-OP-Technik

Modifiziert nach Liu et al.³⁷

Die Operation findet in zumeist in Oberflächenanästhesie statt³⁹. Erster Schritt ist ein kleiner Einschnitt in die Cornea mit einer 15°-Lanze als Operationszugang. Der Vorgang ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Anschließend wird mit einer gebogenen Nadel die vordere Linsenkapsel zirkulär eröffnet. Diesen Schritt nennt man Kapsulorhexis. Dann wird die Linse bei der Hydrodissektion mittels Unterspülung mit Wasser vom Kapselsack abgetrennt. Bei der darauf folgenden Phakoemulsifikation wird die Linse mit Ultraschallimpulsen in Schwingung versetzt und dadurch aufgelöst und gleichzeitig abgesaugt. Verbleibendes Linsenmaterial wird durch abwechselndes Saugen und Spülen entfernt. Die hintere Linsenkapsel wird poliert, um möglichst wenig residuelle Linsenbestandteile im Kapselsack zu

belassen. Der vorne kreisrund eröffnete Kapselsack verbleibt an den Zonulafasern aufgehängt im Auge und dient als Halterung für die IOL, die durch den selben Schnitt in der Cornea, über den die Linse entfernt wurde, eingeführt wird, um die Brechkraft des Auges wiederherzustellen^{37, 40}.

2.5.2 Femtosekundenlaser-assistierte Kataraktoperation (FLACS)



Abbildung 5 FLACS Modifiziert nach Liu et al.³⁷

Analog zum oben beschriebenen Vorgehen wurde in den vergangenen Jahren ein neues Verfahren entwickelt, das die konventionellen Einschnitte in Cornea, die Kapsulorhexis sowie eine grobe Fragmentierung der Linse mit Hilfe eines Femtosekundenlasers durchführt⁴¹. Diese Therapieoption ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Aufgrund insgesamt selten auftretender Komplikationen, konnte weder eine Gleichwertigkeit noch eine Überlegenheit der FLACS gegenüber der konventionellen Operationstechnik gezeigt werden⁴².

3 Nachstar

3.1 Begriffsdefinition

Der Nachstar entwickelt sich innerhalb Tagen bis Jahren nach komplikationsloser Kataraktoperation durch das Wachstum von Linsenepithelzellen auf der zuvor transparenten hinteren Linsenkapsel und ist die häufigste Komplikation einer Kataraktoperation. Dieser Prozess geht meist mit einer Verschlechterung des Seheindrucks des Patienten einher⁴³.

3.2 Epidemiologie

Fünf Jahre nach Kataraktoperation tritt bei bis zu 45% der über 60-Jährigen ein Nachstar auf. Bei den unter 40-Jährigen tritt dieses Krankheitsbild bei über 70% der Operierten auf⁴⁴. Studien von Stager et al. legen nahe, dass sich bei Kindern, vor allem im Alter von unter vier Jahren, schneller und deutlich häufiger als beim Erwachsenen ein Nachstar bildet^{45, 46}.

3.3 Pathogenese des Nachstars

Der Nachstar ist eine fibrotische Wundheilungsreaktion der Linsenkapsel⁴⁷. Grundlage dieser Reaktion sind einzelne LEC, die trotz Phakoemulsifikation und Aspiration der Linse sowie Polieren der hinteren Kapsel im Kapselsack, genauer gesagt an der Rückseite der vorderen Kapsel und in der Äquatorialregion verbleiben⁴⁸. Das operative Trauma führt zu einer Beschädigung der Blut- Glaskörper-Schranke und damit einer Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF- β . Außerdem werden davor kapselgebundene Wachstumsfaktoren aus der Extrazellulärmatrix wie Thrombin und HGF frei⁴⁹ (Abbildung 6). Die Wundheilungsreaktion führt bei der überlebenden robusten Zellpopulation zu einer vermehrten Rezeptoraktivität, die durch die hohen Konzentrationen an Wachstumsfaktoren zu einer Proliferation und epithelialen-mesenchymalen Transition der LEC führt⁵⁰.

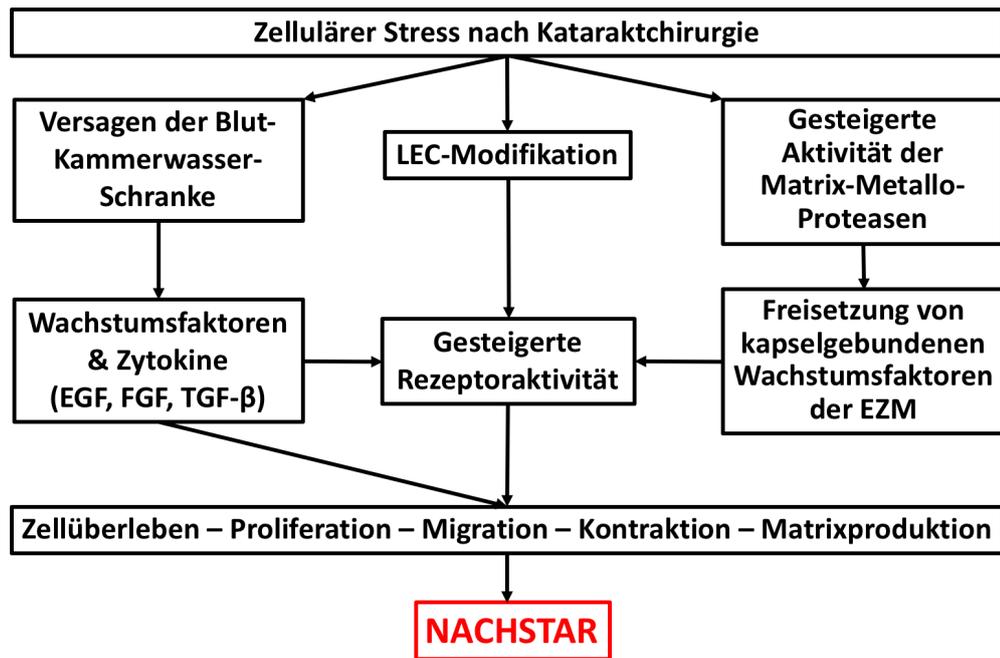


Abbildung 6 Übersicht über die Pathogenese des Nachstar

Modifiziert nach Wormstone 2009 ⁴⁹

Durch die phänotypische Transdifferenzierung zu Myofibroblasten können die LEC alpha-SMA produzieren, das ihnen kontraktile Eigenschaften bringt. Dies führt zur Kontraktion der posterioren Linsenkapsel und damit zu Verwerfungen im natürlichen Weg des Lichts⁵¹⁻⁵³. (vgl. Abbildung 7) Diese Verwerfungen sind die Ursache der Symptomatik der Patienten.

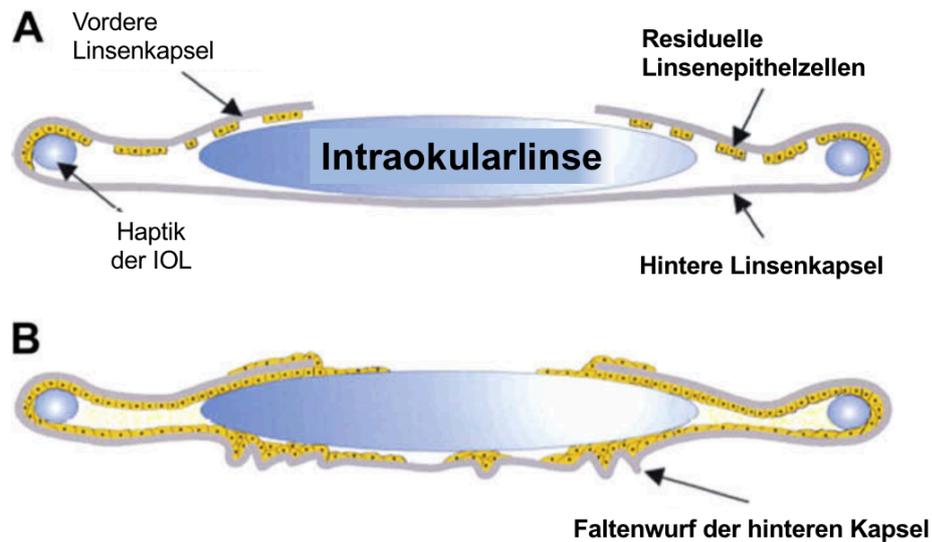


Abbildung 7 Entwicklung des Nachstars

Nach Einbringen der IOL befinden sich Linsenepithelzellen an der vorderen Kapsel und in der Äquatorialregion (A). Diese wachsen im Laufe der Zeit auf die hintere Kapsel und führen zu Fibrose in der optischen Achse. Durch die Faltenbildung kommt es zur Verschlechterung des Visus. (B) Modifiziert nach Wormstone et al. 2002⁴³

3.4 Konventionelle Behandlung mit Nd:YAG-Laser

Seit den 1980er Jahren besteht die Neodym-dotierte Yttrium-Aluminium-Granat Laser-Kapsulotomie (Nd:YAG-Laser) als Methode zur Behandlung des Nachstars⁵⁴. Der Patient sitzt vor einer Spaltlampe und das Auge wird nicht chirurgisch eröffnet während mit Hilfe des Lasers ein kurzer Impuls erzeugt wird, der die hintere Linsenkapselfuge entweder zirkulär oder in Form eines „X“ spaltet und damit die optische Achse wieder freimacht. Bevor der Laser zur Verfügung stand, wurde die hintere Kapsel chirurgisch gespalten und dafür das Auge über die Cornea eröffnet⁵⁵.

Zu den insgesamt selten vorkommenden Komplikationen der Laser-Kapsulotomie gehören neben einer passageren Erhöhung des Augeninnendrucks⁵⁶ und dem Sekundärglaukom (0,8%) auch eine Netzhautablösung (0,2%), ein zystisches Makulaödem (0,2%)^{57,58} und vereinzelt beschriebene, vorübergehende Uveitiden⁵⁹.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Nd:YAG-Laser-Kapsulotomie eine verhältnismäßig sichere und unkomplizierte Methode ist, um die volle Sehkraft bei den meisten Patienten mit Nachstar wiederherzustellen.

Da aber bei der hohen Fallzahl⁶⁰ dennoch vereinzelt ernsthafte Komplikationen auftreten können, der Nd:YAG-Laser nicht überall zur Verfügung steht und sehr hohe Kosten für das Gesundheitssystem⁶¹ verursacht werden, sucht die Wissenschaft nach Lösungen, um der Nachstarbildung von vornherein vorzubeugen.

4 Möglichkeiten der Nachstarprophylaxe

4.1 Design von IOL

Verschiedene IOL haben eine unterschiedliche Auftretenswahrscheinlichkeit des Nachstars, wobei das Material eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint⁶². Beachtenswert ist, dass hydrophobes Acrylat gegenüber dem hydrophilen Acrylat, zu etwas weniger Nachstarbildung führt^{63, 64, 65}. Bei der Form der IOL gibt es allerdings beträchtliche Unterschiede. Zunächst konnte im Hasenmodell gezeigt werden, dass eine „scharfe Kante“ der IOL dazu führt, dass sich die hintere Linsenkapsel eng um die Kante der IOL schlägt und damit die Linsenepithelzellen daran hindert zum posterioren Linsenpol zu wandern und somit der Nachstar verhindert oder zumindest verlangsamt wird^{66, 67}. Mehrere klinische Studien und Metaanalysen haben diese Annahme bestätigt^{68, 69}.

4.2 Operationstechnik

Auch die Operationstechnik hat einen Einfluss auf die Entwicklung des Nachstars⁷⁰. Da die verbleibenden LEC und die posteriore Kapsel die Grundlagen der Nachstarbildung⁷¹ sind, zielen alle chirurgischen Ansätze darauf ab, die LEC möglichst vollständig zu entfernen. Eine durchgehende zirkuläre Kapsulorhexis zur Eröffnung der vorderen Linsenkapsel ist am wenigsten mit der Entstehung eines Nachstar vergesellschaftet^{72,73}. Die sogenannte „Cortical Cleaving Hydrodissection“ in Kombination mit einer Rotation der IOL im Kapselsack reduziert zwar die Anzahl der residuellen LEC und der Linsenfasern signifikant, aber ein direkter Effekt auf die Entstehung des Nachstar ist nicht nachweisbar^{74,75}. Das „Sealed Capsule Irrigation Device“, eine Vorrichtung zur Spülung des Kapselsacks mit destilliertem Wasser, bringt eine signifikante Reduktion der Nachstarrate durch das Absterben von Linsenepithelzellen, allerdings verlängert dies die Operationsdauer, da das Wasser drei Minuten einwirken muss⁷⁶. Das

alleinige Polieren der Linsenkapsel bringt keine Reduktion der Nachstarrate mit sich⁷⁷.

Die genannten chirurgischen Maßnahmen führen allerdings alle nur zu einer Verzögerung oder Verminderung des Nachstars und können ihn nicht komplett verhindern. Es gibt zwei Operationstechniken, die die Entwicklung eines Nachstars komplett ausschalten, indem die hintere Kapsel als Wachstumssubstrat für die Epithelzellen zerstört wird. Zum einen das Bag-in-the-lens Prinzip⁷⁸ und zum anderen die posteriore Kapsulorhexis⁷⁹. Diese Techniken sind zwar effektiv, aber sie werden aufgrund der längeren Operationszeit und der Gefahr von Glaskörper- und Netzhautverletzungen nur selten genutzt, und dann vor allem bei pädiatrischen Kataraktpatienten⁸⁰.

4.3 Pharmakologische Nachstarprophylaxe

Pharmakologische Nachstarprophylaxe bedeutet, den Nachstar schon vor dessen Entstehung durch den Einsatz von Medikamenten aufzuhalten. Bereits seit den 1970er Jahren wird versucht die Entwicklung des Nachstars mit Hilfe von Pharmaka zu verhindern⁸¹. Die meisten Stoffe, die seither getestet wurden sind entweder, wie 5-FU, toxisch oder wirkungslos⁸¹.

Wie oben bereits herausgearbeitet, sind residuelle LEC und deren Aktivierung zur EMT der Auslöser für die Ausbildung eines Nachstars. Die pharmakologische Nachstarprophylaxe zielt darauf ab, die Anzahl der LEC medikamentös zu reduzieren und die EMT und die begleitenden Prozesse wie Migration, Proliferation und Kontraktion zu verhindern und damit die Wundheilungsreaktion zu modulieren⁷⁰. Ein möglicher Ansatzpunkt ist hier, wie bereits erwähnt der EGF-Rezeptor⁸².

Dabei sind verschiedene Applikationswege, wie die systemische Gabe, topische Augentropfen⁸³, intraokuläre Injektionen⁸⁴ und die intraoperative Spülung des Kapselsacks mit dem Pharmakon⁸⁵, denkbar und bereits versucht worden.

Eine wichtige Grundlage für die Wahl eines Verfahrens ist, dass es möglichst sicher, also nicht toxisch für die umliegenden Gewebe, und einfach ist. Auch die Biokompatibilität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik müssen für den Zweck

angemessen sein⁸¹. Aus diesen Überlegungen heraus richtet sich nachfolgend der Fokus auf die IOL als Medikamententräger, da der Wirkstoff ohne zusätzlichen Operationsschritt appliziert wird und die Verteilung im Gegensatz zu den anderen Methoden sehr kontrolliert erscheint⁸⁶.

4.4 Die IOL als Medikamententräger

Die Idee, die Intraokularlinse als Medikamententräger in der Behandlung des Nachstars zu verwenden liegt nahe. Hierzu gab es bereits einige Ansätze. Daunorubicin modifizierte IOL führten im Hasenaugen allerdings zum cornealen Endothelzellverlust und waren damit nicht zufriedenstellend⁸⁷. Dass sich IOL allgemein zur Applikation von Medikamenten eignen, konnte für die postoperative Antibiotikaphylaxe ebenfalls am Hasenaugen gezeigt werden, nachdem mehrere Stunden nach Applikation noch erhöhte Spiegel von Flurcinnolon nachgewiesen werden konnten⁸⁸.

Auch in der Nachstarprophylaxe scheint die pharmakologische IOL-Modifikation ein vielversprechender Weg zu sein. An die IOL gebundenes FGF2-Saporin konnte im Hasenaugen das Bewachsen des Kapselsacks mit LEC verhindern⁸⁹. Im humanen Kapselsack gelang der Wirksamkeitsnachweis mit Thapsigargin-beschichteten IOL⁹⁰. Besonders interessant an der pharmakologisch modifizierten IOL ist, dass die Hemmung des Nachstars direkt am Entstehungsort durch einen topischen Medikamententräger und ohne zusätzlich notwendige Operationsschritte erfolgt⁹¹. Mit Celecoxib beschichtete IOL konnten die Entwicklung eines Nachstars im Hundekapselsack ex vivo deutlich hinauszögern⁹². Auch Rapamycin wurde mit dem Linker-Molekül PLGA erfolgreich im Tiermodell zur Nachstarprophylaxe eingesetzt⁹³. Alkylphosphokoline als IOL-Beschichtung mindern in vitro und im humanen Kapselsackmodell das Linsenepithelzellwachstum ohne dabei toxisch für humane Cornea zu sein^{94, 95}.

Zur Modifikation von IOL mit pharmakologischen Substanzen gibt es drei grundlegende Methoden⁸⁶ (vgl. Abbildung 8).

Beim Coating werden die Pharmaka auf die Oberfläche der IOL aufgetragen. Ein Beispiel hierfür sind Heparin-IOL, die schon in klinischen Studien angewendet wurden um okuläre Reizzustände zu behandeln⁹⁶, aber bei der Nachstarrate keine

signifikanten Unterschiede zeigten⁹⁷. Beim Soaking werden die IOL für eine definierte Zeit in das Pharmakon eingelegt, damit dieses ein Reservoir in der IOL bilden kann. Ein Beispiel hierfür ist die mit Erofusin beladene IOL, die die Entwicklung eines Nachstars im humanen Kapselsackmodell signifikant reduzieren konnte⁹⁵. Eine weitere Möglichkeit ist die Modifikation der Haptik. Ein Beispiel hierfür ist die mit einem Antibiotika-Hydrogel beladene IOL-Haptik. Diese zeigt in vitro eine zuverlässige Freisetzung des Stoffes in Abhängigkeit von der Menge des Gels in wirksamen Konzentrationen und im Hasenmodell ausreichende Wirkstoffkonzentrationen für mehrere Wochen bei guter Biokompatibilität⁹⁸.

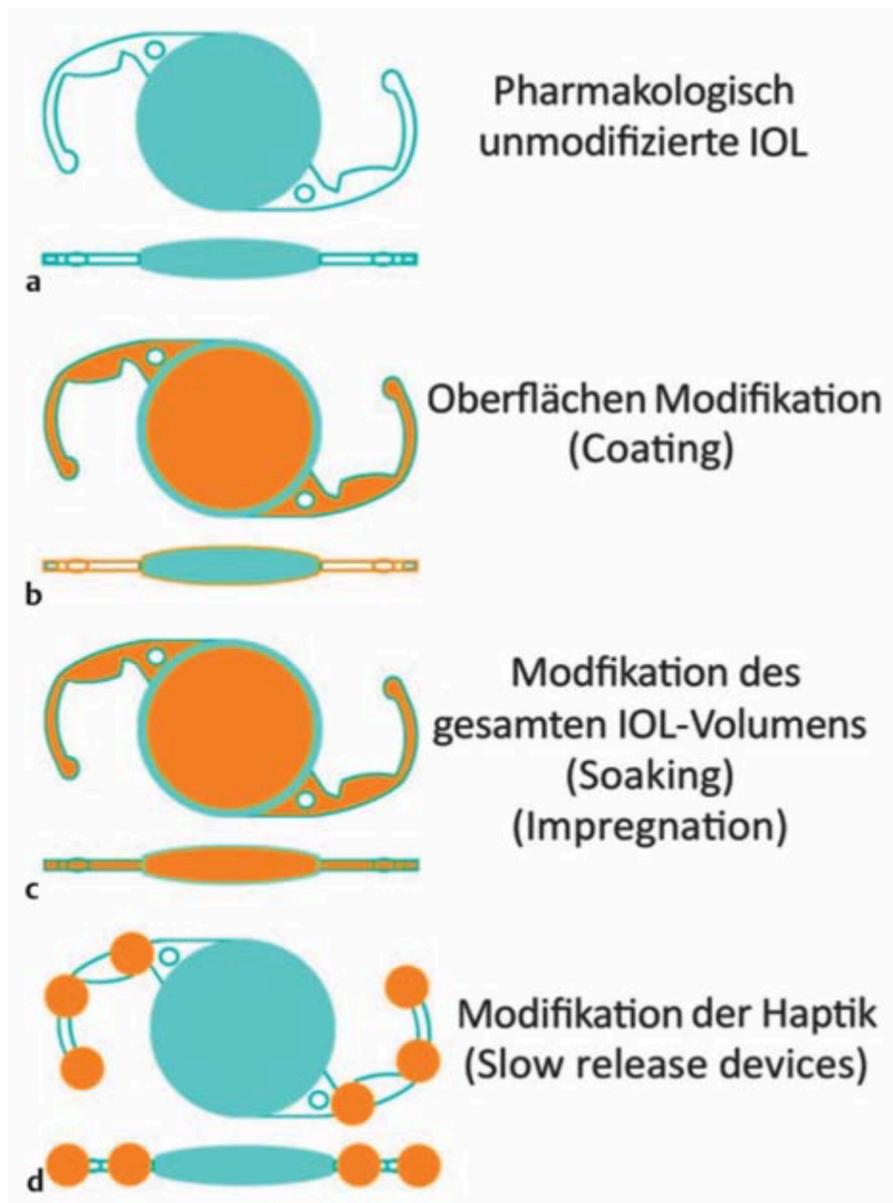


Abbildung 8 Möglichkeiten der IOL-Modifikation

Gezeigt sind eine unmodifizierte IOL (a) im Vergleich zum Coating (b), bei dem eine reine Oberflächenmodifikation stattfindet, dem Soaking (c), das die gesamte IOL betrifft und der Haptikmodifikation (d), bei der der optische Teil der IOL unverändert bleibt, während das Pharmakon an der Haptik lokalisiert ist. Nach Eibl et al.⁸⁶

II ZIELSETZUNG & HYPOTHESENFORMULIERUNG

Ziel der vorliegenden Studie war es, herauszufinden, ob sich mit EGF-Rezeptor-Inhibitoren beladene Intraokularlinsen zur Prävention des Nachstars eignen können ohne schädigend auf das corneale Endothel zu wirken.

Dies geschah vor allem vor dem Hintergrund, dass die Implantation von Intraokularlinsen bei Katarakt einer der am häufigsten durchgeführten Operationen ist^{11, 12} und die häufigste postoperative Komplikation die Ausbildung eines Nachstars ist⁴³. Aus ökonomischen Gründen sollte Nachstarprävention möglichst ohne Verlängerung der Operationsdauer und ohne zusätzlichen Aufwand möglich sein. In Anbetracht dieser Tatsachen erscheint die pharmakologische Modifikation von IOL zur Nachstarprophylaxe optimal, da sie die chirurgische Routine so nicht verändert wird und die Medikamente topisch, direkt am Ort der Pathogenese des Nachstars, wirken können ohne schädliche Nebenwirkungen zu entfalten. Nachdem EGFR-Inhibitoren schon in Vorarbeiten der Gruppe als potentiell wirksam identifiziert wurden, sollte im Rahmen dieser Arbeit die IOL als Applikationsmechanismus genauer evaluiert werden.

Aus diesem Grund wurden mit Erlotinib und Gefitinib modifizierte IOL sowohl in Zellkultur in einem Vorderaugenabschnittsmodell, als auch in dem humanen ex vivo Kapselsack-Modell evaluiert, um die Effekte auf die Entwicklung des Nachstars zu untersuchen.

Folgende Hypothesen werden im Rahmen dieser Arbeit überprüft:

1. Medikamentenfreisetzende IOL hemmen das Wachstum von Linsenepithelzellen im Vorderaugenabschnittsmodell.
2. Medikamentenfreisetzende IOL hemmen die Entstehung eines Nachstars im humanen Kapselsackmodell.
3. Medikamentenfreisetzende IOL setzen wirksame Konzentrationen des EGF-Rezeptor-Inhibitors über einen längeren Zeitraum frei.
4. Die freigesetzten Konzentrationen des Pharmakons wirken nicht toxisch für humanes Corneaendothel

III MATERIAL UND METHODEN

1 Zellkultur

1.1 Zelllinie FHL 124

Für Versuche zur Proliferation von Linsenepithelzellen wurde die humane Linsenepithelzelllinie FHL 124 verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Michael Wormstone^{99, 100} PhD, Norfolk, Vereinigtes Königreich). Die Zelllinie FHL 124 zeichnet sich durch eine hohe Homologität aus, die eine 99,5%ige Übereinstimmung der Genexpression in der RT-PCR von 22270 untersuchten Genen mit primären humanen Linsenepithelzellen zeigt und damit die natürliche Situation im menschlichen Auge bestmöglich nachahmt. Auch phänotypische Marker von Linsenepithelzellen wie alphaA-Kristallin und pax6 werden exprimiert^{52,101-103}.

1.2 Zelllinie CEC-SV40

Die corneale Endothelzelllinie HCEC-SV40¹⁰⁴ (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Jaroslav Bednarz, Hamburg, Deutschland) wurde für Untersuchungen der Toxizität an humanen cornealen Endothelzellen (HCEC) verwendet. Außer einer erhöhten Proliferationsrate erhalten die HCEC ihre charakteristischen Eigenschaften und ebenso das typische kopfsteinpflasterartige Wachstumsmuster¹⁰⁴.

1.3 Zell- und Gewebekultivierung

Die Zelllinien FHL 124, CEC-SV40, sowie die humanen Kapselsäcke wurden in MEM-Earles (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) kultiviert. Die Gewebe wurden unter üblichen Zellkulturbedingungen in einem Inkubator (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei 37°C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5% kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Dabei wurden die Zellen regelmäßig unter einem Lichtmikroskop vom Typ Leica DM IL (Leica AG, Wetzlar, Deutschland) beobachtet und bei konfluentem Zellrasen subkultiviert. Die humanen Kapselsäcke wurden regelmäßig unter einem Stereomikroskop Stemi 208 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) beobachtet und repräsentative Bildaufnahmen angefertigt. Das Zellkulturmedium (MEM Earls,

Biochrom AG, Berlin, Deutschland), wurde mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 50IU Penicillin/ml und 50µg Streptomycin/ml (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) angereichert.

2 Erlotinib

Erlotinib¹⁰⁵ (Tarceva®, OSI-774, Fa. Roche) wurde als Pulver (LC Laboratories, Woburn, Massachusetts, USA) aufgelöst und als 30µM-Lösung, im Folgenden USS, Unsaturated Soaking Solution, genannt, und als übersättigte Lösung (1mM) in PBS (Phosphate buffered saline) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), im Folgenden SSSS, Supersaturated Soaking Solution, genannt, benutzt. Für Liberationsversuche wurde Erlotinib in Ultra Pure Water (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gelöst.

3 Gefitinib

Gefitinib, ein spezifischer Inhibitor des EGF-Rezeptors^{106, 126} (Iressa®, ZD-1839, Fa. Astra Zenecca) wurde als Pulver (LC Laboratories, Woburn, Massachusetts, USA) in einer Konzentration von 50µM^{107, 108} in PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gelöst. Die Löslichkeit in Wasser liegt bei etwa 60µM¹⁰⁹ reicht aber aus, um wirksame Konzentration zu erreichen und damit PBS als untoxisches Lösungsmittel verwenden zu können.

4 Intraokularlinsen

4.1 Hydrophile Intraokularlinsen

Stellvertretend für die Gruppe der hydrophilen IOL wurden einteilige IOL (Rayner Intraocular Lenses Ltd., West Sussex, Großbritannien) aus dem Material *Rayacryl*® (2-hydroxyethyl methacrylate/methyl methacrylate copolymer), dessen Wassergehalt im Gleichgewichtszustand 25.5% beträgt, verwendet. Der refraktive Index des Materials beträgt 1.46 (vgl. FDA Device Approval Nr. P060011 vom 11.05.2007). Der Durchmesser der Linsen betrug 5.75mm, der Gesamtdurchmesser 12.7mm. Die IOL entstammten derselben Charge und ihre Brechkraft lag zwischen +16.0 dpt und +21.0 dpt In den Graphen werden diese IOL mit Phi angegeben.

4.2 Hydrophobe Intraokularlinsen

Stellvertretend für die Gruppe der hydrophoben IOL aus Acryl wurden dreiteilige IOL (Hoya AG, Tokio, Japan) verwendet. Die C-Loop-Haptik der IOL besteht aus PMMA. Der optische Teil der IOL besteht aus hydrophoben Acrylat, dessen Wassergehalt bei weniger als 0.35% liegt. Der refraktive Index des Material beträgt 1.516^{110} . Der Durchmesser der Linsen betrug 6.0mm, der Gesamtdurchmesser 12.5mm. Die IOL entstammten derselben Charge und ihre Brechkraft lag zwischen +18.0 dpt und +20.5 dpt. In den Graphen werden diese IOL mit Pho angegeben.

4.3 Hydrophile Intraokularlinsen mit hydrophober Oberfläche

Stellvertretend für die Gruppe der hydrophilen IOL mit hydrophoben Oberflächeneigenschaften aus Acrylat wurden einteilige IOL (CarlZeiss Meditec AG, Jena, Deutschland) mit Plattenhaptik verwendet. Die IOL bestehen aus einem hydrophilen Acryl mit einem Wassergehalt im Gleichgewichtszustand von 25% und verfügen über eine hydrophobe Oberfläche. Der Durchmesser der Optik beträgt 6.0mm, der Gesamtdurchmesser beträgt 11.0mm (vgl. Zeiss Datenblatt). Die IOL entstammten derselben Charge und ihre Brechkraft lag zwischen +15.5 dpt und +22.0 dpt. In den Graphen werden diese IOL mit PhoPhi angegeben.

5 Pharmakologische Linsenmodifikation

Die IOL wurden für 72 Stunden unter sterilen Bedingungen in einem luftdichten Behälter (Nunc 12-Well-Platte, *ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) bei Raumtemperatur in eine Lösung des Medikaments beziehungsweise in PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) zur Kontrolle eingelegt und vor Implantation ins Vorderaugenabschnittsmodell oder in das humane Kapselsackmodell mehrfach mit PBS gespült. Im Sinne des IOL-Soakings⁹¹ soll damit möglichst viel Wirkstoff aufgenommen werden, der danach über einen längeren Zeitraum abgegeben werden kann (Abbildung 9).

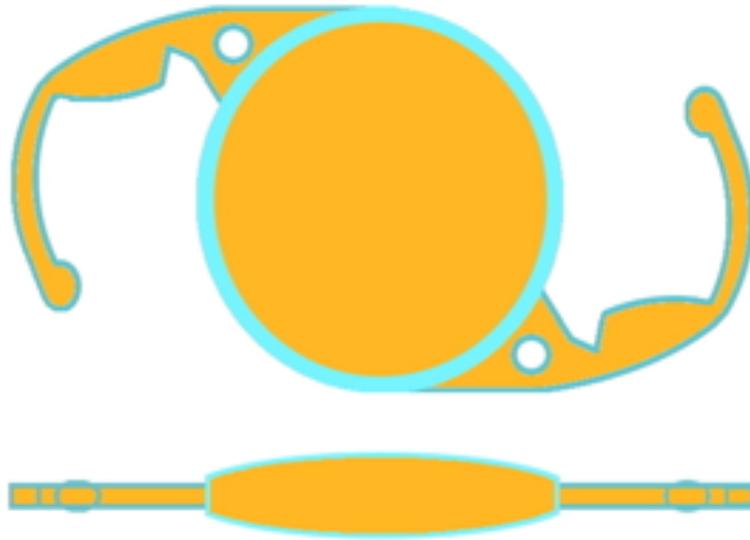


Abbildung 9 IOL-Modifikation

Die IOL wird in das Medikament (gelb) eingelegt, so dass dieses möglichst überall am IOL-Material akkumuliert. (nach Eibl et al.)⁸⁶

6 Liberationsbestimmung von Erlotinib aus der IOL

Die mit Erlotinib modifizierten IOL (SSSS) wurden in 1ml Ultra Pure Water (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gelegt und unter Zellkulturbedingungen inkubiert, um die physikalischen Bedingungen im Auge zu simulieren. Über 14 Tage wurde die IOL täglich in ein neues Behältnis mit wiederum 1ml Ultra Pure Water überführt und die so gewonnene Lösung der vorangegangenen 24 Stunden wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Die Konzentration von Erlotinib in der abgenommenen Flüssigkeit wird mit Hilfe der Spektralphotometrie¹¹¹ bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in 96-Well-Platten (Nunc 96-well, *ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) unter Benutzung eines Spectramax 190 Photometers (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA). Das Absorptionsmaximum beträgt 343nm für Erlotinib. Über Lösungen mit bekannter Stoffmenge wurde mittels linearer Regression eine Eichgerade bestimmt, mit deren Hilfe anschließend die Konzentration der Proben gemessen werden konnte.

Das Experiment wurde für den hydrophilen und den hydrophoben Linsentyp vier Mal wiederholt. Über die so bestimmte Absorption wird die gemessene Konzentration von Erlotinib im Trägermedium über die Zeit hinweg erfasst, so dass Aussagen zur Abgabegeschwindigkeit gemacht werden können. Messwerte außerhalb des validierten Bereichs wurden nach Verdünnung bestimmt.

7 Vorderaugenabschnittsmodell

Pharmakologisch behandelte IOL wurden in einem modifizierten Vorderaugenabschnittsmodell nach Gotoh¹¹² getestet (Abbildung 10).

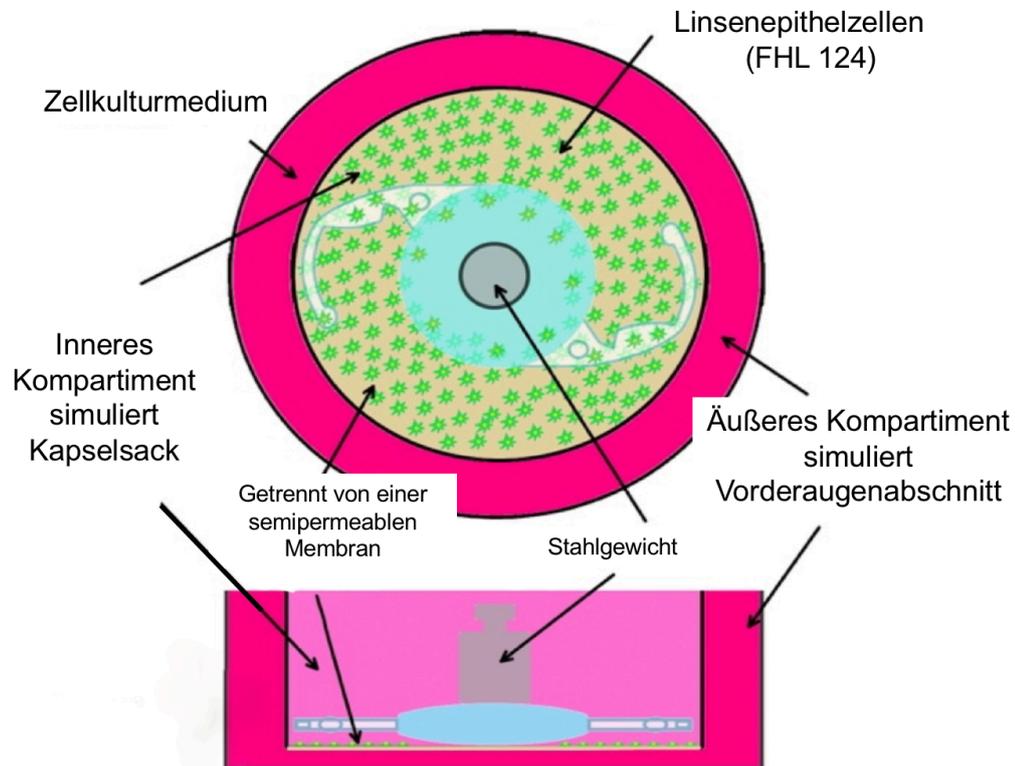


Abbildung 10 Vorderaugenabschnittsmodell

Stilisierte Darstellung des Vorderaugenabschnittsmodells nach Gotoh¹¹²

Die behandelten und die Kontroll-IOL wurden auf die Oberfläche eines Zellkultureinsatzes mit porösem Folieneinsatz (Falcon, 1.0µm, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gelegt und mit einem 1g schweren Edelmetallgewicht (Haefner, Oberrot, Deutschland) fixiert um eine bessere Anhaftung der IOL auf der Membran zu erreichen.

Der Zellkultureinsatz wird anschließend in eine passende 12-Well-Platte (Nunc Falcon, 12-Well-Platte, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gestellt und die untere Kammer mit Zellkulturmedium gefüllt, bis auch die obere Kammer mit IOL durch die Poren mit Medium bedeckt ist. Die poröse Membran

fungiert dabei als hintere Linsenkapself, die untere Kammer stellt das verbleibende Auge dar. FHL-124 Zellen werden an den äußeren Rand der IOL ausgesät. Diese Zellen migrieren dann, wie LEC im Kapselsack nach Kataraktoperation, vom Rand in die Mitte unter die IOL. Dies simuliert die natürliche Situation im menschlichen Auge¹¹³. Die Fläche des Zellrasens unter der IOL dient dabei als Indikator für Zellwachstum. Nach 72 Stunden wurden die Linsen aus dem Vorderaugenabschnittsmodell entnommen, die Membranen mit Hilfe einer üblichen Kristallviolett-Färbung¹¹⁴ gefärbt und anschließend mit Kaiser's glycerol Gelatine (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) auf Objektträgern fixiert. Mit einer Canon EOS 5D MARK III (Canon Inc., Tokyo, Japan) und einem EF 100 mm/2,8 L Macro IS USM Objektiv (Canon Inc., Tokyo, Japan) wurden mit 10cm Abstand Fotos aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ64 1.48V^{115, 116} (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) indem die gesamte Membranfläche und die mit Zellen bewachsene Oberfläche automatisch, über RGB-Stacks und einem Threshold von 7%, ausgemessen wurden. Das heißt, dass alle Pixel, die heller als ein definierter Schwellenwert von 7% sind, als angefärbt und damit als von Zellen bewachsen zählen.

Jedes Experiment wurde jeweils mit hydrophoben IOL, hydrophilen IOL und hydrophilen IOL mit hydrophober Oberfläche vier Mal durchgeführt, wobei jeweils zwei Kontrollen parallel in jeder Passage getestet wurden.

8 Humanes Kapselsackmodell

Bei den humanen ex- vivo Präparaten handelt es sich Spenderaugen (Alter der Spender 20-78 Jahre, mittleres Alter 63 Jahre), die in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki¹¹⁷ für die Forschung und unter Einhaltung eines Ethikantrags an der medizinischen Fakultät (MUC 734-16) bereitgestellt wurden, nachdem die Cornea zu Transplantationszwecken entfernt wurde.

Die Präparation erfolgte unter einem Operationsmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) analog zur Kataraktoperation.

Liu et al.¹¹⁸ beschreiben die Präparation wie folgt:

1. Entfernung der Corneoskleralscheibe für die Transplantation durch die Hornhautbank
2. Entfernung der Iris:
Die Iris wird mit Hilfe einer Schere nach Clayman-Westcott (Bausch+Lomb, Rochester, New York, USA) radial inzidiert und entfernt.
3. Kapsulorhexis:
Im nächsten Schritt wird mit einer schnabelförmig gebogenen Injektionskanüle (B.Braun, Melsungen, Deutschland) die vordere Linsenkapsel punktiert. Die entstandene Lefze wird anschließend im Sinne einer Kapsulorhexis radial gezogen, bis eine Öffnung in der vorderen Linsenkapsel entstanden ist, deren Durchmesser in etwa zwei Drittel des Radius der Kapsel entspricht.
4. Hydrodissektion
Danach werden mit einer gebogenen stumpfen Kanüle (B.Braun, Melsungen, Deutschland) einige Milliliter PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) zur Hydrodissektion der Linse eingespült. Dabei wird die Linse durch den intrakapsulären Überdruck aus ihrer Kapsel gedrückt. Der verbleibende Rindenkortex wird mit einer stumpfen Pinzette (Bausch+Lomb, Rochester, New York, USA) aus dem Kapselsack entfernt.
5. Implantation der IOL in den leeren Kapselsack
6. Abtrennung des Kapselsacks an den Zonulafasern

Nun wird der Kapselsack in eine Zellkulturschale (*Nunc, 6-well Platte*, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) überführt und zentriert. Der Kapselsack wird dann mit entomologischen Nadeln (Black insect pins, Größe 00, Firma EntoSphynx, Pardubitz, Tschechien) fixiert und gespannt.

Anschließend werden die Kapselsäcke in Medium kultiviert, täglich beobachtet und das Medium wird jeden zweiten Tag gewechselt. Sobald der Zellrasen die Mitte der IOL erreicht hatte, wurde die Zeit notiert und repräsentative Fotos wurden aufgenommen. Um diese Aufnahmen (Abbildung 11) anzufertigen, wurden jeweils ein Paar Spenderaugen mit 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) fixiert, sobald die Kontrolle konfluent war. Alle anderen Augenpaare wurde bis zur Konfluenz des Kapselsacks beobachtet, der mit der Erlotinib oder Gefitinib-modifizierten-IOL versorgt war.

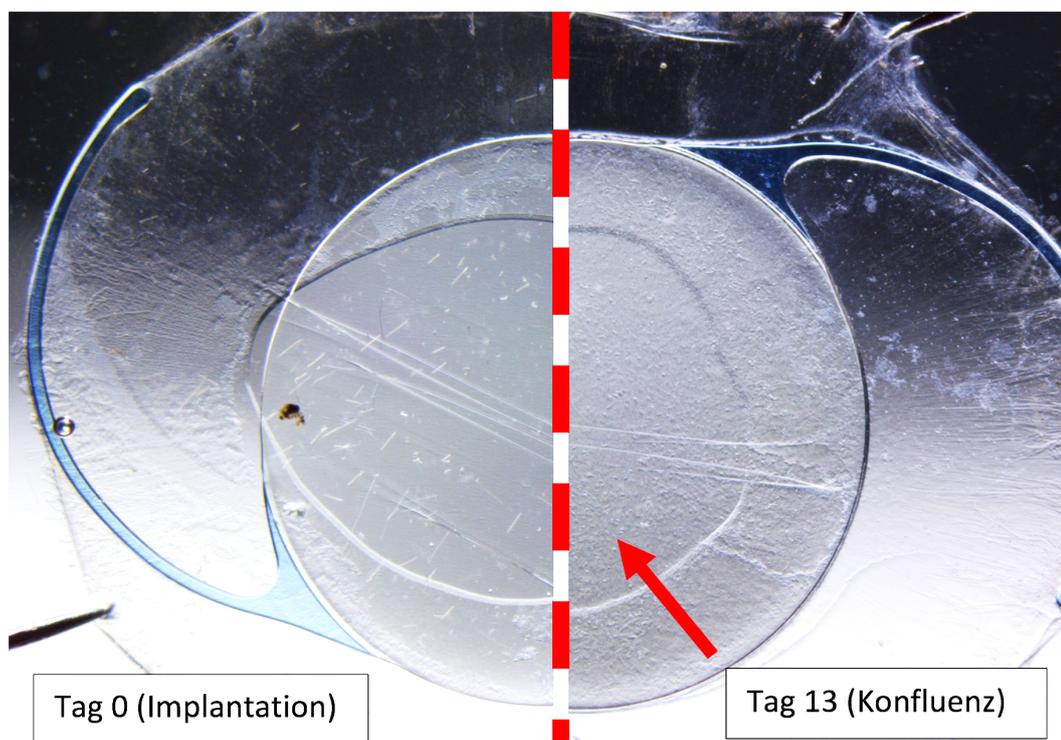


Abbildung 11 Humanes Kapselsackmodell – Beispielfotografie

Links ist die IOL gerade frisch in den Kapselsack implantiert worden. In der Mitte der IOL sind keine Zellen zu sehen. Rechts sind die Linsenepithelzellen (Pfeil) bis in die Mitte des Kapselsacks gewachsen.

9 Toxizität an cornealen Endothelzellen

Um jegliche potentielle Schädigung der cornealen Endothelzellschicht, der von der IOL freigesetzten Konzentrationen von Gefitinib und Erlotinib auszuschließen, wurden CEC-SV40 Zellen bis zu einem konfluenten Zellrasen in einer 12-Well Platte (*Nunc 12-well, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) kultiviert und anschließend 24 Stunden serumfrei gehalten. Analog zum Vorderaugenabschnittsmodell wurden poröse Zellkultureinsätze in die 12-Well-Platte gesetzt und mit einer modifizierten (Gefitinib oder SSSS) oder Kontroll-IOL beladen, so dass die IOL über den Endothelzellen zum Liegen kommt und der Wirkstoff frei zu den Zellen diffundieren kann. Nach 72 Stunden Kontakt zwischen Linse und Endothelzellen wurde der kolorimetrische XTT-Assay, wie von Scuderio et al.¹¹⁹ beschrieben, durchgeführt um das Zellüberleben zur bestimmen. Zusammengefasst sind nur stoffwechselaktive Zellen in der Lage, das XTT (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) in das orangefarbene Formazan umzuwandeln. Dieser Vorgang kann durch eine Absorptionsmessung bei 450nm im Spectramax 190 Photometer (*Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA*) objektiviert werden. Zellverlust spiegelt sich in einer Farbveränderung gegenüber der Kontrolle wider.

10 Statistische Analyse

Der statistische Vergleich zwischen den verschiedenen Prüfgruppen und der Kontrolle erfolgte unter Verwendung einer ANOVA und bei mehr als zwei Gruppen einem Bonferroni post-hoc Test zur Inter-Gruppen-Analyse. $p < 0.05$ wurde für alle Analysen als signifikant angenommen und ein 95%-Konfidenzintervall angegeben. Für einen Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Alle Graphen wurden, solange nicht anders angegeben, mit Microsoft Excel 2016 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) erstellt, und zeigen die Standardabweichung als Fehlerbalken. Jegliche statistische Analyse erfolgte mit SPSS 23 (IBM, Armonk, New York, USA).

IV ERGEBNISSE

1 Liberation von Erlotinib aus der IOL

Die Messungen zeigen, dass die medikamententragende IOL über einen Zeitraum von mehreren Tagen Wirkstoff abgeben kann. Es ergibt sich die, in Abbildung 12 gezeigte, Liberationskinetik. Besonders in den ersten drei Tagen ist die abgegebene Stoffmenge besonders hoch.

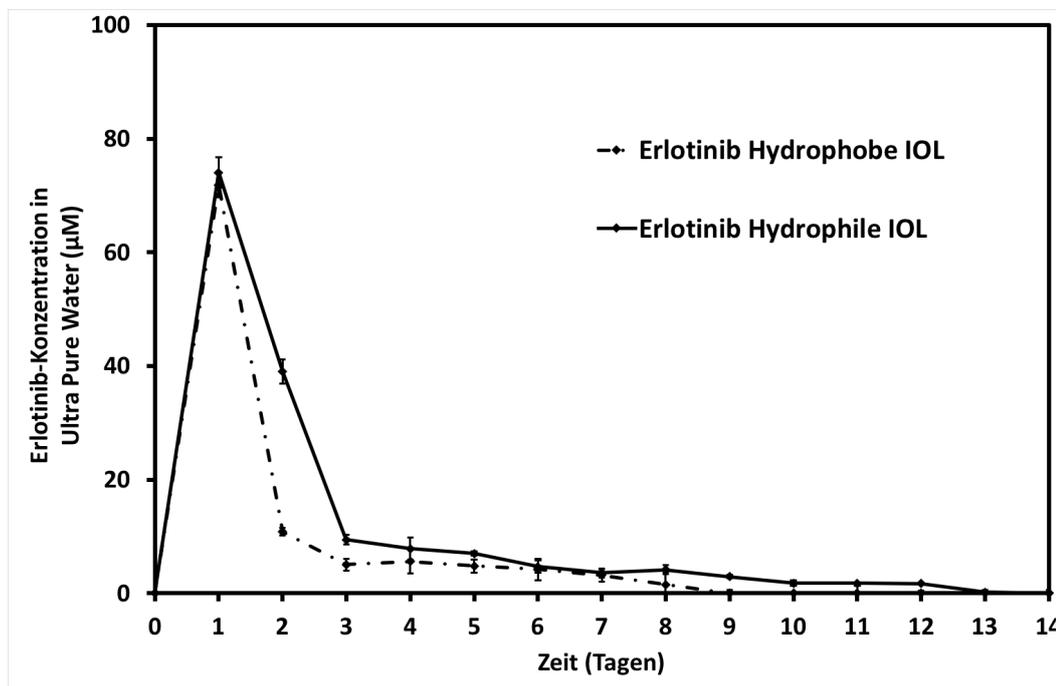


Abbildung 12 Erlotinibliberation aus IOL über 14 Tage

Nach einem Maximum am ersten Tag fällt die Abgabe von Erlotinib sehr schnell auf ein Niveau von ca. $10\mu\text{M}$ ab, was in etwa der IC_{50} entspricht. Dieses Niveau wird von der hydrophilen IOL über etwa 8 Tage gehalten und fällt dann langsam ab. Nach 14 Tagen ist kein Wirkstoff mehr nachweisbar. Die hydrophoben IOL fallen deutlich schneller ab und geben bereits nach 9 Tagen keinen Wirkstoff mehr ab.

2 Vorderaugenabschnittsmodell

2.1 Vorderaugenabschnittsmodell mit Erlotinib-modifizierten IOL

Die zellbedeckte Fläche (vgl. Abbildung 14) war für alle drei IOL-Typen die mit der ungesättigten Erlotiniblösung (USS) modifiziert waren im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle (Ko) (reduziert ($p < 0.001$) (vgl. Abbildung 14). Die IOL nach Modifikation mit übersättigter Erlotiniblösung (SSSS) zeigte eine noch größere Reduktion der bewachsenen Zellfläche für alle getesteten IOL-Materialien im Vergleich zur Kontrolle (Ko) ($p < 0.05$) und im Vergleich zur ungesättigten Erlotiniblösung ($p < 0.05$). Für hydrophiles Acrylat war der Unterschied zwischen USS und SSSS statistisch nicht signifikant. ($p = 0.32$)

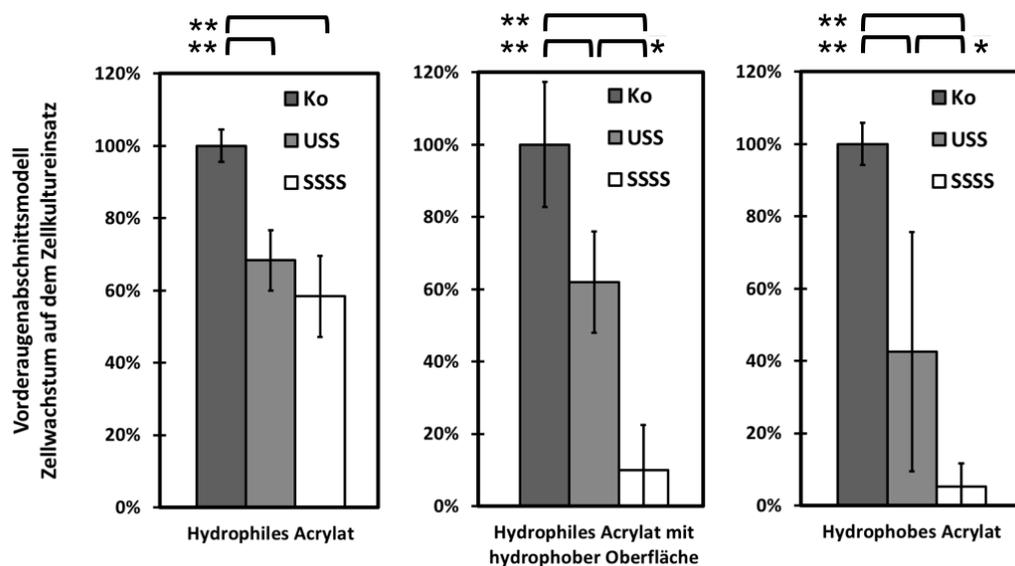


Abbildung 13 Zellwachstum im Vorderaugenabschnittsmodell mit Erlotinib

Die zellbedeckte Fläche im Vergleich zur Kontroll-IOL wurde mit ImageJ V1.49 automatisch mit Hilfe einer Farb-Threshold-Methode erfasst. Die, mit Erlotinib behandelten, IOL reduzierten das Zellwachstum erheblich ($* = p < 0.05$, $** = p < 0.001$). Das Material der IOL führte zu keinem signifikanten Unterschied.

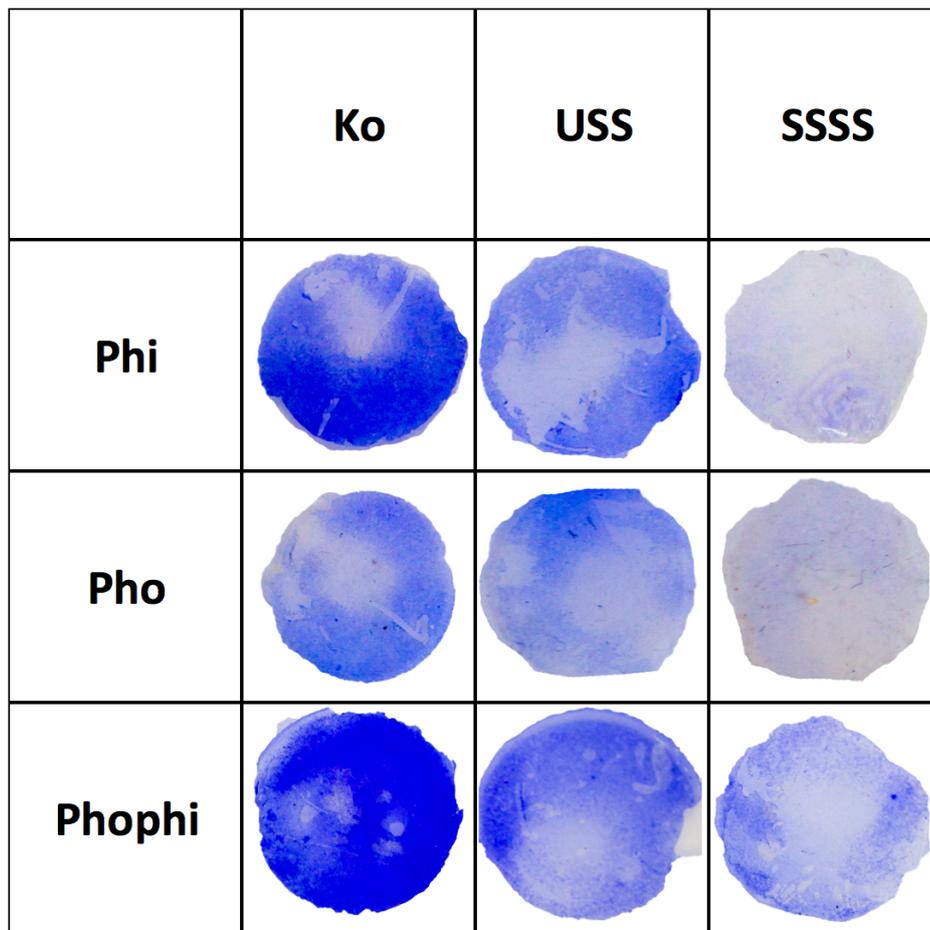


Abbildung 14 Membranausschnitte des Vorderaugenabschnittsmodells Erlotinib

Die Zellkultureinlagen aus dem Vorderaugenabschnittsmodell wurden gefärbt und fixiert. Zellen werden lila angefärbt. Je dichter der Zellrasen, desto intensiver ist die Färbung. In der Kontrolle (Ko) migrieren und proliferieren die Zellen verstärkt ins Zentrum unter die IOL, währenddessen sie dies bei den Erlotinib behandelten IOL weniger tun. Die Zelldichte bei den medikamententragenden IOL ist deutlich reduziert. Diese Ergebnisse wurden objektiviert und in Abbildung 13 gezeigt.

2.2 Vorderaugenabschnittsmodell mit Gefitinib-modifizierten IOL

Die von Zellen bewachsene Fläche (Abbildung 16) im Vorderaugenabschnittsmodell in vitro wurde gemessen. Die zellbedeckte Fläche war für alle drei IOL-Typen die mit der ungesättigten Gefitiniblösung modifiziert waren ($p < 0.001$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert (vgl. Abbildung 15).

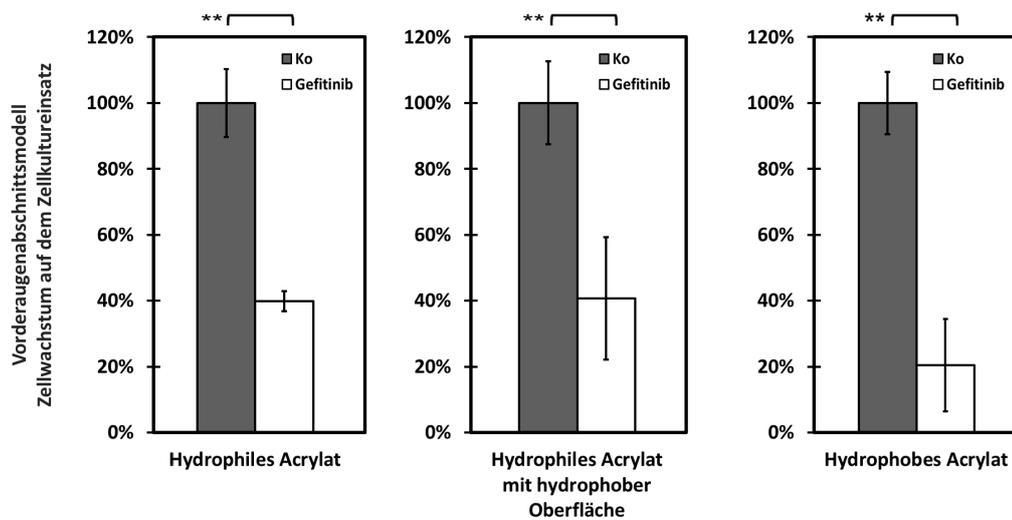


Abbildung 15 Zellwachstum im Vorderaugenabschnittsmodell mit Gefitinib

Die zellbedeckte Fläche im Vergleich zur Kontroll-IOL wurde mit ImageJ V1.49 automatisch mit Hilfe einer Farb-Threshold-Methode erfasst. Die, mit Gefitinib behandelten IOL reduzierten das Zellwachstum signifikant ($**=p < 0.001$). Das Material der IOL zeigte keinen signifikanten Unterschied.

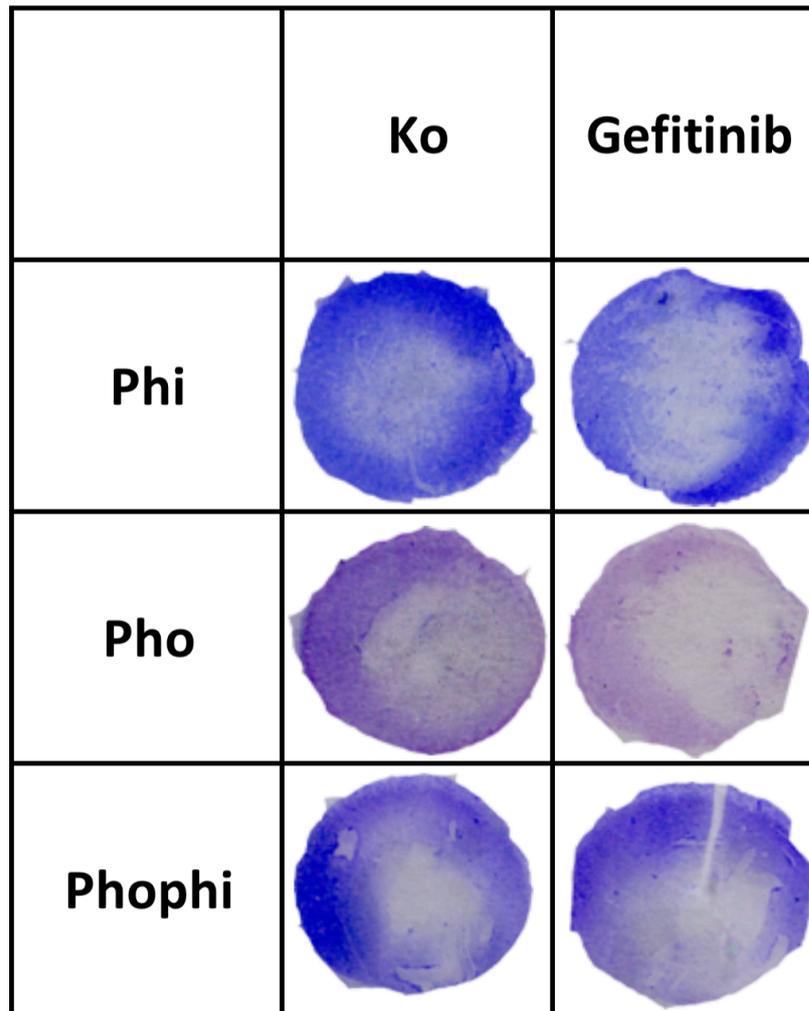


Abbildung 16 Membranausschnitte des Vorderaugenabschnittsmodells Gefitinib

Die Zellkultureinlagen aus dem Vorderaugenabschnittsmodell wurden gefärbt und fixiert. Zellen werden lila angefärbt. Je dichter der Zellrasen, desto intensiver ist die Färbung. In der Kontrolle (Ko) migrieren und proliferieren die Zellen verstärkt ins Zentrum unter die IOL, währenddessen sie dies bei den Gefitinib behandelten IOL weniger tun. Die Zelldichte bei den medikamententragenden IOL ist deutlich reduziert. Diese Ergebnisse wurden objektiviert und in Abbildung 15 gezeigt.

3 Humanes Kapselsackmodell

3.1 Humanes Kapselsackmodell mit Erlotinib-modifizierten IOL

Die durchschnittliche Anzahl an Tagen bis zur vollständigen Konfluenz der Kapselsäcke wurde gemessen (Abbildung 17). Drei unterschiedliche IOL-Materialien wurden untersucht. Die mit SSSS modifizierte Erlotinib IOL konnte die Zeit bis zum vollständigen Bewuchs der hinteren Kapsel bei jedem IOL Typ signifikant verlängern ($p < 0.001$). Hydrophile, mit Erlotinib modifizierte IOL verlängerten die Konfluenzdauer um durchschnittlich 6.2 Tage (95%-KI: 2.7-9.7 Tage), hydrophobe, mit Erlotinib modifizierte IOL verlängerten die Konfluenzdauer um Durchschnittlich 8.3 Tage (95%-KI: 4.5-12.0 Tage) und hydrophile IOL mit hydrophober Oberfläche, die mit Erlotinib modifiziert waren, verlängerten die Konfluenzdauer um durchschnittlich 7.0 Tage (95%-KI: 3.3-10.7 Tage).

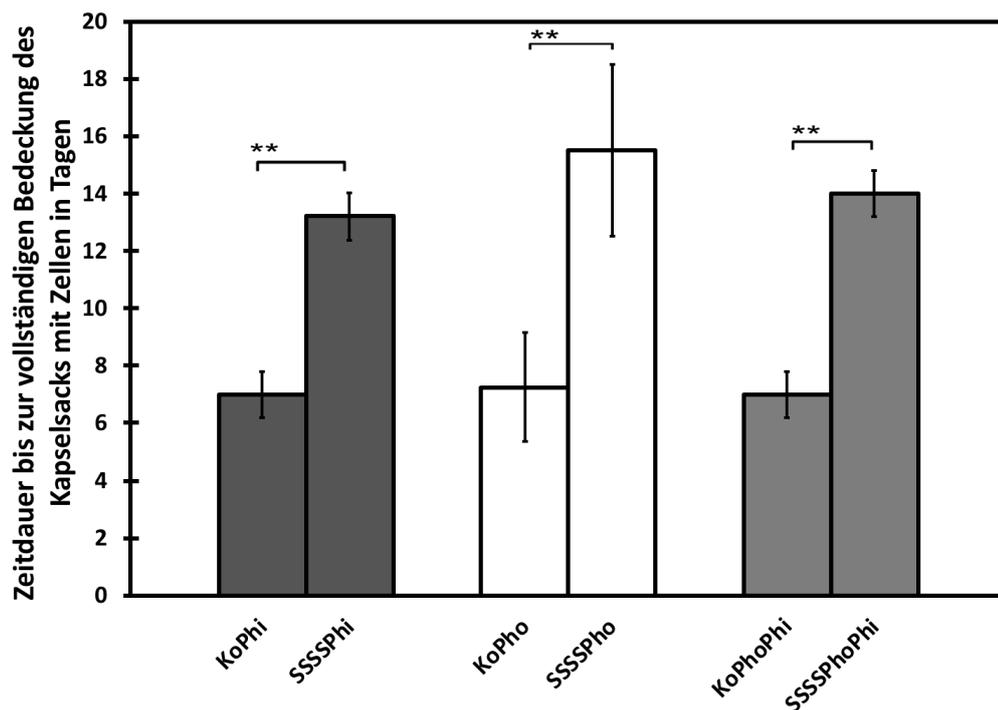


Abbildung 17 Humanes Kapselsackmodell mit Erlotinib-modifizierten IOL

Die durchschnittliche Anzahl an Tagen bis zu vollen Zellbedeckung des Kapselsacks und die Standardabweichung sind für humane Kapselsäcke ($n=24$) mit Erlotinib-IOL (SSSS) und mit Kontroll-IOL (Ko) aufgetragen. Drei unterschiedliche IOL-Materialien wurden untersucht. (**= $p < 0.001$)

3.2 Humanes Kapselsackmodell mit Gefitinib-modifizierten IOL

Die hydrophile, mit Gefitinib modifizierte IOL verlängerte die Zeit bis zur Konfluenz um durchschnittlich 6.4 Tage (95%-KI: 5.2-7.4 Tage). Die hydrophobe, mit Gefitinib modifizierte IOL verlängerte die Zeit bis zur vollständigen Konfluenz des Kapselsacks um durchschnittlich 7.0 Tage (95%-KI: 5.9-8.1 Tage) (Abbildung 18)

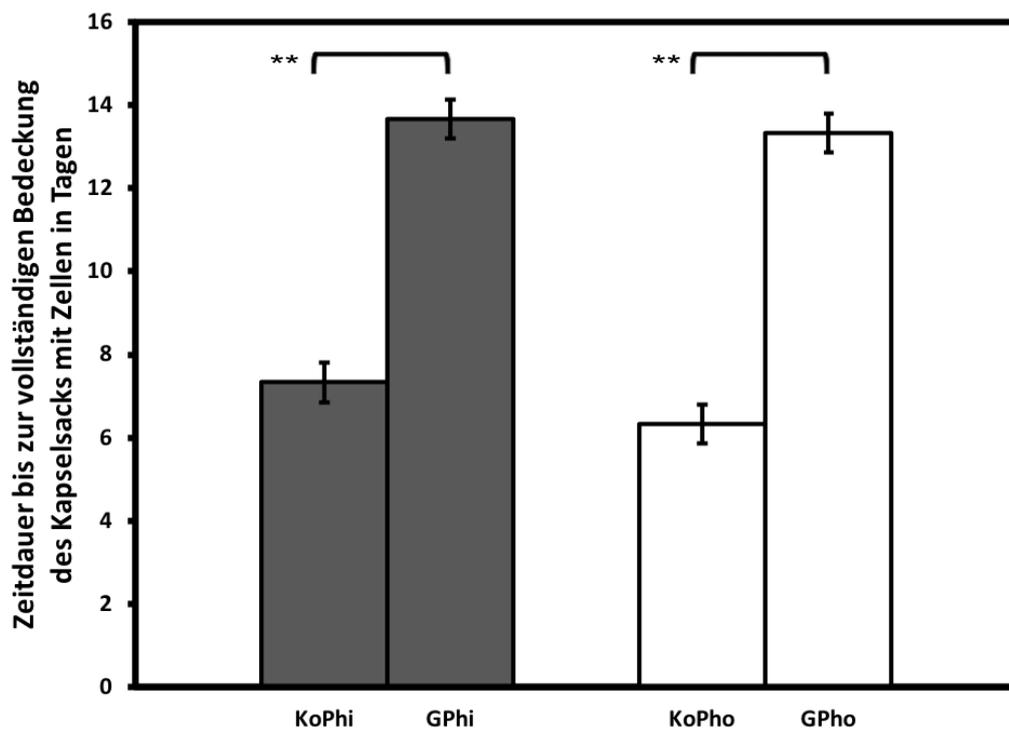


Abbildung 18 Humanes Kapselsackmodell mit Gefitinib-modifizierten IOL

Die durchschnittliche Anzahl an Tagen bis zu vollen Zellbedeckung des Kapselsacks und die Standardabweichung sind für humane Kapselsäcke (n=12) mit Gefitinib-IOL (G) und mit Kontroll-IOL (Ko) aufgetragen. Zwei unterschiedliche IOL-Materialien wurden untersucht. (**=p<0.001)

4 Toxizitätsbestimmung von EGFR-Inhibitoren an Corneaendothelzellen

4.1 Toxizität von Erlotinib-modifizierten IOL an cornealen Endothelzellen

Erlotinib-modifizierte IOL reduzieren bei weder bei hydrophobem Material, noch bei hydrophilem Material die Zellviabilität von humanen Corneaendothelzellen (HCEC). ((KoPho-PhoSSSS $p=0.8$; Mittlere Differenz 3%) (KoPhi – SSSSPhi $p=0.2$; Mittlere Differenz 17%) vgl. Abbildung 19)

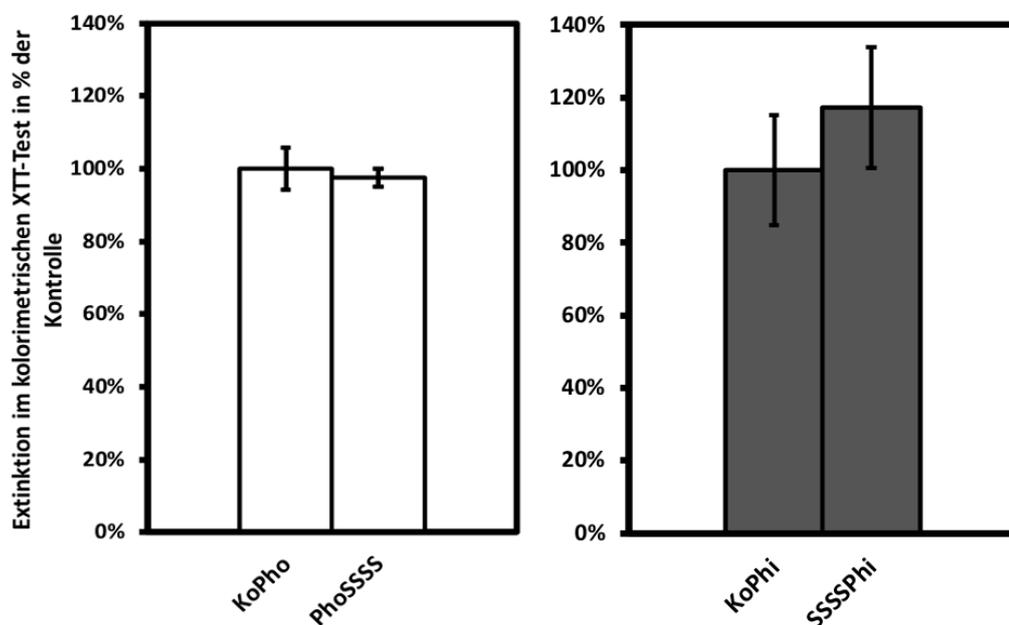


Abbildung 19 Toxizität von Erlotinib-IOL an HCEC

Gezeigt wird die Extinktion im XTT-Test von HCEC nach dreitägiger Inkubation im invertierten Vorderaugenabschnittsmodell. Erlotinib wirkt sich nicht negativ auf das Zellüberleben von HCEC aus.

4.2 Toxizität von Gefitinib-modifizierten IOL an cornealen Endothelzellen

Gefitinib-modifizierte IOL aus hydrophobem Material haben keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität (Mittlere Differenz: 1%; $p=0.61$). Gefitinib-modifizierte IOL mit hydrophilem Material haben ebenfalls keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität der cornealen Endothelzellen (Mittlere Differenz: 10%; $p=0.12$) (vgl. Abbildung 20)

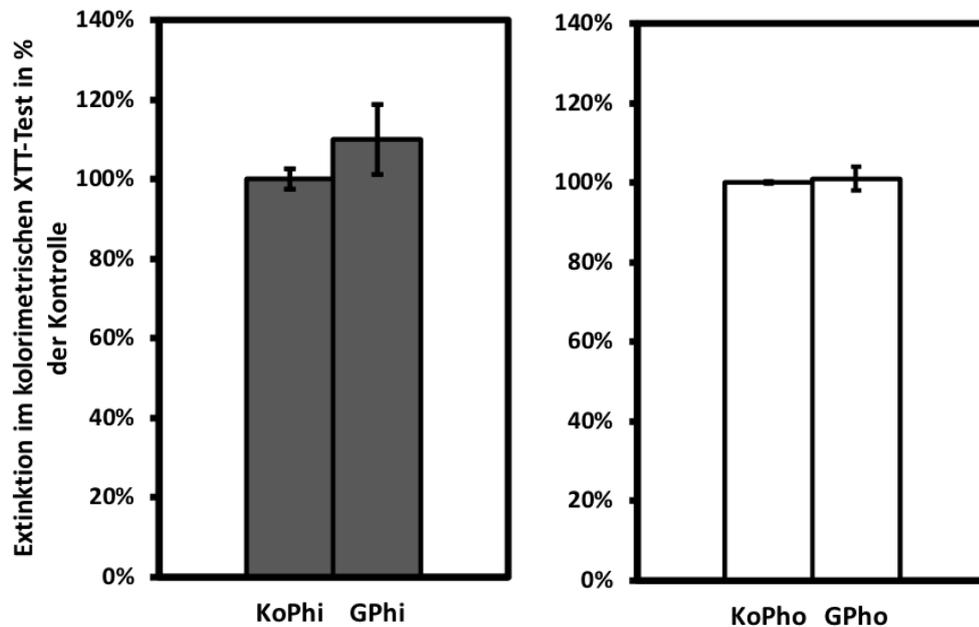


Abbildung 20 Toxizität von Gefitinib-IOL an HCEC

Gezeigt wird die Extinktion im XTT-Test nach von HCEC nach dreitägiger Inkubation im invertierten Vorderaugenabschnittsmodell. Gefitinib hat dabei keinen negativen Einfluss auf das Zellüberleben von cornealen Endothelzellen.

V DISKUSSION

1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Unabhängig von ihrem Material kann die IOL pharmakologisch wirksame Stoffmengen von Erlotinib über einen Zeitraum von mehreren Tagen abgeben. Diese Stoffmenge reichte aus, um das LEC-Wachstum im Vorderaugenabschnittsmodell und im ex vivo humanen Kapselsackmodell zu hemmen. Dabei zeigten sich Erlotinib und Gefitinib in den Wirkungs Dosen als nicht toxisch für corneale Endothelzellen und platzieren sich damit als vielversprechender Wirkstoff zur Reduzierung der Nachstarbildung.

2 Wirkspiegel

Wie oben bereits gezeigt und ausführlich beschrieben sind IOL unabhängig von ihrem Oberflächenmaterial in der Lage, messbare Medikamentenspiegel über einen Zeitraum von zwei Wochen abzugeben. Die mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50} von Erlotinib am Wachstum von humanen Linsenepithelzellen liegt bei rund $10\mu M^{120}$, eine Konzentration die die Medikamenten tragende Intraokularlinse in unseren Versuchen über drei Tage freisetzte. Dieser Zeitraum scheint besonders wichtig zu sein, da die postoperativen Proteinlevel im Auge in den ersten Tagen besonders hoch sind und somit vermutlich einen erheblichen Beitrag zur Ausbildung der Nachstar leisten^{121, 122}. Bereits die einmalige Zugabe von Wachstumsfaktoren resultiert in einem Zeitraum von bis zu einem Monat in einem Langzeiteffekt und vermehrter Proliferation, so dass davon auszugehen ist, dass durch eine kurzfristige Reduktion der Wachstumsfaktorkonzentrationen auch wiederum langfristig mit einer verminderten Proliferation der LEC gerechnet werden kann¹²³. Innerhalb der ersten Woche sind die Zytokine stark rückläufig¹²⁴ und die TGF-beta Spiegel, als wichtige Grundlage der Wundheilung, verhalten sich ähnlich¹²⁵. Gerade aufgrund dieser kurzfristigen Erhöhung der Wachstumsfaktoren erscheint die Zugabe von Hemmstoffen des Nachstars ins Auge während eines kurzen postoperativen Zeitraumes, eine vielversprechende Herangehensweise an die Erkrankung zu sein.

Die alternativen Applikationsmethoden für Medikamente in den vorderen Augenabschnitt nach Kataraktchirurgie weisen jeweils spezifische Probleme auf¹²⁶. Bei auf die Hornhaut topisch aufgetragenen Augentropfen muss die Pharmakokinetik bedacht werden, bei der verschiedene Schwierigkeiten auftreten, weswegen die Verfügbarkeit reduziert ist¹²⁷: So fließen innerhalb weniger Minuten fast 95% der Augentropfen durch Tränenfluss von der Oberfläche des Auges ab und werden in den Ductus Nasolacimalis drainiert¹²⁸. Außerdem wird ein Teil des Wirkstoffs durch die konjunktivalen Gefäße systemisch absorbiert und steht am Auge und damit dem eigentlichen Zielort nicht zur Verfügung¹²⁹. Zusätzlich ist die Wirksamkeit der Medikamentenapplikation stark von der Compliance des Patienten abhängig, so dass es vor allem bei älteren Patienten, wie bereits bei Antiglaukomatosa in der Literatur ausführlich gezeigt werden konnte, häufig zu Problemen, wie vergessener Einnahme, Kontamination oder falscher Applikationstechnik kommen kann¹³⁰. Der Kammerwasserfluss trägt die Medikamente außerdem vom Kapselsack fort¹²⁸. Aus diesen Gründen ist eine lokale, langfristige Medikamentenfreisetzung im Auge, um das Pharmakon direkt am Wirkungsort einbringen zu können, wünschenswert.

3 Diskussion der Toxizität

Neben der Wirksamkeit von EGFR-Inhibitoren in der Nachstarprophylaxe ist vor allem die Sicherheit entscheidend. Obwohl lange Zeit angenommen wurde, dass sich HCEC nach Beschädigung nicht regenerieren können, legen neue Ergebnisse hinsichtlich der Therapie der Fuchsendotheldystrophie mittels alleiniger Descemetorhexis ohne Transplantat¹³¹ nahe, dass HCEC sich nach Beschädigung regenerieren können¹³². Dennoch ist diese Struktur besonders sicherheitsrelevant, da diese nahe am Operationsgebiet liegt und bei Beschädigung eine deutlichen Verschlechterung der Sehkraft möglich ist^{133, 134}. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Erlotinib und Gefitinib modifizierte IOL keine Schäden an HCEC in vitro verursachen. Neben denen, in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen an cornealen Endothelzellen wurde Erlotinib auch an humanen Hornhäuten in Zellkultur in relevanten Konzentrationen über eine Inkubationsdauer von 14 Tagen untersucht und zeigte sich bis 50µM nicht toxisch und die endotheliale Zelldichte war im Vergleich zur Kontrolle nicht reduziert¹³⁵.

Außerdem zeigten Erlotinib und Gefitinib zumindest in vitro, keine relevante Toxizität für andere okuläre Zelllinien der Cornea (HCEC), Linse (HLE B3) und der Retina (ARPE 19, RPE, Mio M1). Tierexperimentelle Studien sollen zeigen, ob eine Anwendung im Auge möglich ist¹²⁰.

Bisher sind an okulären Nebenwirkungen hauptsächlich Probleme des vorderen Augenabschnitts wie Konjunktivitis und Trichomegalie unter der systemischen Gabe von EGFR-Inhibitoren beschrieben¹³⁶. Außerdem trat in einem beschriebenen Fall eine Hornhautperforation auf¹³⁷. Kritisch muss an dieser Stelle abgewogen werden, dass die Fallserien sehr wenige Patienten beinhalteten und diese wiederum an Lungenkrebs im Endstadium erkrankt waren, EGFR-Inhibitoren in unbekannter Dosis sowie eine unbekanntes chemotherapeutische Nebenmedikation erhielten¹³⁷.

4 Bedeutung der Ergebnisse

4.1 Die medikamentenfreisetzende IOL

Nicht nur in der Kardiologie mit „Drug-eluting-stents“¹³⁸ und in der Kontrazeption (NuvaRing)¹³⁹ werden Implantate und Medizingeräte als Medikamententräger zur lokalen und langfristigen Wirkstoffapplikation benutzt. Auch in der Augenheilkunde wird Ozurdex®, ein Dexamethason freigebendes intravitreales Implantat klinisch bei Makulaödem oder nicht infektiöser posteriorer Uveitis angewendet¹⁴⁰.

Durch Temperatur- und Zeitmodifikationen während des Auftragsprozesses kann die Abgabekinetik beeinflusst und unter den richtigen Bedingungen eine langfristige und gezielte Abgabe von Wirkstoffen erreicht werden¹⁴¹. So zeigten Versuche mit Moxifloxacin und Diclofenac auf CI26Y, einem gängigen IOL-Material, jeweils eine längere und höher konzentrierte Wirkstoffabgabe, wenn die Temperatur während des Soakingprozesses auf 60°C erhöht wurde und der Prozess auf eine Dauer von bis zu zwei Monaten ausgedehnt wurde. Die Autoren gehen von einer reversiblen endothermen Reaktion des Wirkstoffs mit der IOL aus, durch die die Bindung verursacht wird. Die optischen Materialeigenschaften der IOL veränderten sich dabei minimal, wobei keine negativen Auswirkungen für das

subjektive visuelle Ergebnis des Patienten zu erwarten sind¹⁴¹.

Für die vorliegende Studie bedeutet dies, dass durch eine Variation der Parameter „Soakingdauer“ und „Soakingtemperatur“ optimierte Freisetzungskinetiken erzielt werden könnten. Die Evaluation eines optimalen Soakingprozesses sollte Ziel von weiteren Untersuchungen des Forschungsgebiets sein. Besonders interessant sind diese Ergebnisse, neben der Nachstarprophylaxe, sicherlich für die Anwendung zur antibiotischen und antiinflammatorischen Behandlung nach Kataraktoperation¹⁴².

4.2 Rechtliche Grundlagen der medikamentenfreisetzenden IOL als Medizinprodukt

Das „Gesetz über Medizinprodukte (Medizinproduktegesetz – MPG)“ definiert Medizinprodukte als „Gegenstände zur Anwendung am Menschen zum Zwecke der Behandlung und Verhütung von Krankheiten deren Hauptwirkung nicht durch pharmakologische Mittel erreicht wird“¹⁴³.

Eine ergänzende Veröffentlichung des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte erläutert, dass Kombinationsprodukte, also Medizinprodukte mit Arzneimittelanteil, zusätzlich zur regulären Zulassung als Medizinprodukt als Intraokularlinse auch Anforderungen des Arzneimittelgesetzes (AMG)¹⁴⁴ erfüllen müssen¹⁴⁵. Ein klinisch bereits zugelassenes Beispiel hierfür ist der „Drug-Eluting-Stent“ aus der Kardiologie^{143,145}.

Die primäre Funktion der medikamentenfreisetzenden Intraokularlinse wäre dabei die Wiederherstellung der Sehfunktion nach Entfernung der altersbedingt funktionsunfähigen eigenen Linse. Ihre sekundäre Funktion, die Verhinderung der Nachstarbildung, würde pharmakologisch erreicht.

Während des Zulassungsprozesses müssen Aussagen und Erkenntnisse zu Aufbau, Nutzung, Kompatibilität und eine Nutzen-Risiko-Abwägung im Rahmen einer klinischen Prüfung stattfinden und die Anforderungen des Arzneimittelgesetzes erfüllt werden¹⁴⁵.

Neben den regulären technischen Beschreibungen nach MPG, die die IOL bisher durchlaufen hat, müssen für den Arzneimittelanteil Aussagen zu Wirkstoffgehalt,

Wirkstofffreisetzungprofil, Pharmakokinetik und dem Ausmaß der systemischen Verfügbarkeit getroffen werden¹⁴⁵. Im Rahmen der Nutzen-Risiko-Abwägung, müssten mutmaßlich die verminderte Nachstarrate und potentielle negative Folgen wie systemische Nebenwirkungen oder lokale Toxizität abgewogen werden. Außerdem müssen Nachweise geführt werden, dass die IOL unter den Vorgaben der Good Manufacturing Practice entstanden ist¹⁴⁵.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits wertvolle Aussagen zur Freisetzungskinetik und Wirksamkeit gewonnen werden, die durch zusätzliche Daten zu systemischer Verfügbarkeit aus dem Tierversuch ergänzt werden müssen.

4.3 Die Rolle des EGF-Rezeptors in der Pathogenese des Nachstars

Wie oben bereits erwähnt wurde, sind verschiedene molekulare Signalwege in die Pathogenese des Nachstars involviert⁴³. Der EGF-Rezeptor wird in der gesunden Linse des erwachsenen Menschen exprimiert, wobei die Anzahl der Rezeptoren mit dem Alter des Menschen zunimmt¹⁴⁶. Die Zugabe von Epidermal Growth Factor (EGF) zu humanen Kapselsacken beschleunigt das Zellwachstum auf der hinteren Linsenkapsel, während es sich mit dem selektiven Hemmstoff für den selben Rezeptor, AG1478, verlangsamen ließ¹⁴⁷. EGF scheint auch ein Faktor für die Migration von LEC zu sein, wobei die Signalübertragung über die Signalwege der p38-MAP-Kinase und ERK1/2 erfolgt. ERK 1/2 wiederum führen über eine TGF- β abhängige Modulation zu einer Vielzahl von Genexpressionen, die schlussendlich zu einer linsenepithelialen EMT führen, die wiederum die Grundlage des Nachstars ist¹⁴⁸. Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass der ERK 1/2 Signalweg vor allem für die Initiation der EMT benötigt wird, so dass eine Blockade durch EGFR-Inhibitoren den Beginn der EMT verhindern kann¹⁴⁹, was vor allem in der initialen postoperativen Phase interessant sein könnte.

Der EGF-Rezeptor ist deshalb ein möglicher Zielpunkt für die Prävention des Nachstars¹⁵⁰. siRNA gegen den EGF-Rezeptor kann die Proliferation von LEC in vitro als auch die Entwicklung des Nachstars in vivo im Rattenmodell effektiv hemmen¹⁵¹. Diese Ergebnisse konnten dadurch bestätigt werden, dass der Einsatz von Erlotinib, einem selektiven EGFR-Inhibitor, die gemessenen Konzentrationen

an exprimiertem EGF und TGF- β signifikant senkt^{1, 82}. Außerdem erwies sich Gefitinib, der zweite untersuchte EGFR-Inhibitor, im humanen Kapselsackmodell als wirksam, um die Linsenepithelzellproliferation zu hemmen¹⁵². Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Auswahl der EGFR-Inhibitoren als Medikament für die IOL.

Die EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib sind bereits längere Zeit für die Anwendung am Menschen zugelassen und befinden sich in der klinischen Anwendung, momentan hauptsächlich in der Therapie von Karzinomen, wie dem Bronchialkarzinom und dem Pankreaskarzinom¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

4.4 Fixierung der IOL im Kapselsack

Da LEC auch eine wichtige Rolle in der Fixierung der Intraokularlinsen mit dem heutigen Design im Kapselsack spielen¹¹³ erscheint eine vollständige Hemmung der Zellen derzeit nicht als sinnvoll. Die Linsenepithelzellen verursachen im Kapselsack eine Produktion von und eine Kontraktion der Extrazellulärmatrix. Dies führt zu einem Verkleben der vorderen Linsenkapsel mit der hinteren Linsenkapsel sowie zum sogenannten „Shrink-Wrap-Effect“, bei dem der Kapselsack fest um die IOL gewickelt wird und so die Nachstarbildung durch den „Sharp-Edge-Effekt“ vermindern kann^{68, 113}. Dies führt neben der Verhinderung von Zellmigration unter die IOL auch zu einer Rotationsstabilität der IOL im Kapselsack. Nachdem EGFR-Inhibitoren das Zellwachstum nur mindern, aber die Zellen nicht abtöten, können die LEC die IOL noch immer in der gewünschten Position halten und so für ein rotationsstabiles Ergebnis sorgen, das vor allem bei torischen IOL wichtig ist, sorgen, ohne Angst vor einer Achsenverschiebung zu verursachen^{113, 153}.

5 Offene Fragestellungen

5.1 Chemische Grundlagen der Stoffbindung an die IOL

In der vorliegenden Arbeit konnten die genauen Bindungsverhältnisse der Wirkstoffe an die IOL nicht untersucht werden.

Ausgehend vom gängigen Linsenmaterial Acrylat sind verschiedene Bindungstypen denkbar, immer in Abhängigkeit der chemischen Eigenschaften des gebundenen Wirkstoffs¹⁴¹. Mit Hilfe von ¹³C-Atomen markierten Wirkstoffen konnten die Bindungstypen mit dem Material genauer spezifiziert werden. Während bei niedrigen Temperaturen Wasserstoffbrückenbindungen wahrscheinlicher sind, scheinen bei Temperaturen von 60°C endotherme, reversible Bindungen im Vordergrund zu stehen, die zu einer verbesserten Pharmakokinetik führen¹⁴¹.

Insgesamt sind dies nur Vorüberlegungen, auf deren Grundlage weitere Untersuchungen angeschlossen werden sollten.

5.2 Wirkstoffverteilungsmuster der Intraokularlinse

Eine weitere Frage, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht adressiert wurde, ist, ob der Wirkstoff in das Material eindringt oder nur auf der Oberfläche akkumuliert.

Kleine Moleküle können in Acrylate eindringen und somit ins Innere gelangen¹⁵⁴. Die Diffusion des Wirkstoffs in das Plastik ist ein hoch komplexer Prozess der von verschiedenen chemischen und physikalischen Parametern, wie Temperatur, Druck, Molekülgröße und Einwirkdauer abhängt. Ein Beispiel hierfür sind Weichmacher, also Zusatzstoffe, die durch Eindringen in das Plastik dessen Materialeigenschaften für den gewünschten Zweck beeinflussen. Das Plastik selbst ist ein Polymer mit einer dreidimensionalen porösen Struktur, die es erlaubt, dass diese Zusatzstoffe eindringen können¹⁵⁴.

Daneben wird in IOL das Phänomen der sogenannten „Glistenings“, flüssigkeitsgefüllten Mikrovakuolen, die sich im optischen Anteil der IOL bilden, beobachtet, wenn die IOL sich in wässriger Umgebung befindet¹⁵⁵. Diese Flüssigkeitsansammlungen entstehen, wenn das IOL-Material Wasser absorbiert,

das sich anschließend im Material formiert^{156, 157}.

Dementsprechend ist es denkbar, dass im Wasser gelöste oder suspendierte Wirkstoffe ebenfalls in das Innere der IOL gelangen und von dort wieder abgegeben werden können.

6 Ausblick

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die pharmakologische IOL-Modifikation für die Anwendung in der Nachstarprophylaxe interessant werden könnte. Die unveränderte Operationstechnik und -dauer, sowie die Unabhängigkeit von der Compliance der Patienten sind vielversprechende Vorteile und könnten zur hohen Akzeptanz bei Patienten und den Operateuren führen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf verlässliche klinische Wirksamkeit hoffen.

EGFR-Inhibitoren wie Erlotinib und Gefitinib erscheinen aufgrund der gezeigten guten *in vitro* Wirksamkeit als direkter Inhibitor der zugrundeliegenden Pathogenese sehr für die Nachstarprophylaxe geeignet. Außerdem zeigten sich bei *in vitro* untersuchter Biokompatibilität zu verschiedenen Zellreihen des Auges für EGFR-Inhibitoren¹⁵² keine Toxizität.

Zur weiteren Untersuchung der Intraokularlinse als Medikamententräger sollten zwei parallel laufende Untersuchungen durchgeführt werden:

Zum einen sollten Bindung, Freisetzungskinetik und Materialeigenschaften ausführlich untersucht werden, auch um die Voraussetzungen für eine Zulassung als Medizinprodukt zu schaffen.

Zum anderen sind zur Zulassung und zum Nachweis der Sicherheit Tierversuche notwendig, die weiterführende Informationen über Biokompatibilität im Auge und systemischer Wirkstoffverteilung im Organismus liefern. Außerdem können die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie dahingehend bestätigt werden, dass die medikamententragende IOL auch *in vivo* die Ausbildung des Nachstars verzögern kann.

VI LITERATURVERZEICHNIS

1. Cvekl A, Ashery-Padan R. The cellular and molecular mechanisms of vertebrate lens development. *Development* 2014;141:4432-4447.
2. Klinke RP, Hans-Christian; Silbernagl, Stefan. *Physiologie*. 5., komplett überarbeitete Auflage ed. Stuttgart: Stuttgart Georg Thieme Verlag; 2005.
3. Riordan-Eva P, Cunningham ET, Vaughan DGo. *Vaughan & Asbury's general ophthalmology*. 18th ed. / edited by Paul Riordan-Eva, Emmett T. Cunningham. ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011.
4. Baumeister M, Kohnen T. [Accommodation and presbyopia : part 1: physiology of accommodation and development of presbyopia]. *Ophthalmologe* 2008;105:597-608; quiz 609-510.
5. Goertz AD, Stewart WC, Burns WR, Stewart JA, Nelson LA. Review of the impact of presbyopia on quality of life in the developing and developed world. *Acta Ophthalmol* 2014;92:497-500.
6. Gil-Cazorla R, Shah S, Naroo SA. A review of the surgical options for the correction of presbyopia. *Br J Ophthalmol* 2016;100:62-70.
7. Randall J, Olson RB-M, Sherleen Huang Chen, Kevin M. Miller, Roberto Pineda, James P. Tweeten, David C. Musch. Cataract in the Adult Eye Preferred Practice Pattern. American Association of Ophthalmologists; 2016.
8. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol* 2012;96:614-618.
9. Bourme RRA, Flaxman SR, Braithwaite T, et al. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017;5:e888-e897.
10. Congdon N, Vingerling JR, Klein BE, et al. Prevalence of cataract and pseudophakia/aphakia among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122:487-494.
11. Kohnen T, Baumeister M, Kook D, Klaproth OK, Ohrloff C. Kataraktchirurgie mit Implantation einer Kunstlinse. *Dtsch Arztebl International* 2009;106:695-702.
12. Wolfram CP, N. Weißbuch zur Situation der ophthalmologischen Versorgung in Deutschland. http://www.dog.org/wp-content/uploads/2013/03/DOG_Weissbuch_2012_fin.pdf; 2012.
13. Kanski JJ. *Klinische Ophthalmologie : Lehrbuch und Atlas / Jack J. Kanski. Clinical ophthalmology & ldt.>. 6., aktualisierte und erw. Aufl. ed. München [u.a.]: München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer; 2008.*
14. Duncan G, Wormstone IM, Davies PD. The aging human lens: structure, growth, and physiological behaviour. *British Journal of Ophthalmology* 1997;81:818-823.
15. Vinson JA. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006;13:151-162.
16. Hodge WG, Witcher JP, Satariano W. Risk factors for age-related cataracts. *Epidemiol Rev* 1995;17:336-346.
17. Christen WG, Glynn RJ, Ajani UA, et al. Smoking cessation and risk of age-related cataract in men. *JAMA* 2000;284:713-716.
18. Delcourt C, Cristol JP, Tessier F, Leger CL, Michel F, Papoz L. Risk factors for cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts: the POLA study. *Pathologies Oculaires Liees a l'Age. Am J Epidemiol* 2000;151:497-504.
19. Machan CM, Hrynchak PK, Irving EL. Age-related cataract is associated with type 2 diabetes and statin use. *Optom Vis Sci* 2012;89:1165-1171.
20. Kanthan GL, Wang JJ, Rochtchina E, et al. Ten-year incidence of age-related cataract and cataract surgery in an older Australian population. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 2008;115:808-814 e801.
21. Zetterberg M, Celojevic D. Gender and cataract--the role of estrogen. *Curr Eye Res* 2015;40:176-190.
22. Roberts JE. Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration. *Eye Contact Lens* 2011;37:246-249.
23. West SK, Duncan DD, Munoz B, et al. Sunlight exposure and risk of lens opacities in a population-based study: the Salisbury Eye Evaluation project. *JAMA* 1998;280:714-718.
24. Yu Z, Schulmeister K, Talebizadeh N, Kronschlager M, Soderberg P. Temperature-controlled in vivo ocular exposure to 1090-nm radiation suggests that near-infrared radiation cataract is thermally induced. *J Biomed Opt* 2015;20:015003.
25. Santana A, Waiswo M. The genetic and molecular basis of congenital cataract. *Arq Bras Oftalmol* 2011;74:136-142.
26. Andley UP. Crystallins and hereditary cataracts: molecular mechanisms and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2006;8:1-19.
27. Shiels A, Mackay D, Ionides A, Berry V, Moore A, Bhattacharya S. A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 1998;62:526-532.
28. Semina EV, Ferrell RE, Mintz-Hittner HA, et al. A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat Genet* 1998;19:167-170.
29. Blum-Hareuveni T, Seguin-Greenstein S, Kramer M, et al. Risk Factors for the Development of Cataract in Children with Uveitis. *Am J Ophthalmol* 2017;177:139-143.
30. Salek SS, Pradeep A, Guly C, Ramanan AV, Rosenbaum JT. Uveitis and Juvenile Psoriatic Arthritis

- or Psoriasis. *Am J Ophthalmol* 2017.
31. Alderaan K, Sekicki V, Magder LS, Petri M. Risk factors for cataracts in systemic lupus erythematosus (SLE). *Rheumatol Int* 2015;35:701-708.
 32. Klink TH, Muller M, Zierhut M, Geerling G. [Glaucoma and cataract]. *Ophthalmologe* 2010;107:403-408.
 33. Shah M, Shah S, Upadhyay P, Agrawal R. Controversies in traumatic cataract classification and management: a review. *Can J Ophthalmol* 2013;48:251-258.
 34. Smith MP, Colyer MH, Weichel ED, Stutzman RD. Traumatic cataracts secondary to combat ocular trauma. *J Cataract Refract Surg* 2015;41:1693-1698.
 35. Schein OD, Hibberd PL, Shingleton BJ, et al. The spectrum and burden of ocular injury. *Ophthalmology* 1988;95:300-305.
 36. Sachsenweger M, Klauß V. *Augenheilkunde : 73 Tabellen / Matthias Sachsenweger. Mit Beitr. von Volker Klauß. 2., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed. Stuttgart: Stuttgart : Thieme; 2003.*
 37. Liu Y-C, Wilkins M, Kim T, Malyugin B, Mehta JS. Cataracts. *The Lancet* 2017;390:600-612.
 38. Lam D, Rao SK, Ratra V, et al. Cataract. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15014.
 39. Lundstrom M, Barry P, Henry Y, Rosen P, Stenevi U. Evidence-based guidelines for cataract surgery: guidelines based on data in the European Registry of Quality Outcomes for Cataract and Refractive Surgery database. *J Cataract Refract Surg* 2012;38:1086-1093.
 40. Kelman CD. Phaco-emulsification and aspiration. A new technique of cataract removal. A preliminary report. *Am J Ophthalmol* 1967;64:23-35.
 41. Mihaltz K, Knorz MC, Alio JL, et al. Internal aberrations and optical quality after femtosecond laser anterior capsulotomy in cataract surgery. *J Refract Surg* 2011;27:711-716.
 42. Day AC, Gore DM, Bunce C, Evans JR. Laser-assisted cataract surgery versus standard ultrasound phacoemulsification cataract surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;7:CD010735.
 43. Wormstone IM. Posterior capsule opacification: a cell biological perspective. *Exp Eye Res* 2002;74:337-347.
 44. Moisseiev J, Bartov E, Schochat A, Blumenthal M. Long-term study of the prevalence of capsular opacification following extracapsular cataract extraction. *J Cataract Refract Surg* 1989;15:531-533.
 45. Stager DR, Jr., Weakley DR, Jr., Hunter JS. Long-term rates of PCO following small incision foldable acrylic intraocular lens implantation in children. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2002;39:73-76.
 46. 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.
 47. Eldred JA, Dawes LJ, Wormstone IM. The lens as a model for fibrotic disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011;366:1301-1319.
 48. Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, et al. Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol* 1992;37:73-116.
 49. Wormstone IM, Wang L, Liu CS. Posterior capsule opacification. *Exp Eye Res* 2009;88:257-269.
 50. Oharazawa H, Ibaraki N, Lin LR, Reddy VN. The effects of extracellular matrix on cell attachment, proliferation and migration in a human lens epithelial cell line. *Exp Eye Res* 1999;69:603-610.
 51. Marcantonio JM, Syam PP, Liu CS, Duncan G. Epithelial transdifferentiation and cataract in the human lens. *Exp Eye Res* 2003;77:339-346.
 52. Wormstone IM, Tamiya S, Anderson I, Duncan G. TGF-beta2-induced matrix modification and cell transdifferentiation in the human lens capsular bag. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2301-2308.
 53. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-1428.
 54. Terry AC, Stark WJ, Maumenee AE, Fagadau W. Neodymium-YAG laser for posterior capsulotomy. *Am J Ophthalmol* 1983;96:716-720.
 55. Harris WS, Herman WK, Fagadau WR. Management of the posterior capsule before and after the YAG laser. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1985;104 (Pt 5):533-535.
 56. Macewen CJ, Dutton GN, Holding D. Angle closure following neodymium-YAG(Nd YAG) laser capsulotomy in the aphakic eye. *Br J Ophthalmol* 1985;69:795-796.
 57. 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.
 58. Olsen GM, Olson RJ. Prospective study of cataract surgery, capsulotomy, and retinal detachment. *J Cataract Refract Surg* 1995;21:136-139.
 59. Chambless WS. Neodymium:YAG laser posterior capsulotomy results and complications. *J Am Intraocul Implant Soc* 1985;11:31-32.
 60. Schaumberg DA, Dana MR, Christen WG, Glynn RJ. A systematic overview of the incidence of posterior capsule opacification. *Ophthalmology* 1998;105:1213-1221.
 61. Steinberg EP, Javitt JC, Sharkey PD, et al. The content and cost of cataract surgery. *Arch Ophthalmol* 1993;111:1041-1049.
 62. Findl O, Buehl W, Bauer P, Sycha T. Interventions for preventing posterior capsule opacification. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;CD003738.
 63. Vasavada AR, Raj SM, Shah A, Shah G, Vasavada V, Vasavada V. Comparison of posterior capsule opacification with hydrophobic acrylic and hydrophilic acrylic intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 2011;37:1050-1059.
 64. Cullin F, Busch T, Lundstrom M. Economic considerations related to choice of intraocular lens (IOL) and posterior capsule opacification frequency - a comparison of three different IOLs. *Acta Ophthalmol* 2014;92:179-183.

65. Chang A, Kugelberg M. Posterior capsule opacification 9 years after phacoemulsification with a hydrophobic and a hydrophilic intraocular lens. *Eur J Ophthalmol* 2017;27:164-168.
66. 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.
67. Nagamoto T, Eguchi G. Effect of intraocular lens design on migration of lens epithelial cells onto the posterior capsule. *J Cataract Refract Surg* 1997;23:866-872.
68. Hayashi K, Hayashi H. Posterior capsule opacification in the presence of an intraocular lens with a sharp versus rounded optic edge. *Ophthalmology* 2005;112:1550-1556.
69. Buehl W, Findl O. Effect of intraocular lens design on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2008;34:1976-1985.
70. Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated. *Arch Ophthalmol* 2009;127:555-562.
71. Frezzotti R, Caporossi A, Mastrangelo D, et al. Pathogenesis of posterior capsular opacification. Part II: Histopathological and in vitro culture findings. *J Cataract Refract Surg* 1990;16:353-360.
72. Birinci H, Kuruoglu S, Oge I, Oge F, Acar E. Effect of intraocular lens and anterior capsule opening type on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:1140-1146.
73. Pande M, Spalton DJ, Marshall J. Continuous curvilinear capsulorhexis and intraocular lens biocompatibility. *J Cataract Refract Surg* 1996;22:89-97.
74. Vasavada AR, Dholakia SA, Raj SM, Singh R. Effect of cortical cleaving hydrodissection on posterior capsule opacification in age-related nuclear cataract. *J Cataract Refract Surg* 2006;32:1196-1200.
75. Vasavada AR, Raj SM, Johar K, Nanavaty MA. Effect of hydrodissection alone and hydrodissection combined with rotation on lens epithelial cells: surgical approach for the prevention of posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2006;32:145-150.
76. Rekas M, Klus A, Kosatka M. Sealed-capsule irrigation with distilled deionized water to prevent posterior capsule opacification--prospective, randomized clinical trial. *Curr Eye Res* 2013;38:363-370.
77. Liu X, Cheng B, Zheng D, Liu Y, Liu Y. Role of anterior capsule polishing in residual lens epithelial cell proliferation. *J Cataract Refract Surg* 2010;36:208-214.
78. Tassignon MJ, De Groot V, Vrensen GF. Bag-in-the-lens implantation of intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 2002;28:1182-1188.
79. Georgopoulos M, Menapace R, Findl O, Rainer G, Petternel V, Kiss B. Posterior continuous curvilinear capsulorhexis with hydrogel and silicone intraocular lens implantation: development of capsulorhexis size and capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:825-832.
80. Menapace R. Posterior capsulorhexis combined with optic buttonholing: an alternative to standard in-the-bag implantation of sharp-edged intraocular lenses? A critical analysis of 1000 consecutive cases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246:787-801.
81. Walker TD. Pharmacological attempts to reduce posterior capsule opacification after cataract surgery--a review. *Clin Experiment Ophthalmol* 2008;36:883-890.
82. Wertheimer C, Liegl R, Kernt M, Docheva D, Kampik A, Eibl-Lindner KH. EGFR-blockade with erlotinib reduces EGF and TGF-beta2 expression and the actin-cytoskeleton which influences different aspects of cellular migration in lens epithelial cells. *Curr Eye Res* 2014;39:1000-1012.
83. Flach AJ, Dolan BJ. Incidence of postoperative posterior capsular opacification following treatment with diclofenac 0.1% and ketorolac 0.5% ophthalmic solutions: 3-year randomized, double-masked, prospective clinical investigation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000;98:101-105; discussion 105-107.
84. Clark DS, Emery JM, Munsell MF. Inhibition of posterior capsule opacification with an immunotoxin specific for lens epithelial cells: 24 month clinical results. *J Cataract Refract Surg* 1998;24:1614-1620.
85. Duncan G, Wang L, Neilson GJ, Wormstone IM. Lens cell survival after exposure to stress in the closed capsular bag. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2701-2707.
86. 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.
87. Tetz MR, Ries MW, Lucas C, Stricker H, Volcker HE. Inhibition of posterior capsule opacification by an intraocular-lens-bound sustained drug delivery system: an experimental animal study and literature review. *J Cataract Refract Surg* 1996;22:1070-1078.
88. Kleinmann G, Apple DJ, Chew J, et al. Hydrophilic acrylic intraocular lens as a drug-delivery system: Pilot study. *J Cataract Refract Surg* 2006;32:652-654.
89. Behar-Cohen FF, David T, D'Hermies F, et al. In vivo inhibition of lens regrowth by fibroblast growth factor 2-saporin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:2434-2448.
90. Duncan G, Wormstone IM, Liu CS, Marcantonio JM, Davies PD. Thapsigargin-coated intraocular lenses inhibit human lens cell growth. *Nat Med* 1997;3:1026-1028.
91. Eibl-Lindner KH, Liegl R, Wertheimer C, Kampik A. [Intraocular lens as a drug delivery device]. *Ophthalmologe* 2013;110:990-994.
92. 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. *J Ocul Pharmacol Ther* 2012;28:359-368.
93. Liu H, Wu L, Fu S, et al. Polylactide-glycolic acid and rapamycin coating intraocular lens prevent posterior capsular opacification in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247:801-807.

94. Eibl KH, Wertheimer C, Kernt M, et al. Alkylphosphocholines for intraocular lens coating. *J Cataract Refract Surg* 2013;39:438-445.
95. Wertheimer C, Brandlhuber U, Kook D, et al. 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.
96. Krall EM, Arlt EM, Jell G, et al. Intraindividual aqueous flare comparison after implantation of hydrophobic intraocular lenses with or without a heparin-coated surface. *J Cataract Refract Surg* 2014;40:1363-1370.
97. Krall EM, Arlt EM, Jell G, Strohmaier C, Moussa S, Dexl AK. Prospective Randomized Intraindividual Comparison of Posterior Capsule Opacification After Implantation of an IOL With and Without Heparin Surface Modification. *J Refract Surg* 2015;31:466-472.
98. Garty S, Shirakawa R, Warsen A, et al. Sustained antibiotic release from an intraocular lens-hydrogel assembly for cataract surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6109-6116.
99. Wormstone IM, Tamiya S, Eldred JA, et al. Characterisation of TGF-beta2 signalling and function in a human lens cell line. *Exp Eye Res* 2004;78:705-714.
100. Wormstone IM, Liu CS, Rakic JM, Marcantonio JM, Vrensen GF, Duncan G. Human lens epithelial cell proliferation in a protein-free medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:396-404.
101. Dawes LJ, Sleeman MA, Anderson IK, Reddan JR, Wormstone IM. TGFbeta/Smad4-dependent and -independent regulation of human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5318-5327.
102. Dawes LJ, Elliott RM, Reddan JR, Wormstone YM, Wormstone IM. Oligonucleotide microarray analysis of human lens epithelial cells: TGFbeta regulated gene expression. *Mol Vis* 2007;13:1181-1197.
103. Dawes LJ, Angell H, Sleeman M, Reddan JR, Wormstone IM. TGFbeta isoform dependent Smad2/3 kinetics in human lens epithelial cells: a Cellomics analysis. *Exp Eye Res* 2007;84:1009-1012.
104. 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.
105. Cohen MH, Johnson JR, Chen YF, Sridhara R, Pazdur R. FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva) tablets. *Oncologist* 2005;10:461-466.
106. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, Pazdur R. FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. *Oncologist* 2003;8:303-306.
107. Azzariti A, Porcelli L, Xu JM, Simone GM, Paradiso A. Prolonged exposure of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib (Iressa(TM)) and to the antiangiogenic agent ZD6474: Cytotoxic and biomolecular effects. *World J Gastroenterol* 2006;12:5140-5147.
108. Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, et al. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* 2002;62:5749-5754.
109. Pubchem. Gefitinib - Compound Summary for CID 123631. Pub Chem; 2017.
110. Kawai K, Hayakawa K, Suzuki T. Simulation of 20-year deterioration of acrylic IOLs using severe accelerated deterioration tests. *Tokai J Exp Clin Med* 2012;37:62-65.
111. ANNAPURNA MM, Venkatesh B, CHAITANYA RK. Analytical Techniques for the Determination of Erlotinib HCl in Pharmaceutical Dosage Forms by Spectrophotometry. *Chemical Science Transactions* 2014;3:840-846.
112. 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.
113. Spalton DJ, Russell SL, Evans-Gowing R, Eldred JA, Wormstone IM. Effect of total lens epithelial cell destruction on intraocular lens fixation in the human capsular bag. *J Cataract Refract Surg* 2014;40:306-312.
114. Freshney RI, Capes-Davis A, Gregory C, Przyborski S. *Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell; 2010:xxxi, 732 p., 728 p. of plates.
115. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9:676-682.
116. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671-675.
117. Bundesärztekammer. Deklaration von Helsinki. 2013.
118. 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.
119. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. 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.
120. Wertheimer C, Liegl R, Kernt M, et al. EGF receptor inhibitor erlotinib as a potential pharmacological prophylaxis for posterior capsule opacification. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013;251:1529-1540.
121. Malecaze F, Chollet P, Cavois E, Vita N, Arne JL, Ferrara P. Role of interleukin 6 in the inflammatory response after cataract surgery. An experimental and clinical study. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1681-1683.
122. 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.
123. Wormstone IM, Anderson IK, Eldred JA, Dawes LJ, Duncan G. Short-term exposure to transforming growth factor beta induces long-term fibrotic responses. *Exp Eye Res* 2006;83:1238-1245.
124. Shah SM, Spalton DJ. Changes in anterior chamber flare and cells following cataract surgery. *Br J Ophthalmol* 1994;78:91-94.
125. 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.
126. Liu YC, Wong TT, Mehta JS. Intraocular lens as a drug delivery reservoir. *Curr Opin Ophthalmol* 2013;24:53-59.
127. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:1131-1135.
128. Mishima D. Ocular pharmacokinetics. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag; 1984:16-119.
129. Urtti A, Rouhiainen H, Kaila T, Saano V. Controlled ocular timolol delivery: systemic absorption and intraocular pressure effects in humans. *Pharm Res* 1994;11:1278-1282.
130. Kholdebarin R, Campbell RJ, Jin YP, Buys YM. Multicenter study of compliance and drop administration in glaucoma. *Can J Ophthalmol* 2008;43:454-461.
131. Moloney G, Chan UT, Hamilton A, Zahidin AM, Grigg JR, Devasahayam RN. Descemetorhexis for Fuchs' dystrophy. *Can J Ophthalmol* 2015;50:68-72.
132. Van den Bogerd B, Dhuhghaill SN, Koppen C, Tassignon MJ, Zakaria N. A review of the evidence for in vivo corneal endothelial regeneration. *Surv Ophthalmol* 2018;63:149-165.
133. Edelhauser HF. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. *Cornea* 2000;19:263-273.
134. Hardten DR. The cornea in cataract and intraocular lens surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 1996;7:43-48.
135. Wertheimer C, Kueres A, Siedlecki J, et al. The intraocular lens as a drug delivery device for an epidermal growth factor-Receptor inhibitor for prophylaxis of posterior capsule opacification. *Acta Ophthalmol* 2018.
136. Celik T, Kosker M. Ocular side effects and trichomegaly of eyelashes induced by erlotinib: a case report and review of the literature. *Cont Lens Anterior Eye* 2015;38:59-60.
137. Saint-Jean A, Sainz de la Maza M, Morral M, et al. Ocular adverse events of systemic inhibitors of the epidermal growth factor receptor: report of 5 cases. *Ophthalmology* 2012;119:1798-1802.
138. Greenhalgh J, Hockenhull J, Rao N, Dundar Y, Dickson RC, Bagust A. Drug-eluting stents versus bare metal stents for angina or acute coronary syndromes. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;CD004587.
139. 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.
140. Matonti F, Pommier S, Meyer F, et al. Long-term efficacy and safety of intravitreal dexamethasone implant for the treatment of diabetic macular edema. *Eur J Ophthalmol* 2016;0.
141. Topete A, Oliveira AS, Fernandes A, Nunes TG, Serro AP, Saramago B. Improving sustained drug delivery from ophthalmic lens materials through the control of temperature and time of loading. *Eur J Pharm Sci* 2018;117:107-117.
142. Kessel L, Tendal B, Jorgensen KJ, et al. Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops: a systematic review. *Ophthalmology* 2014;121:1915-1924.
143. "Medizinproduktegesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 7. August 2002 (BGBl. I S. 3146), das zuletzt durch Artikel 7 des Gesetzes vom 18. Juli 2017 (BGBl. I S. 2757) geändert worden ist". <https://www.gesetze-im-internet.de/mpg/MPG.pdf>; 2017.
144. "Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 18. Juli 2017 (BGBl. I S. 2757) geändert worden ist". 2017.
145. Schriever D. Besonderheiten klinischer Prüfungen kombinierter Arzneimittel und Medizinprodukte. 2017;Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte.
146. Bhuyan DK, Reddy PG, Bhuyan KC. Growth factor receptor gene and protein expressions in the human lens. *Mech Ageing Dev* 2000;113:205-218.
147. Maidment JM, Duncan G, Tamiya S, Collison DJ, Wang L, Wormstone IM. Regional differences in tyrosine kinase receptor signaling components determine differential growth patterns in the human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1427-1435.
148. Wojciechowski MC, Shu DY, Lovicu FJ. ERK1/2-Dependent Gene Expression Contributing to TGFbeta-Induced Lens EMT. *Curr Eye Res* 2018;43:986-997.
149. Wojciechowski MC, Mahmutovic L, Shu DY, Lovicu FJ. ERK1/2 signaling is required for the initiation but not progression of TGFbeta-induced lens epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Exp Eye Res* 2017;159:98-113.
150. Jiang Q, Zhou C, Bi Z, Wan Y. EGF-induced cell migration is mediated by ERK and PI3K/AKT pathways in cultured human lens epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2006;22:93-102.
151. Huang WR, Fan XX, Tang X. SiRNA targeting EGFR effectively prevents posterior capsular opacification after cataract surgery. *Mol Vis* 2011;17:2349-2355.
152. Wertheimer C, Siedlecki J, Kook D, et al. EGFR inhibitor Gefitinib attenuates posterior capsule

- opacification in vitro and in the ex vivo human capsular bag model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253:409-417.
153. Visser N, Bauer NJ, Nuijts RM. Toric intraocular lenses: historical overview, patient selection, IOL calculation, surgical techniques, clinical outcomes, and complications. *J Cataract Refract Surg* 2013;39:624-637.
154. Plasticizers. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
155. Mamalis N. Intraocular lens glistenings. *J Cataract Refract Surg* 2012;38:1119-1120.
156. Raven ML, Burris CK, Nehls SM. Glistening Intraocular Lens. *Ophthalmology* 2016;123:1483.
157. van der Mooren M, Franssen L, Piers P. Effects of glistenings in intraocular lenses. *Biomed Opt Express* 2013;4:1294-1304.

VII PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Folgende Veröffentlichungen sind aus dieser und anderen Arbeiten in unserem Labor hervorgegangen:

Wertheimer C, **Kueres A**, Siedlecki J, Braun C, Kassumeh S, Wolf A, Mayer W, Priglinger C, Priglinger S, Eibl-Lindner K. The intraocular lens as a drug delivery device for an epidermal growth factor-Receptor inhibitor for prophylaxis of posterior capsule opacification. *Acta Ophthalmol.* 2018

Wertheimer C, Eibl-Lindner K, Compera D, **Kueres A**, Wolf A, Docheva D, Priglinger SG, Priglinger C, Schumann RG. A cell culture technique for human epiretinal membranes to describe cell behavior and membrane contraction in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2017

Teile dieser Arbeit und parallel bearbeiteten Projekten wurden an folgenden wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt:

Posterpräsentation DOG Kongress Berlin 10/2015

Vortrag Münchner Ophthalmologische Gesellschaft München 12/2015

Vortragspreis Deutsche Retinologische Gesellschaft 2016

Vortragspreis Deutsche Gesellschaft für Ophthalmochirurgie 2016

Posterpräsentation ESCRS Kongress Kopenhagen 09/2016

Vortrag ESCRS Kongress Kopenhagen 09/2016

Fett markierte Beiträge wurden dabei als Erstautor/Vortragender präsentiert.

VIII DANKSAGUNG

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Kirsten Eibl-Lindner für die freundliche Überlassung des Themas und die wertvollen Hinweise und Ratschläge bei der Erstellung der Arbeit.

Außerdem danke ich meinen Eltern, Cornelia Gaar-Kueres und Klaus Kueres, für ihre liebevolle und vielschichtige Erziehung und ihre fortwährende Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Promotionsphase.

Auch bei den vielen Menschen bedanken, die mich während der Promotionsphase begleitet und geprägt haben, möchte ich mich bedanken. Von der guten Seele des Labors, Laure Djaleu, die immer ein nettes Wort parat hatte, bis zu meinen Mitdoktoranden Andre, Annabel, Ben, Jakob und Nick, die jederzeit zum fachlichen Diskurs oder praktische Tipps bereitstanden. Besonders trifft dies auf Stefan Kassumeh zu, der mich seit dem ersten Tag des Studiums stets als zuverlässiger Freund begleitet hat. Ich hoffe, dass sich unsere Wege niemals zu weit voneinander entfernen.

Mein besonderer Dank im Rahmen dieser Arbeit gilt Herrn Dr. med. Christian Wertheimer, dem Betreuer meiner Dissertation. Er setzte als mein Mentor ein wunderbares Beispiel von unermüdlicher Geduld, Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit. Ich bin ihm zu großem Dank verpflichtet. Aus der gemeinsamen Arbeit wurde eine gute Freundschaft.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner geliebten Anna bedanken, die mich über Jahre hinweg liebevoll unterstützt hat und zu jeder Zeit verständnisvoll war, wenn eine Wochenendschicht im Labor anstand. Durch ihre ständige Motivation und Unterstützung konnte ich diese Arbeit erst zu Ende bringen.

IX EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Alexander Klaus Kueres, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Entwicklung einer medikamentenfreisetzenden Intraokularlinse
mit den EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib“**

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.

St. Gallen, 16.11.2019
Ort, Datum

Alexander Kueres
Alexander Kueres