
Aus der
Augenklinik und Poliklinik
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Siegfried Priglinger

**Optimierung der Intraokularlinse als Medikamententräger in der
okulären Wundheilung**

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

vorgelegt von
Clarissa Bill

aus
Augsburg

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Claudia Priglinger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Arnd J. Gandorfer

Prof. Dr. Aljoscha S. Neubauer

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. Christian Wertheimer Dr. Stefan Kassu-
meh

Dekan:

Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

17.10.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	8
1.1 Nachstar.....	8
1.1.1 Katarakt-Operation und Entstehung des Nachstars.....	8
1.1.2 Zell- und molekularbiologische Pathophysiologie	9
1.1.3 Aktuelle Therapie des Nachstars und Komplikationen.....	10
1.1.4 Mögliche Ansätze der Prävention des Nachstars.....	10
1.2 Die medikamentenbeschichtete Intraokularlinse zur Prävention des Nachstars.....	11
1.3 Zielsetzung.....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Verwendete Intraokularlinse.....	17
2.2 Chemische Substanzen	17
2.3 Auswahl eines Lösungsmittelgemisches und Testen dessen Verträglichkeit mit der Intraokularlinse.....	18
2.4 Zellkultur.....	19
2.4.1 Auswahl der MTX-Konzentrationen	19
2.4.2 Das humane Kapselsackmodell und Quantifizierung des Nachstars	19
2.4.3 Zellkultur mit FHL-124.....	20
2.4.4 3D-Zellkultur-Gele.....	20
2.5 Immunhistochemische Färbung der Kapselsäcke.....	21
2.6 Statistische Analyse	22

3	Ergebnisse	23
3.1	Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittelgemisches.....	23
3.2	Ermittlung einer MTX-Konzentration	27
3.2.1	Zellkulturmodelle mit FHL-124	27
3.2.2	Das humane Kapselsackmodell.....	29
4	Diskussion.....	34
4.1	Wirkstoffapplikation und Auswahl eines Lösungsmittels	34
4.2	Auswahl und Zusammensetzung eines Polymers.....	36
4.3	Intraokuläre Anwendung von MTX	37
4.4	Ermittlung einer geeigneten MTX-Konzentration zur Nachstarhemmung 39	
4.5	Limitationen einer medikamentenbeschichteten Intraokularlinse	39
4.6	Ausblick.....	40
	Zusammenfassung.....	42
	Literaturverzeichnis	44
	Danksagung	48
	Publikationsliste.....	49
	Eidesstattliche Erklärung	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: dreiteilige hydrophobe IOL im humanen Kapselsackmodell	13
Abbildung 2: Strukturformel von PLGA x ist die Anzahl der Lactideinheiten, y ist die Anzahl der Glycolideinheiten. ³⁹	15
Abbildung 3: Verdampfungsverhalten unterschiedlicher Lösungsmittelgemische.	25
Abbildung 4: Verdampfungsverhalten unterschiedlicher Lösungsmittelgemischtropfen.....	26
Abbildung 5: Hemmung der Proliferation von FHL-124 <i>in vitro</i> durch unterschiedliche MTX-Konzentrationen.....	28
Abbildung 6: Kontraktion von FHL-124 in Gelen bei Behandlung mit unterschiedlichen MTX-Konzentrationen.....	29
Abbildung 7: Bewuchs der hinteren Kapsel des Kapselsacks im humanen Kapselsackmodell in Abhängigkeit von der MTX-Konzentration.	30
Abbildung 8: Die unbehandelte Kontrolle zeigt einen fibroblastischeren Phänotyp und eine stärkere Expression von Fibronectin und α -SMA während in behandelten Gruppen epitheliale Zellen dominieren.	32

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Chemikalien.....	17
Tabelle 2: Untersuchte Lösungsmittelgemische mit jeweiligem Anteil an Lösungsmittel und Verdünnungssubstanz.....	18
Tabelle 3: Lösungsmittel(-gemische) und deren Auswirkungen auf PLGA-Löslichkeit und Intaktheit der IOL.	23
Tabelle 4: Zustand der IOL nach Kontakt mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen.	24
Tabelle 5: Löslichkeit von PLGA/PLA in unterschiedlichen Volumina eines Lösungsmittelgemisches aus 30 % Aceton und 70 % Methanol.	27
Tabelle 6: Quantifizierung der angefärbten Marker an der hinteren Kapsel konfluenter humaner Kapselsäcke.	33

Abkürzungsverzeichnis

PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)
PLA	poly(lactic acid)
FCS	fetal calf serum
PBS	phosphate buffered saline
IOL	Intraokularlinse
α SMA	α smooth muscle actin
TGF β	Transforming growth factor β
IL-6	Interleukin-6
Nd:YAG Laser	Neodymium-Yttrium-Aluminium-Garnet Laser
FDA	Food and Drug Administration
EMA	European Medicines Agency
SD	Standard Deviation
SMAD	small mother against decapentaplegic
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration

1. Einleitung

1.1 Nachstar

1.1.1 Katarakt-Operation und Entstehung des Nachstars

Die Kataraktoperation ist die häufigste operative Maßnahme in der Augenheilkunde weltweit.¹ Dabei wird eine künstliche Intraokularlinse implantiert, die die transparenzgeminderte Linse ersetzt.¹

Nach steriler Abdeckung des Auges und Inzision der Cornea wird die vordere Kapsel des Kapselsacks kreisrund eröffnet (Kapsulorhexis). Dadurch ist der Zugang zur getrübbten Linse möglich, welche in einem nächsten Schritt mittels Phakoemulsifikation entfernt wird. Anhand dieser Technik wird die Linse mit Ultraschall zertrümmert und im Anschluss durch eine kleine Inzision von 3-4 mm aspiriert. In den eröffneten Kapselsack wird nun die künstliche IOL implantiert, welche durch die hintere Kapsel und Teile der vorderen Kapsel des Kapselsacks in Position gehalten wird.¹ Trotz Entfernung der humanen Linse verbleiben einige Linsenepithelzellen im Kapselsack, die nach Beendigung des Eingriffs an der vorderen Kapsel beginnen, zu proliferieren.^{2, 3} Von hier aus bewachsen sie die künstliche Intraokularlinse und greifen auf die hintere Kapsel des Kapselsacks über. Mit dem folgenden Einwachsen der Zellen in den Bereich der optischen Achse, der Zelltransformation zu Myofibroblasten und Veränderungen der zellulären Matrix gehen Sehverluste einher.^{2, 4} Diese Konstellation wird als Nachstar bezeichnet² und gehört zu den häufigsten Komplikationen nach einer Katarakt-Operation.³ Die Inzidenz des Nachstars hängt von der implantierten IOL ab. Bei einem Vergleich unterschiedlicher Hersteller wurde bei Implantation der Alcon AcrySof® nach drei Jahren bei 4,7 % und nach fünf Jahren bei 7,1 % der Behandelten ein Nachstar festgestellt.⁵ Im Vergleich dazu führte die Implantation einer Lenstec Softec® nach drei Jahren bei 16,2 % und nach fünf Jahren bei 22,6 % der Kataraktoperierten zum Nachstar.⁵ Beim Vergleich hydrophober mit hydrophiler IOL erwiesen sich hydrophobe IOL als vorteilhaft. Vier Jahre nach Implantation der IOL wurde eine Nachstarbehandlung bei 31,75 % der Untersuchten mit hydrophober IOL und bei 56,60 % der Teilnehmenden mit hydrophiler IOL notwendig.⁶

1.1.2 Zell- und molekularbiologische Pathophysiologie

Nach Kataraktoperation wird angenommen, dass verbleibende Linsenepithelzellen proliferieren und in den Bereich der hinteren Kapsel einwachsen.⁴ Als Teil eines Wundheilungsprozesses kommt es zur epithelialen mesenchymalen Transformation der Zellen zu Myofibroblasten und zur Veränderung der extrazellulären Matrix. Dies führt zu Fibrose, Kontraktion der Zellen und deren Anhaften an der Kapselsackoberfläche. Durch Prozesse wie Faltenbildung des Kapselsacks und Entstehung von Elschnig-Perlen wird letztendlich die Sehleistung beeinträchtigt.²

Durch die Kataraktoperation wird die Blut-Kammerwasserschranke verletzt. Dadurch werden unterschiedliche Zytokine ausgeschüttet, die zur Aktivierung des Immunsystems führen.^{7, 8} In der Analyse der Genexpression muriner Linsenepithelzellen nach Kataraktoperation konnten neben der gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen und Aktinzytoskelett-Genen eine Hochregulierung proinflammatorischer Signalwege 24 h nach Intervention herausgearbeitet werden. Diese stehen im Zusammenhang mit der Zytokinproduktion durch Linsenepithelzellen und der Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Achtzehn Stunden nach Kataraktoperation stieg die Zahl der einwandernden CD11b-positiven Zellen in den Kapselsack und ging innerhalb von zehn Tagen stark zurück. Ab dem zweiten postoperativen Tag waren Makrophagen nachweisbar.⁹ Eine Assoziation von Makrophagen mit Fibrose ist in unterschiedlichen Organen bekannt.¹⁰ α smooth muscle actin (α -SMA) gilt als Fibrosemarker und war in murinen Linsenepithelzellen 48 h nach Kataraktoperation nachweisbar.¹¹ Für die Aktivierung profibrotischer Gene ist der Signalweg zwischen dem Transforming growth factor β (TGF β) und dem small mother against decapentaplegic (SMAD)-Protein bedeutend.¹² Die Einwanderung von Makrophagen in den murinen Kapselsack, die Aktivierung von SMAD3 durch Phosphorylierung und der Nachweis von α -SMA traten simultan nach zwei bis drei Tagen auf. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis auf komplexe Zusammenhänge zwischen Immunaktivierung und Fibrose.^{9, 11}

TGF β 1 und 2 führten in Zellkultur mit der spontan immortalisierten humanen Linsenepithelzelllinie (FHL-124, Fetal-human-lens 124) unter anderem zum vermehrten Nachweis von α -SMA, Fibronectin und Kollagen I.^{13, 14} Außerdem wurde ein steigender Anteil an phosphoryliertem und damit aktiviertem SMAD2 und

SMAD3 bei steigender Konzentration an TGFβ2 *in vitro* nachgewiesen.¹⁴ An der Interaktion mit TGFβ sind weitere Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) beteiligt. In Zellkultur mit humanen Linseneithelzellen stieg die Expression von TGFβ2, Fibronektin und Kollagen I durch Zugabe von IL-6 signifikant an. Wurden die Linseneithelzellen mit IL-6 und TGFβ2 kombiniert behandelt, war die Genexpression der Fibrosemarker Kollagen 1, Fibronektin und α-SMA im Vergleich zur Einzelbehandlung am höchsten. Dies lässt einen synergistischen Effekt von IL-6 und TGFβ2 vermuten.¹⁵

1.1.3 Aktuelle Therapie des Nachstars und Komplikationen

Der Nachstar wird mittels Neodymium-Yttrium-Aluminium-Garnet (Nd:YAG) Laser durch Entfernung der hinteren Kapsel therapiert.¹⁶ Dabei wurde bei 94 % der behandelten Patient/innen eine sofortige und nachhaltige Verbesserung der Sehschärfe beschrieben.¹⁷ Jedoch werden neben der möglichen Beschädigung der IOL durch den Laser weitere Komplikationen wie Netzhautablösung, Erhöhung des Augeninnendrucks und Entstehung eines zystoiden Makulaödems beobachtet.^{17, 18} Unter 862 Patient/innen zeigte sich bei 1,4 % eine Netzhautablösung nach Laser-Kapsulotomie.¹⁹ Außerdem ist es durch hohe Anschaffungskosten des Nd:YAG Lasers nicht allen Patient/innen mit Nachstar möglich sich einer Therapie zu unterziehen.³

1.1.4 Mögliche Ansätze der Prävention des Nachstars

Mit dem Ziel der Nachstarprävention wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Verbesserungen bezüglich des Designs und Materials der Intraokularlinse geprüft. Die Implantation von hydrophoben IOL führte seltener zur Laser-Kapsulotomie als die von hydrophilen IOL.²⁰ Eine eckige/schärfere/steilere Kante führte zu einer signifikanten Reduktion der Entstehung des Nachstars, das Material hingegen zeigte hier keinen signifikanten Einfluss.²¹ Prinzip der scharfen Kante ist es, Linseneithelzellen in ihrer Migration zu verlangsamen oder zu stoppen. Dadurch wird die hintere Kapsel weniger stark bewachsen.²² Ein weiterer Ansatz zur Prävention des Nachstars ist die Entwicklung neuerer Operationstechniken. Beispielsweise wird in der Literatur über eine zusätzliche Kapsulorhexis der hinteren Kapsel berichtet, die den Nachstar vollständig verhindern soll.²³ Des Weiteren kann sich das Einhalten eines Abstands zwischen vorderer Kapsel und IOL präventiv auswirken. Hierfür wird ein Spannungsring mit scharfer

Kante in den Kapselsack implantiert. Dabei konnte nach zwei Jahren ein verminderter Nachstar festgestellt werden. Eine generelle Empfehlung eines solchen Spannungsrings wird bisher nicht ausgesprochen, Hochrisikopatient/innen könnten jedoch profitieren.²⁴

Weitere präventive Ansätze beziehen sich auf eine pharmakologische Prophylaxe des Nachstars. Unterschiedlichste Wirkstoffklassen wurden in Studien untersucht, darunter Steroide, Immunsuppressiva und Zytostatika.³ Einige Studien beschäftigen sich mit der Wirkstofffreisetzung direkt in den Kapselsack, beispielsweise durch Beschichtung der IOL.²⁵ Eine Verlängerung der Dauer bis zur Entwicklung des Nachstars wurde so beispielsweise im Hasenmodell von 22 Tage auf 99 Tage mittels Rapamycin erreicht.²⁶

1.2 Die medikamentenbeschichtete Intraokularlinse zur Prävention des Nachstars

1.2.1 Vorteile einer medikamentenbeschichteten Intraokularlinse

Eine Möglichkeit, in Komplikationen nach Kataraktoperation einzugreifen stellen Augentropfen dar. Rapamycin wurde als Wirkstoff in Augentropfen und auf einer beschichteten IOL getestet.²⁷ Bei dem Versuch das Medikament über Augentropfen zur Nachstarprophylaxe zu verabreichen, zeigte sich keine signifikante Hemmung des Nachstars. Hingegen führte eine Rapamycin-PLGA beschichtete IOL zur signifikanten Reduktion des Nachstars. Des Weiteren lag die Rapamycinkonzentration im Kammerwasser nach Applikation des Medikaments als Augentropfen unter der Nachweisgrenze, während Rapamycin bei Beschichtung der IOL über vier Wochen postoperativ im Kammerwasser nachweisbar war.²⁷ Bei eigenständiger Applikation der Augentropfen durch unerfahrene postoperative Kataraktpatient/innen kam es bei 92,6 % der Untersuchten zu Fehlapplikationen. Diese beinhalteten Kontamination der Dosierflasche, fehlendes Händewaschen vor der Anwendung oder die Applikation von zu vielen oder keinen Augentropfen.²⁸

Durch eine Beschichtung der IOL mit unterschiedlichen Wirkstoffen können zusätzlich zum Nachstar auch andere intraokuläre Komplikationen behandelt werden.²⁹ Die Beschichtung einer IOL mit Norfloxacin zur Prophylaxe einer

postoperativen Endophthalmitis ermöglichte die Wirkstoffapplikation ohne eine weitere notwendige Behandlung.³⁰ Anwendungsfehler durch Patient/innen können vermieden werden. Zudem ist diese Vorgehensweise unabhängig von der Compliance der Patient/innen, sodass eine erhöhte Therapiesicherheit gewährleistet ist. Des Weiteren können durch die intraokuläre Wirkstoffapplikation Dosierungen besser kontrolliert und systemische Nebenwirkungen reduziert werden.³¹ So wurde bei einer mit Rapamycin und PLGA beschichteten IOL eine Freisetzung des Medikaments in das Kammerwasser von Hasen über 14 Tage gemessen, eine Detektion von Rapamycin im Blut gelang zu keinem Zeitpunkt.²⁶ Medikamentenbeschichtete IOL bieten neben klinischen auch wirtschaftliche Vorteile. Die aktuelle Behandlung des Nachstars durch Kapsulotomie mit Nd:YAG Laser kostet 250 €. ³² Gelingt eine Hemmung oder Hinauszögerung des Nachstars, können Kosten gespart werden.

1.2.2 Aufbau einer Intraokularlinse

IOL können aus einem oder drei Teilen bestehen. Bei einer dreiteiligen IOL sind die Haptiken separat gefertigt und mit der Optik verbunden (**Abbildung 1**) Klinisch gebräuchlich sind faltbare IOL aus Acryl, die entweder hydrophobe oder hydrophile Eigenschaften aufweisen.^{33, 34} Eine scharfe Kante an der Optik der IOL führte zu einer geringeren Nachstarinzidenz.³⁵

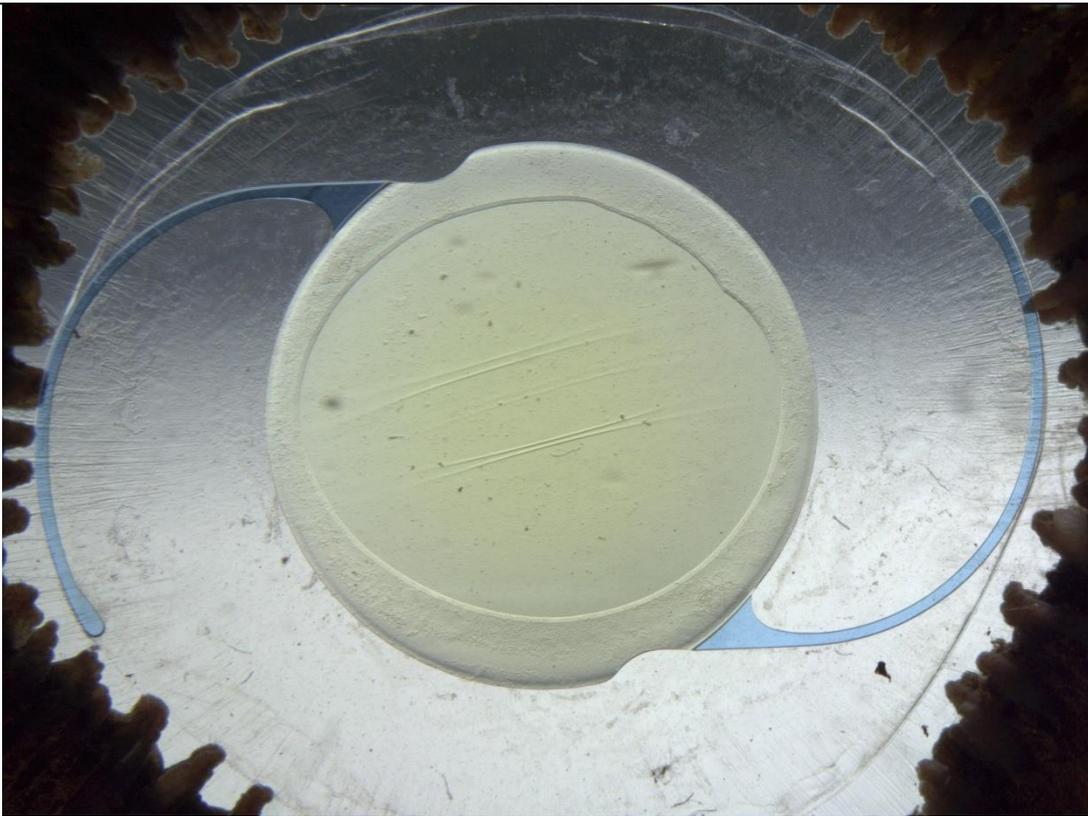


Abbildung 1: dreiteilige hydrophobe IOL im humanen Kapselsackmodell

1.2.3 Auswahl der Wirksubstanz

Eine Vielzahl an Substanzen zur Prophylaxe des Nachstars werden in Studien untersucht.³ Dieser Arbeit geht eine bereits publizierte Studie zur Auswahl einer geeigneten Wirksubstanz voraus.³⁶ Anhand von Literaturrecherche konnten hierbei zunächst 62 Substanzen ausfindig gemacht werden. Durch Inklusionskriterien wie Zulassung durch die Food and Drug Administration (FDA) oder die European Medicines Agency (EMA) und Exklusionskriterien wie das Risiko von mutagenem Potential oder dem Basieren auf RNA oder Virusvektor konnte die Anzahl auf 21 Substanzen reduziert werden.³⁶ Diese wurden auf ihre Toxizität bezüglich FHL-124 (Linsenepithelzellen) und CEC-SV40 (Endothelzellen der Cornea) und ihren Einfluss auf die Zellproliferation untersucht. Dabei zeigten Kaffeesäurephenylester, Disulfiram, Retinsäure, Rapamycin und Methotrexat (MTX) eine Proliferationshemmung auf humane Linsenepithelzellen, wobei nur bei Disulfiram und MTX keine Toxizität auf Corneaendothelzellen und Linsenepithelzellen festgestellt werden konnte.³⁶ Eine mittels Soaking mit Disulfiram behandelte hydrophile und hydrophobe Intraokularlinse zeigte im Vorderkammermodell keine Hemmung der humanen Linsenepithelzellen, wobei der gleiche

Versuchsaufbau mit MTX zu einer signifikanten Proliferationshemmung führte.³⁶ Des Weiteren findet MTX bereits klinische Anwendung in der Ophthalmologie, beispielsweise als intravitreale Injektion in der Lymphomtherapie als Off-label-Use.³⁷

1.2.4 Kombination mit einer Trägersubstanz zur kontrollierten Freisetzung des Wirkstoffes

Um eine verlängerte Freisetzung des Wirkstoffes durch das beschichtete Medizinprodukt zu erreichen, kann das Medikament mit einem Polymer kombiniert werden.³¹ Dabei sticht Polylactid-co-Glycolid (PLGA) als biologisch abbaubares Polymer aufgrund langer Erfahrungswerte im klinischen Gebrauch und der Steuerbarkeit der Freisetzungsdauer heraus.³⁸ PLGA ist von der FDA zugelassen und biokompatibel. Es setzt sich aus Glycolid und Lactid in unterschiedlichen Verhältnissen zusammen (**Abbildung 2**).³⁹ Die Bestandteile sind über Esterbindungen miteinander verbunden, die beim Abbau des Polymers hydrolysiert werden.³⁸ Die Dauer des Abbaus wird dabei von vielen Faktoren wie der unterschiedlichen Zusammensetzung aus Glycolid und Lactid, der Monomer Stereochemie, der Polymer Kettenlinearität oder des Molekulargewichts beeinflusst. Durch Anpassung dieser Parameter kann eine kontrollierte Medikamentenfreisetzung erreicht werden.³⁸ Je höher der Anteil an Lactid ist, desto langsamer wird das Polymer aufgrund dessen hydrophober Methylgruppe abgebaut.³⁹ Ein weiterer Einflussfaktor für den Abbau von PLGA ist die Kristallinität. Glycolid besitzt einen hohen Kristallinitätsgrad. Wird es mit Lactid polymerisiert, setzt sich der Kristallinitätsgrad des Polymers herab.³⁹ Bei einem Polymer bestehend aus 50 % Glycolid und 50 % Lactid wird der schnellste Abbauprozess beobachtet, da hier der Anteil des Lactids zu einer weniger kristallinen Struktur und der Anteil des Glycolids zu einer verstärkten Wasseranlagerung führt. Außerhalb dieses Mischungsverhältnisses zeigt ein höherer Anteil an Glycolid eine höhere Abbaurate.³⁹

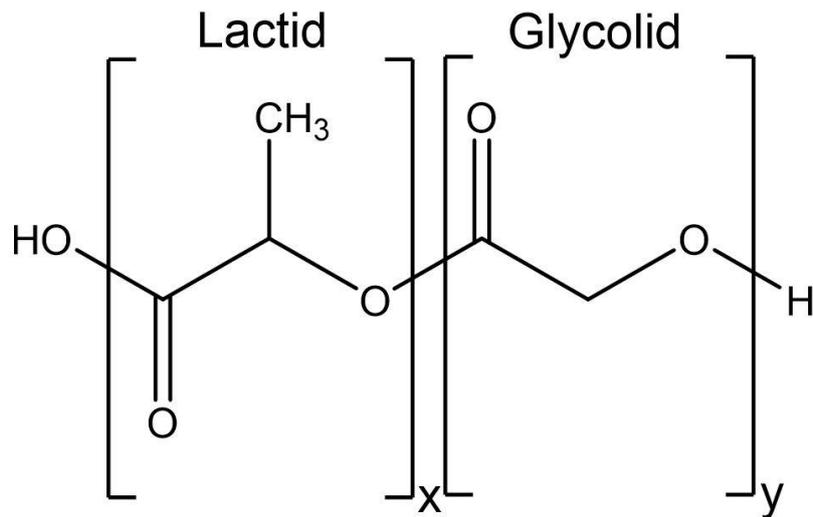


Abbildung 2: Strukturformel von PLGA x ist die Anzahl der Lactideinheiten, y ist die Anzahl der Glycolideinheiten.³⁹

1.2.5 Beschichtungsverfahren in der Literatur

Unterschiedliche Verfahren zur Beladung einer IOL mit Wirkstoff sind aus der Literatur bekannt. Prinzipiell können drei Mechanismen unterschieden werden: Die Beschichtung der Oberfläche durch Verdampfen eines Medikamentengemisches, die Beladung des IOL-Materials mit Wirkstoff mittels Soaking und die Imprägnierung der Oberfläche mit überkritischem CO₂.^{26, 36, 40-45} Beim Soaking wird die IOL in eine übersättigte Medikamentenlösung eingelegt und nach der Inkubationszeit entnommen. Festkörper, die sich während der Inkubationszeit gebildet haben, werden von der Oberfläche der IOL abgewaschen. Der Wirkstoff befindet sich im Material der IOL.^{36, 40} Medikamente können außerdem unter bestimmten Druck- und Temperaturbedingungen in überkritischem CO₂ gelöst werden. Es wird von einer Imprägnierung der IOL mit Wirkstoff ausgegangen.⁴¹

Zur Oberflächenbeschichtung wird die IOL mit einer Beschichtungslösung, in der der Wirkstoff enthalten ist, besprüht. Das Lösungsmittel verdampft und das Medikament bleibt auf der Oberfläche der IOL haften.⁴² Alternativ besteht die Möglichkeit, das Medikamenten-Lösungsmittelgemisch auf die IOL zu pipettieren, um diese anschließend zu schleudern und zu trocknen.⁴³

Um die IOL mit Wirkstoff und PLGA zu beschichten, werden meist beide Bestandteile in einer Beschichtungsflüssigkeit mit Lösungsmittel wie Chloroform gelöst.⁴³

Die IOL wird dann einfach oder mehrfach beschichtet. Das Mischverhältnis von Wirkstoff zu PLGA variiert.^{26, 44} Beschrieben ist außerdem die Herstellung zweier Lösungen, in denen PLGA und Wirkstoff getrennt enthalten sind. Beide werden separat auf die gleiche Region der IOL aufgetragen.⁴⁵

1.3 Zielsetzung

In vorausgegangenen Arbeiten wurde MTX als Wirkstoff zur Prophylaxe des Nachstars als vielversprechend herausgearbeitet.³⁶ Erste Beschichtungen einer IOL mit MTX und PLGA wurden vorgenommen.⁴² Im Folgenden soll die Zusammensetzung der Beschichtungslösung hinsichtlich des Lösungsmittels und der gewünschten MTX-Freisetzung genauer untersucht werden. Welche Lösungsmittel können unterschiedliche PLGA-Zusammensetzungen lösen, welche Lösungsmittel schaden der IOL? Ziel ist es, Voraussetzungen für die Herstellung einer Beschichtungslösung zu schaffen, mit der die Medikamentenfreisetzung gesteuert werden kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll eine MTX-Konzentration ermittelt werden, welche in Zellkultur pathophysiologische Vorgänge des Nachstars hemmt. Ziel ist es, in unterschiedlichen Versuchsaufbauten einen Wirkstoffbereich zu evaluieren, der in Zukunft kontinuierlich von einer beschichteten IOL abgegeben werden soll.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Intraokularlinse

Für alle Versuche wurden Hoya-PS AF-1® (UV) oder Hoya-AF-1® (UY) (Hoya Vision, Tokyo, Japan) verwendet. Beide Intraokularlinsen sind hydrophob und setzen sich aus einer Optik mit scharfer Kante und zwei Haptiken zusammen. Die Optik besteht aus Acryl und misst einen Durchmesser von 6 mm. Die Haptiken sind aus PMMA hergestellt und tragen zu einem Gesamtdurchmesser von 12,5 mm bei.

2.2 Chemische Substanzen

Lösungsmittel	Hersteller
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Dichlormethan	Carl Roth GmbH + Co.KG
Aceton	Carl Roth GmbH + Co.KG
Methylacetat	Carl Roth GmbH + Co.KG
Ethylacetat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phenylmethanol	Carl Roth GmbH + Co.KG
Triacetin	Sigma Aldrich
Propan-2-ol	Carl Roth GmbH + Co.KG
Methanol	Carl Roth GmbH + Co.KG
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co.KG
RG 503 PLGA 50:50 lactide:glycolid M _w 24000-38000	Sigma Aldrich
RG 756 S PLGA 75:25 lactide:glycolid M _w 76000-115000	Sigma Aldrich
RG 858 S PLGA 85:15 lactide:glycolide M _w 190000-240000	Sigma Aldrich
PLA average Mn 20000	Sigma Aldrich
Methotrexat	Seleck Chemicals, Houston, TX, USA

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Chemikalien

2.3 Auswahl eines Lösungsmittelgemisches und Testen dessen Verträglichkeit mit der Intraokularlinse

Die zentrale Herausforderung bei der Ermittlung eines Lösungsmittelgemisches ist das Lösen von PLGA ohne Beschädigung der IOL. Zehn verschiedene Lösungsmittel wurden getrennt auf deren Verträglichkeit mit der IOL und deren Lösungsfähigkeit von PLGA 50:50 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) untersucht. Hierfür wurden 5 mg PLGA 50:50 oder eine IOL in 1 ml Lösungsmittel gegeben. Lösungsmittel, die PLGA lösten wurden mit Lösungsmittel gemischt, die keine Schäden an der IOL hervorriefen.

Lösungsmittel	Verdünnungssubstanz
20 % Aceton	80 % Methanol
30 % Aceton	70 % Methanol
40 % Aceton	60 % Ethanol
40 % Ethylacetat	60 % Methanol
20 % Methylacetat	80 % Methanol
40 % Methylacetat	60 % Ethanol
40 % Propan-2-ol	60 % Methanol
40 % Triacetin	60 % Ethanol

Tabelle 2: Untersuchte Lösungsmittelgemische mit jeweiligem Anteil an Lösungsmittel und Verdünnungssubstanz.

Zur nochmaligen Evaluation der Verträglichkeit dieser Gemische mit der Intraokularlinse wurden je 2 ml zusammen mit einer IOL in ein Glasgefäß gegeben. Als Kontrolle diente eine IOL in 2 ml destillierten Wasser. Im Folgenden wurden die IOL nach bestimmten Zeitabständen auf deren Intaktheit getestet. Dabei wurden sie mit einer neuwertigen IOL verglichen. Als Nächstes wurde die Dauer des Verdampfens der Lösungsmittelgemische untersucht. Hierzu wurde je 1 ml in ein Rollrandglas gefüllt und bei 37 °C über 11,5 h beobachtet. Das Verdampfen der Flüssigkeiten wurde anhand deren Masse mittels einer Feinwaage (OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Schweiz) quantifiziert. Zuletzt wurden 50 µl der sieben bewährtesten Lösungsmittelgemische auf eine Acrylplatte gegeben und die Zeit bis zu deren vollständigem Verdampfen gestoppt.

In einem letzten Teilversuch sollte die Löslichkeit der verschiedenen PLGAs und des PLA durch das ermittelte Lösungsmittelgemisch getestet werden. Hierfür wurden 10 ml, 20 ml, 30 ml und 50 ml bestehend aus 30 % Aceton und 70 % Methanol in Glasgefäße (100 ml Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) abgefüllt. Für jedes Volumen wurden je 5 mg PLGA 50:50, PLGA 75:25, PLGA 85:15 und PLA hinzugegeben. Die Gemische wurden in klar, trüb und flockig kategorisiert.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Auswahl der MTX-Konzentrationen

In bereits vorangegangenen Versuchen zeigte Methotrexat eine Proliferationshemmung von Linsenepithelzellen (FHL-124) bei einer mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) von 98.0 ± 29.7 nM.³⁶ Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden Konzentrationen, welche um diese EC_{50} liegen gewählt (10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M und 2 μ M).

2.4.2 Das humane Kapselsackmodell und Quantifizierung des Nachstars

Es wurden 27 humane Bulbi von 21 Hornhautspendern (Alter 60 ± 16 Jahre) durch die Hornhautbank der LMU bereitgestellt. Bei keinem der Spender war eine ophthalmologische Erkrankung bekannt. Die Gewinnung der Gewebe sowie damit durchgeführte Versuche wurden im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und der Zustimmung der lokalen Ethikkommission durchgeführt (LMU München, Projektnummer: 73416). Alle Bulbi wurden innerhalb von zwei Tagen nach Feststellen des Todes präpariert. Dabei wurde die Methode nach Cleary et al⁴⁶ befolgt. Anschließend wurden die Kapselsäcke in 5 ml MEM Earle's Medium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mit 5 % fetalem Kälberserum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) sowie 50 IU Penicillin/ml und 50 μ g Streptomycin/ml (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) unter standardisierten Zellkulturbedingungen bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Inkubator (Hera Cell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) kultiviert. Für die Behandlung mit unterschiedlichen MTX-Konzentrationen wurde das Medium mit 1 % einer steril filtrierten MTX-PBS-Lösung versetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Zur Quantifizierung des Bewuchses der hinteren Linsenkapsel über die Dauer der Behandlung wurde im Abstand von zwei Tagen ein Foto mittels Stereomikroskop (Stemi 508, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) angefertigt. Im Anschluss konnte der Anteil der

zellfreien Fläche an der gesamten Fläche der hinteren Linsenkapsel ausgemessen werden. Zur Auswertung der Fotos wurde ImageJ 1.8.0_172 (NIH, Bethesda, MD, USA) herangezogen. Parameter wie Beschädigung der hinteren Kapsel, Ablösen des Kapselsacks von den Zonulafasern oder Trübung des Mediums führten zum Ausschluss des Probenmaterials aus der Auswertung.

2.4.3 Zellkultur mit FHL-124

Zur Kultivierung der Zelllinie FHL-124 (freundlicherweise bereitgestellt von M. Wormstone, Großbritannien)⁴⁷ wurde MEM Earle's Medium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mit 10 % FCS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) sowie 50 IU Penicillin/ml und 50 µg Streptomycin/ml (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verwendet und unter standardisierten Zellkulturbedingungen bei 37°C und 5 % CO₂ in unbeschichteten Zellkulturflaschen (NUNC, Langenselbold, Deutschland) inkubiert. Ein Mediumwechsel mit je 12 ml Medium erfolgte jeden zweiten Tag. Bei Konfluenz des Gefäßbodens wurden die Zellen subkultiviert. Versene 1:5000, versetzt mit 2,5 % Trypsin (Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Deutschland) wurde zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche verwendet. Zur Behandlung der Zelllinie FHL-124 mit MTX wurden die Zellen mittels der Zählkammer nach Neubauer ausgezählt. Es wurden je 6000 Zellen pro Well einer auf einer Zellkulturplatte mit 24 Well (Sarstedt AG und CoKG, Nümbrecht, Deutschland) ausgesät. Zur Behandlung mit MTX wurde das Zellkulturmedium mit 1 % einer steril filtrierten MTX-PBS-Lösung versetzt, um eine finale Konzentration von 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM oder 2 µM zu erreichen. Zwei weitere Wells dienten der Kontrolle ohne MTX. Am selben Tag und in Folge jeden zweiten Tag, wurden die Zellen im Zentrum eines jeden Wells mithilfe eines Phasen-Kontrast-Mikroskops DFC 295 (Leica Microsystems, Solms, Deutschland) fotografiert. Die bewachsene Fläche wurde zur Auswertung gegen die zellfreie Fläche der Wells unter Verwendung von ImageJ 1.8.0_172 (NIH, Bethesda, MD, USA) in Relation gesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag mit einer FCS-Konzentration von 5 %.

2.4.4 3D-Zellkultur-Gele

Um die dreidimensionalen Vorgänge im Kapselsack besser zu verstehen, wurden FHL-124 in Gele gegossen und über zwölf Tage beobachtet. Hierfür wurden zuerst zwei verschiedenen Lösungen hergestellt. Für die Erste wurde eine 0,7 M NaOH-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) angesetzt und 1:1 mit

HEPES-Puffer 1 M (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) gemischt. Für die zweite Lösung wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium-low glucose (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) 1:1 mit der ersten Lösung versetzt. Der pH sollte dabei zwischen 7,90 und 8,05 liegen, was mit pH-Papier (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) validiert wurde. Als Nächstes wurde die zweite Lösung 1:5 mit Collagen G (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) gemischt. FHL-124 einer konfluenten Zellkulturflasche wurden in 200 µl PBS (Dulbecco, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) resuspendiert und zu 3 ml des Collagen G haltigen Gemisches gegeben. Zuletzt wurden je 400 µl Gel in sechs Wells einer 24-Wellplatte (Sarstedt AG und CoKG, Nümbrecht, Deutschland) mit Zellen und in ein Well Gel ohne Zellen gegeben. Die Gele wurden zum Aushärten über Nacht unter standardisierten Zellkulturbedingungen bei 37°C und 5 % CO₂ in den Inkubator gegeben. Am nächsten Tag wurden die Gele vorsichtig von den Wells getrennt und mit je 800 µl MEM Earle's Medium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mit 5 % FCS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) sowie 50 IU Penicillin/ml und 50 µg Streptomycin/ml (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) kultiviert. Für die Behandlung mit unterschiedlichen MTX-Konzentrationen wurde das Medium mit 1 % einer steril filtrierten MTX-PBS-Lösung versetzt. Mediumwechsel und Fotodokumentation erfolgte jeden zweiten Tag. Die Auswertung durch Bemessung der Kreisoberfläche über die Zeit wurde ImageJ 1.8.0_172 (NIH, Bethesda, MD, USA) verwendet.

2.5 Immunhistochemische Färbung der Kapselsäcke

Nach beobachteter Konfluenz der hinteren Linsenkapsel mit Zellen, wurden alle humanen Kapselsäcke immunhistochemisch gefärbt. Zuerst wurde der Kapselsack zwei Mal mit Phosphatpuffer (PBS Dulbecco, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) gewaschen und anschließend in 4 % Formaldehyd für 10 min fixiert. Danach wurde mit Phosphatpuffer 0,1 M (1:1 Na₂HPO₄ x 2H₂O + NaH₂PO₄ x H₂O in destilliertem Wasser) drei Mal gewaschen. Als Nächstes wurde der Kapselsack vom Ziliarkörper getrennt und die Intraokularlinse entfernt. Die hintere Kapsel wurde in vier Teile geschnitten und jeweils mit einer entomologischen Nadel in einer Zellkulturplatte fixiert. Die Gewebestücke wurden mit Blockingsolution (3% bovines Serumalbumin, 0,1% Triton X 100 in 0,1 M Phosphatpuffer) bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absaugen der übrigen Blockingsolution konnten Antikörper appliziert werden. Dabei wurden ein primärer Antikörper gegen Fibronectin (rabbit monoclonal, Sigma Aldrich, St. Louis,

MO, USA) und ein Cy3 konjugierter Antikörper zur Anfärbung von α SMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1:50 mit Phosphatpuffer verdünnt. Die Kapselsackstücke wurden über Nacht bei 4 °C gelagert. Im Anschluss wurde drei Mal mit Phosphatpuffer 0,1 M gewaschen und Alexa Fluor 555 (goat anti-rabbit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zur Färbung des Fibronektins 1:500 verdünnt dazugegeben. F-Aktin wurde mit Alexa Fluor 488 konjugiertem Phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1:100 verdünnt angefärbt. Nach erneuten drei Waschgängen mit Phosphatpuffer 0,1 M wurde Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1:2000 mit Phosphatpuffer 0,1 M verdünnt und für fünf Minuten auf die Kapselsackstücke gegeben. Anschließend wurde erneut drei Mal mit Phosphatpuffer 0,1 M gewaschen. Die Gewebestücke wurden auf Objektträger in Antifade Mounting for Fluorescence Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) gelegt und mit einem Deckglas versehen.

2.6 Statistische Analyse

Tabellen und Graphen wurden mit EXCEL 365 (Microsoft, Redmond, WA, USA) und GraphPad PRISM 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) erstellt. Daten wurden durch Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung (SD für Standard Deviation) verarbeitet. Zum Vergleich mehrere Gruppen wurde ein one-way ANOVA und least significant difference (LSD) post hoc Test mittels SPSS 27 (IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittelgemisches

Die IOL soll mit einem Gemisch aus MTX und Polymer als Trägersubstanz mittels Verdampfens beschichtet werden. Dafür muss das Gemisch zwei Eigenschaften besitzen. Zum einen muss PLGA gelöst werden und zum anderen soll dabei die IOL, die selbst aus einem Polymer besteht, nicht zu Schaden kommen. Diese beiden Eigenschaften wurden in einem ersten Versuch getrennt voneinander untersucht (**Tabelle 3**). Aceton, Dichlormethan, Ethylacetat, Methylacetat und Trichlormethan lösten PLGA, beschädigten aber gleichzeitig die IOL (bspw. Abgelöste Haptik oder Riss in der Optik). Ethanol, Methanol und Propan-2-ol zerstörten makroskopisch die IOL nicht, lösten jedoch kein PLGA. Um eine Beschichtung der IOL mit MTX zu erreichen, ist es jedoch essenziell einen Kompromiss aus beiden Eigenschaften zu erreichen. Daraufhin wurden Lösungsmittel, welche PLGA gut lösten in absteigendem Verhältnis mit Ethanol oder Methanol gemischt, welche wiederum keine Beschädigung der IOL zur Folge hatten.

Lösungsmittel	100% Lösungsmittel		[%] in Ethanol				[%] in Methanol			
	PLGA Löslichkeit	Beschädigung der IOL	80	60	40	20	80	60	40	20
Aceton	G	B	TG	TG	TG	NG	TG	TG	TG	TG
Dichlormethan	G	B	TG	Nicht mischbar			G	G	TG	TG
Ethanol	NG	I								
Ethylacetat	G	B	TG	TG	NG	NG	TG	TG	TG	NG
Methanol	NG	I								
Methylacetat	G	B	TG	TG	TG	NG	G	TG	TG	TG
Phenylmethanol	TG	B	TG	TG	NG	NG	Nicht mischbar			
Triacetin	TG	B	TG	TG	TG	NG	Nicht mischbar			
Propan-2-ol	NG	I	NG	NG	NG	NG	TG	TG	TG	NG
Trichlormethan	G	B	Nicht mischbar				Nicht mischbar			

Tabelle 3: Lösungsmittel(-gemische) und deren Auswirkungen auf PLGA-Löslichkeit und Intaktheit der IOL. Die Löslichkeit von PLGA wird in gelöst (G), teilweise gelöst (TG) und nicht gelöst (NG) eingeteilt. Die IOL wird in beschädigt (B) oder Intakt (I) kategorisiert. Gezeigt sind die Ergebnisse eines durchgeführten Versuchs.

Die daraufhin ermittelten Lösungsmittelgemische, die PLGA teilweise oder komplett lösen konnten wurden nochmals auf deren Verträglichkeit mit der IOL untersucht. Vielversprechend erwiesen sich Gemische mit Aceton, Methylacetat und Propan-2-ol (

Lösungsmittelgemisch	Zeit [Stunden]						
	0	0.5	1	2	4	8	12
20 % Aceton + 80% Methanol	I	I	I	B	B	B	
30 % Aceton + 70 % Methanol	I	I	I	B	B		
40 % Aceton + 60 % Ethanol	I	B	B	B			
20 % Methylacetat + 80 % Methanol	I	I	I	I	I	B	B
40 % Methylacetat + 60 % Ethanol	B	B	B	B			
40 % Ethylacetat + 60 % Methanol	B	B	B				
40 % Propan-2-ol + 60 % Methanol	I	I	I	I	I	I	I
40 % Triacetin + 60 % Ethanol	I	B	B	B			

Tabelle 4), da die Intaktheit der IOL bei Kontakt über mindestens eine Stunde gegeben war.

Lösungsmittelgemisch	Zeit [Stunden]						
	0	0.5	1	2	4	8	12
20 % Aceton + 80% Methanol	I	I	I	B	B	B	
30 % Aceton + 70 % Methanol	I	I	I	B	B		
40 % Aceton + 60 % Ethanol	I	B	B	B			
20 % Methylacetat + 80 % Methanol	I	I	I	I	I	B	B
40 % Methylacetat + 60 % Ethanol	B	B	B	B			
40 % Ethylacetat + 60 % Methanol	B	B	B				
40 % Propan-2-ol + 60 % Methanol	I	I	I	I	I	I	I
40 % Triacetin + 60 % Ethanol	I	B	B	B			

Tabelle 4: Zustand der IOL nach Kontakt mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen. Die IOL wird nach einer bestimmten Kontaktdauer mit den Lösungsmittelgemischen in Intakt (I) und Beschädigt (B) eingeteilt. Gezeigt sind die Ergebnisse eines durchgeführten Versuchs.

Von den acht unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen wurde das Verdampfungsverhalten von 1 ml Volumen bei 37°C charakterisiert (**Abbildung 3**). Gemische, die Aceton beinhalteten, verdampften dabei am schnellsten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein für die Beschichtung relevantes Volumen von 50 µl verdampft (**Abbildung 4**). 30 % Aceton und 70 % Methanol vereinbarten die teilweise Lösung von PLGA, keine makroskopische Schädigung der IOL bei Kontakt über einer Stunde und ein schnelles Verdampfungsverhalten miteinander.

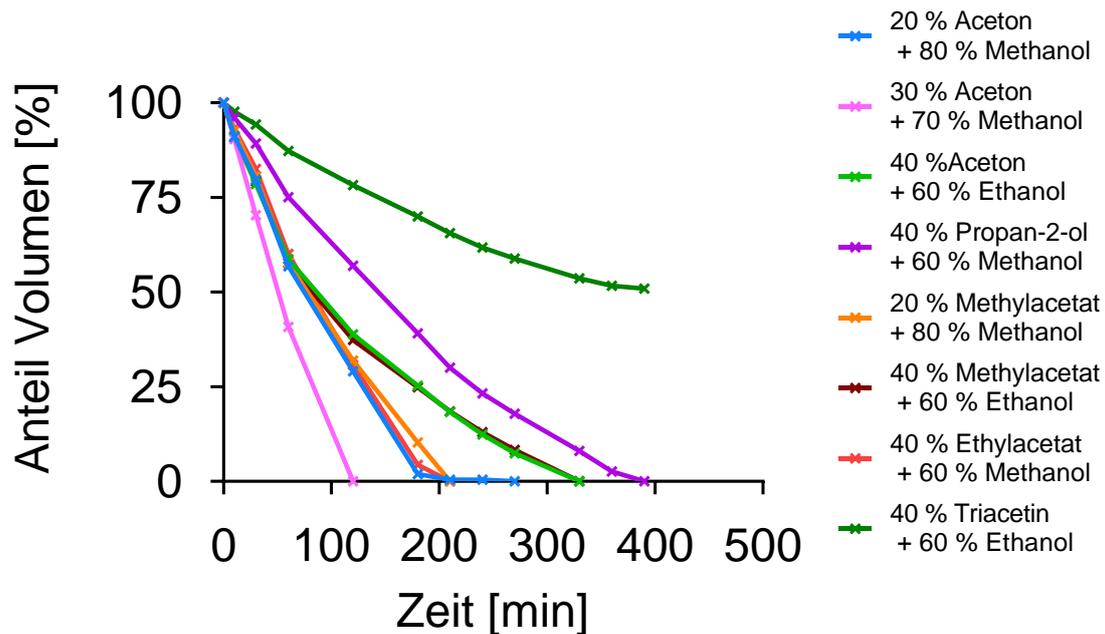


Abbildung 3: Verdampfungsverhalten unterschiedlicher Lösungsmittelgemische. 1 ml eines Lösungsmittelgemisches wurde bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Masse erfolgte mittels Feinwaage. Aufgetragen ist der Anteil des Volumens am ursprünglichen Gesamtvolumen in % gegen die Zeit. Gezeigt sind die Ergebnisse eines durchgeführten Versuchs.

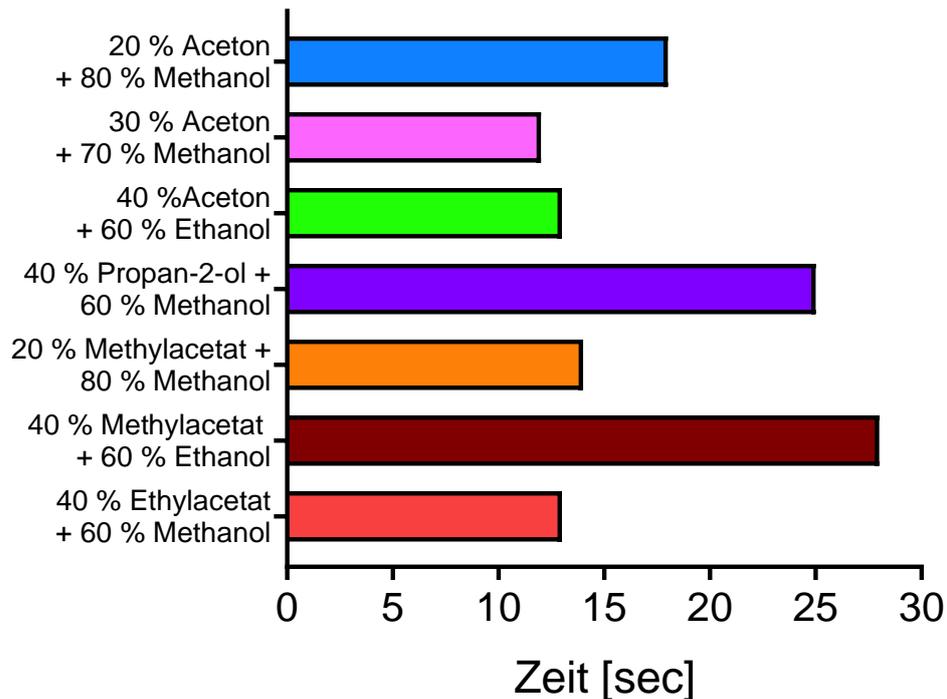


Abbildung 4: Verdampfungsverhalten unterschiedlicher Lösungsmittelgemischttropfen. Zeit bis zum Verdampfen von 50 µl Lösungsmittelgemisch bei Raumtemperatur. Gezeigt sind die Ergebnisse eines durchgeführten Versuchs.

Um die Wirkungsdauer von MTX variieren zu können, wurden unterschiedliche PLGA- bzw. PLA-Zusammensetzungen zur Herstellung des Beschichtungsgemisches verwendet. Drei PLGA mit unterschiedlichem Lactid- und Glycolidanteil, sowie PLA wurden auf deren Löslichkeit im gefundenen Lösungsmittelgemisch von 30 % Aceton und 70 % Methanol untersucht. Bei steigendem Volumen und gleichbleibender Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches sowie gleicher PLGA/PLA Masse fiel eine herabgesetzte Lösbarkeit bei steigendem Lactidanteil auf (

Polymer (Lactid:Glycolid)	Volumen [mL]	10	20	30	40	50
PLGA 50:50		trüb	trüb	trüb	trüb	klar
PLGA 75:25		trüb	trüb	trüb	trüb	klar
PLGA 85:15		flockig	flockig	trüb	trüb	trüb
PLA		flockig	flockig	flockig	flockig	flockig

Tabelle 5).

Polymer (Lactid:Glycolid)	Volumen [mL]	10	20	30	40	50
PLGA 50:50		trüb	trüb	trüb	trüb	klar
PLGA 75:25		trüb	trüb	trüb	trüb	klar
PLGA 85:15		flockig	flockig	trüb	trüb	trüb
PLA		flockig	flockig	flockig	flockig	flockig

Tabelle 5: Löslichkeit von PLGA/PLA in unterschiedlichen Volumina eines Lösungsmittelgemisches aus 30 % Aceton und 70 % Methanol. Bei aufsteigendem Volumen des Lösungsmittelgemisches aus 30 % Aceton und 70 % Methanol wurde die Löslichkeit von unterschiedlichen PLGA-Zusammensetzungen bzw. PLA in klar, trüb und flockig eingeteilt. Gezeigt sind die Ergebnisse eines durchgeführten Versuchs.

3.2 Ermittlung einer MTX-Konzentration

3.2.1 Zellkulturmodelle mit FHL-124

Um verschiedene Vorgänge des Nachstars zu untersuchen, wurden unterschiedliche Versuchsaufbaue *in vitro* verwendet. So konnte der Einfluss des Wirkstoffs auf Proliferation und Kontraktion von Linsenepithelzellen FHL-124 getrennt beobachtet werden.

Zur Untersuchung der Proliferationshemmung durch MTX wurden FHL-124 mit MTX im Medium über mehrere Tage behandelt und der Anteil der bewachsenen Fläche in Zellkultur bestimmt (**Abbildung 5**). An Tag 5 zeigten alle MTX-Konzentrationen eine signifikante Hemmung der Zellproliferation (Ko. – 10nM $p=0.04$; Ko. – 100nM $p<0.001$; Ko. – 500 nM $p<0.001$; Ko. – 1 μM $p<0.001$ und Ko. – 2 μM $p<0.001$).

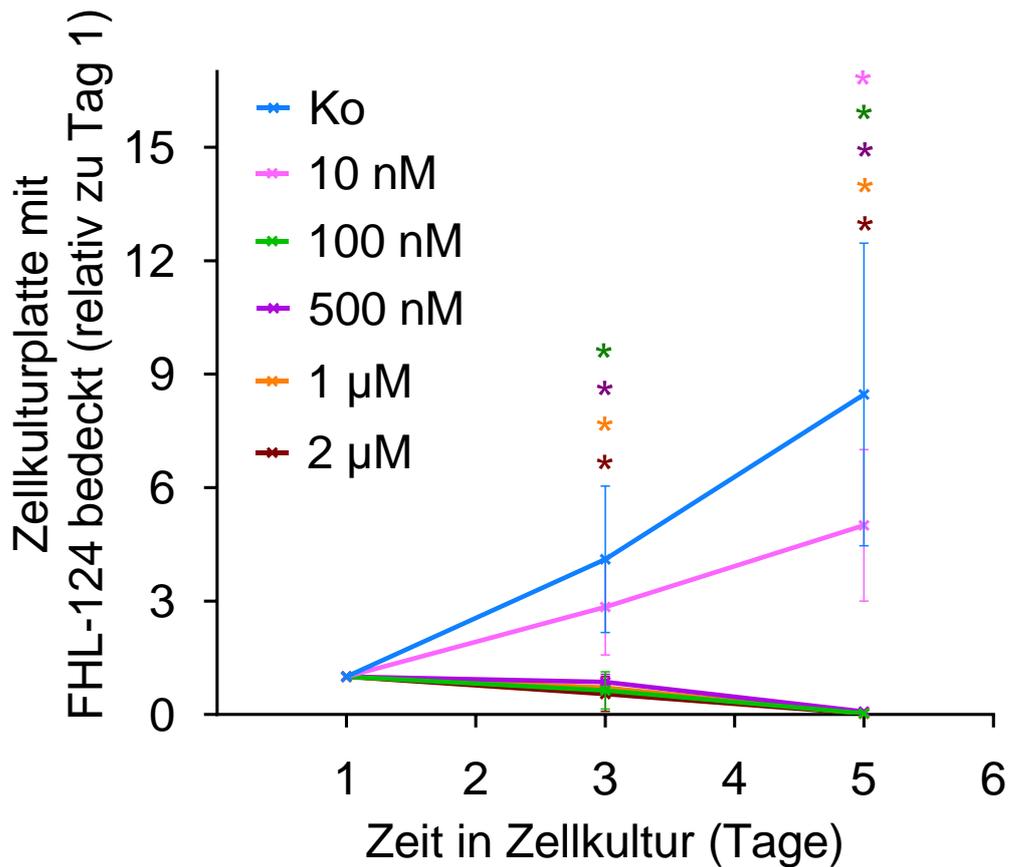


Abbildung 5: Hemmung der Proliferation von FHL-124 *in vitro* durch unterschiedliche MTX-Konzentrationen. (Ko. – 10nM $p=0.04$; Ko. – 100nM $p<0.001$; Ko. – 500 nM $p<0.001$; Ko. – 1 μM $p<0.001$ und Ko. – 2 μM $p<0.001$). Aufgetragen ist die von FHL-124 Zellen bedeckte Fläche normalisiert auf Tag 1 gegen die Zeit in Tagen. Aufsteigende Konzentrationen an MTX wurden getestet. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen \pm SD dar.

Um die Kontraktionsfähigkeit von FHL-124 quantifizieren zu können, wurden Gele mit darin enthaltenen Zellen gegossen und konstant mit unterschiedlichen MTX-Konzentrationen behandelt. Im Folgenden wurde die Kreisoberfläche der Gele gemessen und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen (**Abbildung 6**). MTX zeigte eine signifikante Hemmung der Kontraktion bei einer Konzentration von 1 μM ab Tag 3 (Ko. - 1 μM $p=0.04$) und von 2 μM ab Tag 5 (Ko. - 1 μM $p=0.005$; Ko. - 2 μM $p=0.04$). An Tag 12 konnten die MTX-Konzentrationen 100 nM bis 2 μM im Medium eine Schrumpfung der Gele im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant hemmen (Ko. – 100nM $p=0.01$; Ko. – 500 nM $p=0.003$; Ko. – 1 μM $p<0.001$ and Ko. – 2 μM $p<0.001$) (**Abbildung 6**).

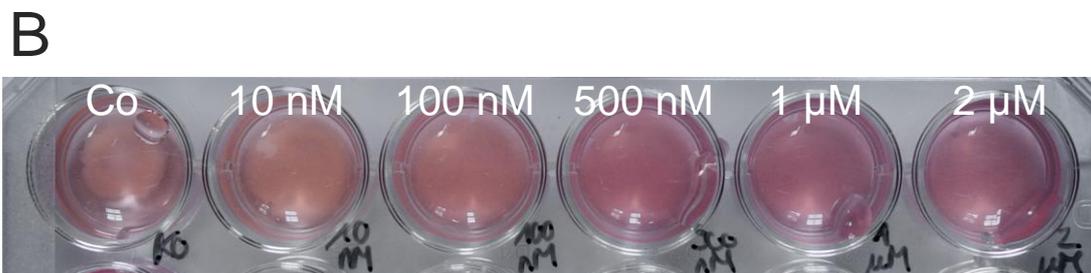
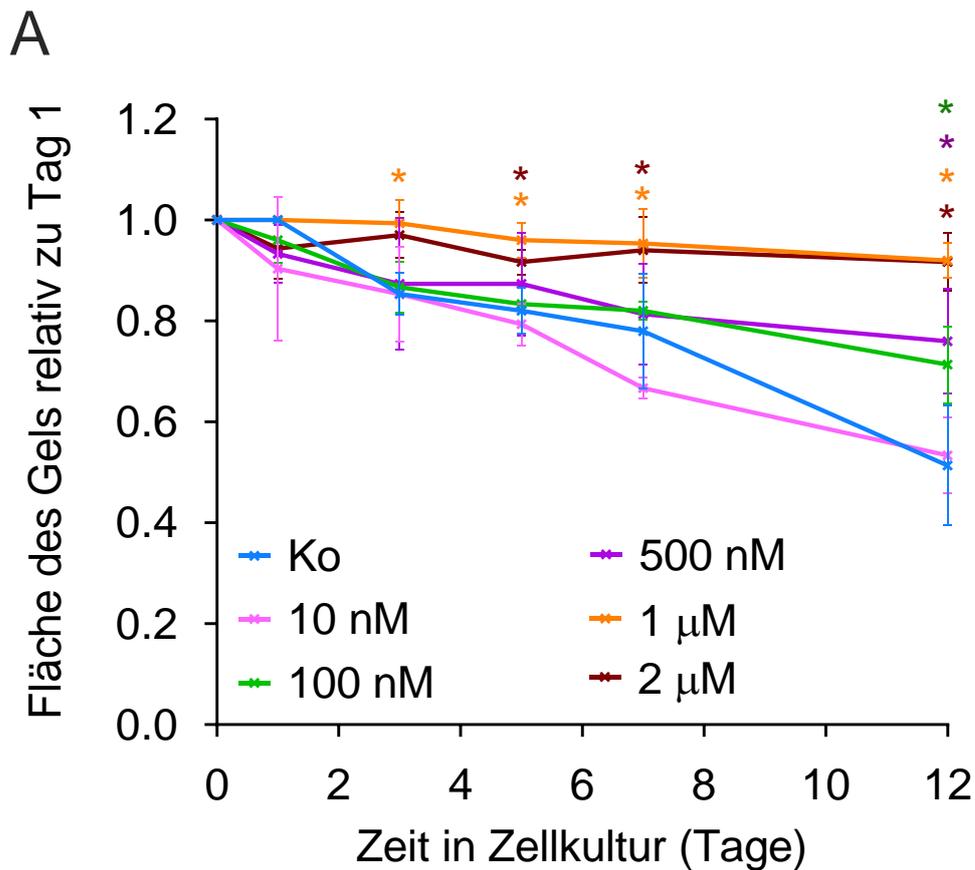


Abbildung 6: Kontraktion von FHL-124 in Gelen bei Behandlung mit unterschiedlichen MTX-Konzentrationen **A:** (Ko. – 100nM $p=0.01$; Ko. – 500 nM $p=0.003$; Ko. – 1 μM $p<0.001$ and Ko. – 2 μM $p<0.001$). Aufgetragen ist die Oberfläche der Gele relativ zu Tag 1 gegen die Zeit in Tagen. Aufsteigende Konzentrationen an MTX wurden getestet. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von drei Versuchen \pm SD dar. **B:** Die Oberfläche der behandelten Gele unterscheidet sich an Tag 12 zur Kontrolle.

3.2.2 Das humane Kapselsackmodell

Zur weiteren Evaluation der konzentrationsabhängigen Wirkung von MTX auf Vorgänge des Nachstars wurden humane Kapselsäcke in Zellkultur untersucht. Dafür wurden IOL implantiert und die Kapselsäcke mit konstanten MTX-Konzentrationen behandelt. Über die Zeit konnte konzentrationsabhängig ein Bewuchs der hinteren Kapsel mit Linsenepithelzellen von peripher nach zentral beobachtet

werden (**Abbildung 7C**). Der Teil, der noch nicht überwachsen war, wurde zur Gesamtfläche der hinteren Kapsel bis zu deren vollständiger Konfluenz in Relation gestellt (**Abbildung 7A**). Bei den unbehandelten Kontrollen dauerte die Konfluenz 19 ± 3 Tage (SD), während bei einer konstanten MTX-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ die Dauer bis zur Konfluenz signifikant auf 39 ± 20 Tage (SD) (Ko - $1 \mu\text{M}$; $p=0.02$; Mittelwertdifferenz: 20 Tage; 95KI: 3 - 38 Tage) gesteigert werden konnte. Darunterliegende MTX-Konzentrationen erreichten das Signifikanzniveau für die Prolongation bis zur Konfluenz nicht (**Abbildung 7B**).

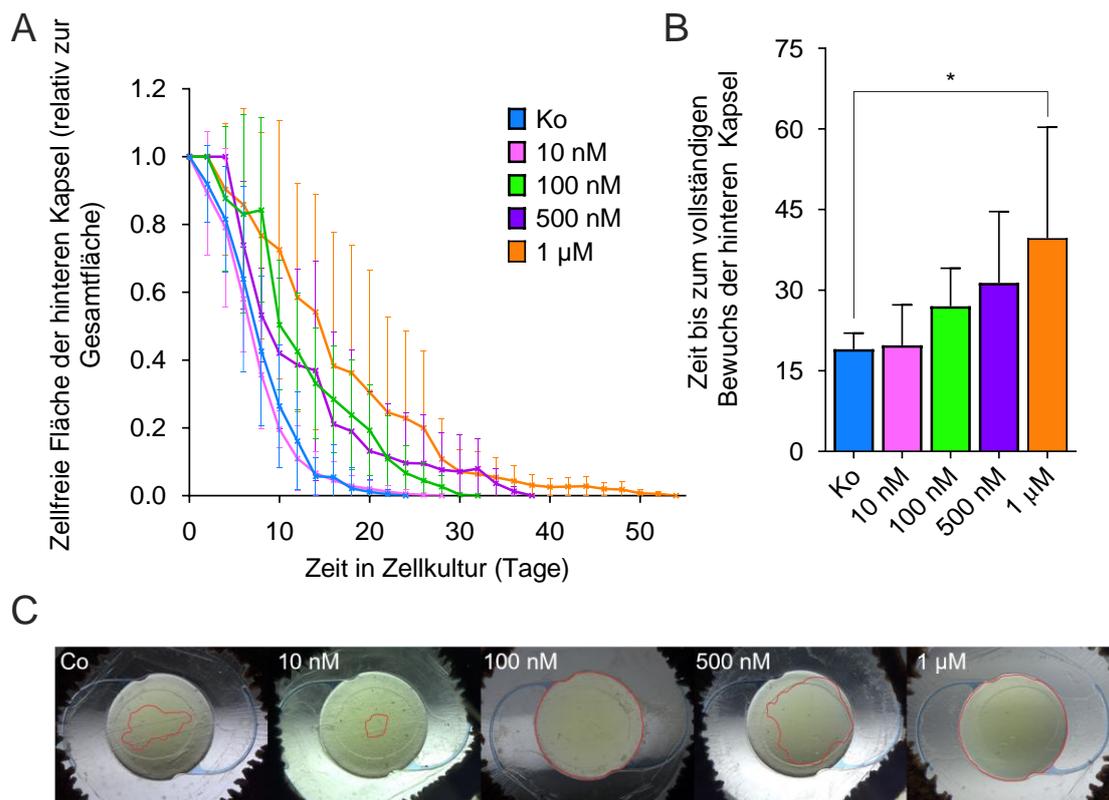


Abbildung 7: Bewuchs der hinteren Kapsel des Kapselsacks im humanen Kapselsackmodell in Abhängigkeit von der MTX-Konzentration. (Ko - $1 \mu\text{M}$; $p=0.02$; Mittelwertdifferenz: 20 Tage; 95KI: 3 - 38 Tage) **A:** Aufgetragen ist der Anteil der zellfreien Fläche der hinteren Kapsel relativ zur Gesamtfläche gegen die Zeit in Tage. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von unabhängigen Versuchen \pm SD dar. Ko $n=5$, 10 nM $n=4$, 100nM $n=2$, 500 nM $n=3$, $1 \mu\text{M}$ $n=3$ **B:** Aufgetragen ist die Zeit bis zum vollständigen Bewuchs der hinteren Kapsel in Tagen gegen die MTX-Konzentrationen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert \pm SD dar. **C:** Die zellfreie Fläche der hinteren Kapsel an Tag 10 ist rot umkreist.

Nach Konfluenz der hinteren Kapsel der Kapselsäcke wurden diese immunhistochemisch angefärbt (**Abbildung 8**). Alle Färbungen wurden von zwei Wissenschaftlern ausgewertet. So zeigte sich bei den unbehandelten Kontrollen durch Verteilung und Expression von f-Aktin ein tendenziell fibroblastischer Phänotyp,

während behandelte Kapselsäcke mit epithelial anmutenden Zellen bewachsen waren. Damit in Einklang stand eine verminderte Expression von α SMA, f-Aktin und Fibronectin in allen mit MTX behandelten Kapselsäcken verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (

Gruppe	Phänotyp	f-Aktin	α-SMA	Fibronectin
Ko	fibroblastisch	+++	++	+++
10 nM	epithelial	+++	++	++
100 nM	epithelial	++	+	++
500 nM	epithelial	++	+	++
1 μM	epithelial	++	++	++

Tabelle 6).

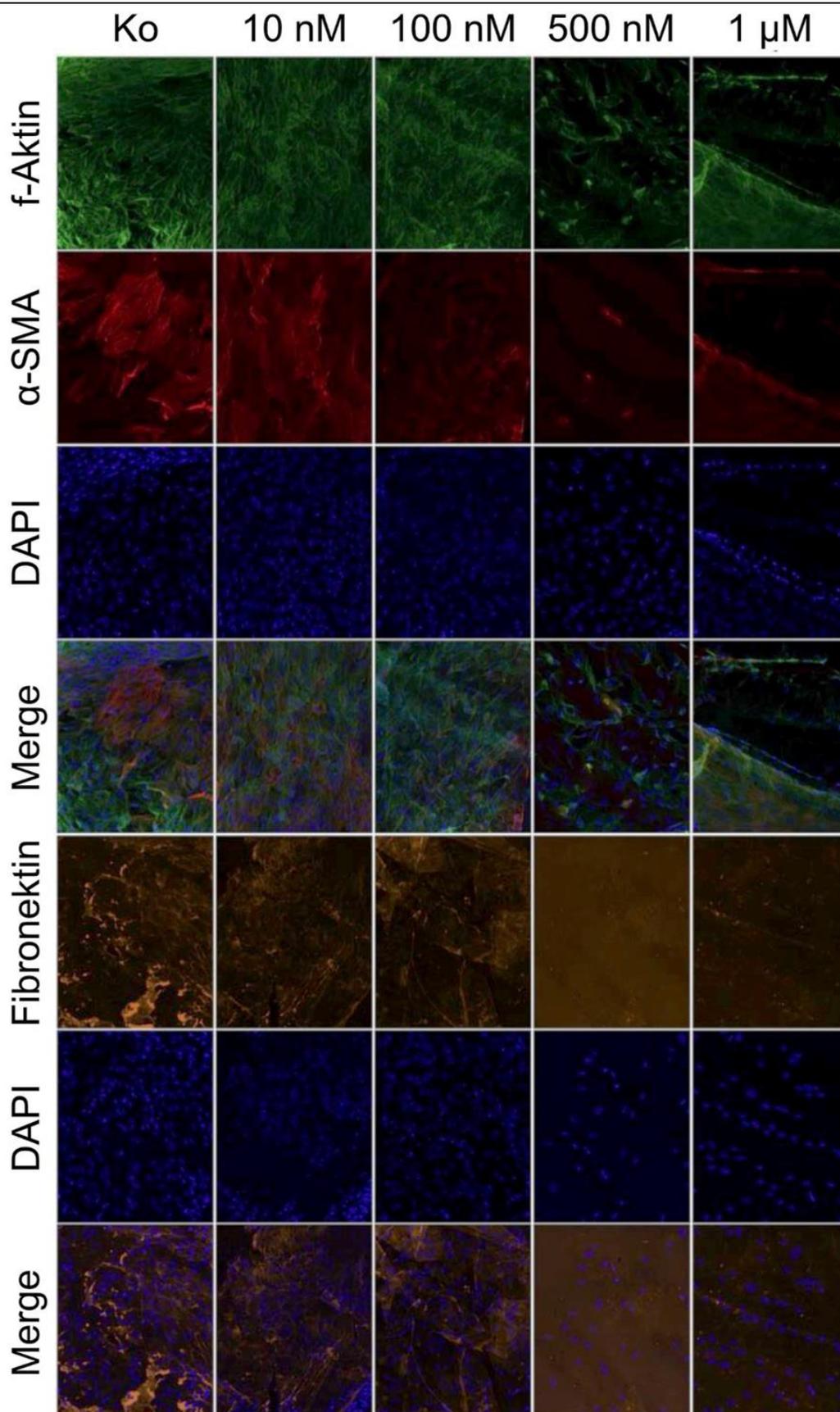


Abbildung 8: Die unbehandelte Kontrolle zeigt einen fibroblastischen Phänotyp und eine stärkere Expression von Fibronektin und α -SMA während in behandelten Gruppen epitheliale Zellen dominieren.

Gruppe	Phänotyp	f-Aktin	α -SMA	Fibronektin
Ko	fibroblastisch	+++	++	+++
10 nM	epithelial	+++	++	++
100 nM	epithelial	++	+	++
500 nM	epithelial	++	+	++
1 μM	epithelial	++	++	++

Tabelle 6: Quantifizierung der angefärbten Marker an der hinteren Kapsel konfluenter humaner Kapselsäcke. Die Expression der Marker wurde von zwei Wissenschaftlern quantifiziert.

4 Diskussion

Eine medikamentenbeschichtete IOL scheint als lokale Therapie im vorderen Augenabschnitt zur Prävention des Nachstars laut diesen Daten vielversprechend. Für die Lösung von PLGA zur Herstellung einer Beschichtungslösung mit MTX konnte ein Lösungsmittelgemisch gefunden werden, das sich für die Beschichtung mittels Verdampfens eignet. In Zellkulturversuchen wurde ein Zielbereich der MTX-Konzentration zur Hemmung verschiedener pathophysiologischer Mechanismen gefunden, in welchem MTX konstant von einer beschichteten IOL abgegeben werden soll.

4.1 Wirkstoffapplikation und Auswahl eines Lösungsmittels

Zur Wirkstoffapplikation gibt es im Wesentlichen drei Methoden: Das Beschichten der Oberfläche der IOL mittels Besprühens und Verdampfens unter Zuhilfenahme eines Lösungsmittels, die Imprägnierung der Oberfläche mittels überkritischem CO₂ sowie das Soaking, bei dem die IOL in eine mit Medikament gesättigte wässrige Lösung für mehrere Tage eingelegt wird.⁴⁰⁻⁴²

Bei der Imprägnierung der IOL-Oberfläche mit Ciprofloxacin und Dexamethason 21-phosphat disodium mittels überkritischem CO₂ bei einem Druck von 80 bis 200 bar und einer Temperatur von 35°C wurde eine Freisetzung des Medikaments für bis zu 45 Tage bzw. 40 Tage gemessen.⁴⁸ Teilweise wurde Ethanol als Lösungsmittel zu überkritischem CO₂ kombiniert.⁴⁸ Mit einem Druck von 80 bzw. 250 bar und einer Temperatur von ca. 35°C beluden Ongkasin et al. durch überkritisches CO₂ eine IOL mit MTX, wobei eine Freisetzung von MTX über mehr als 80 Tage beschrieben wurde.⁴¹ Es konnte anschließend eine Hemmung fibrotischer Vorgänge in vitro gezeigt werden, jedoch führte die medikamentenfreisetzende IOL zu keiner signifikanten Verlängerung der Dauer bis zur Konfluenz der hinteren Kapsel im humanen Kapselsackmodell im Vergleich zur Kontrolle.⁴¹ Eine besser kontrollierte Freisetzung könnte mithilfe eines Polymers wie PLGA ermöglicht werden, um so MTX-Konzentrationen konstant zu erreichen, welche den Nachstar hinauszögern können.^{31, 36}

Zum Einbau eines Polymers wie PLGA mit hohem Molekulargewicht mit dem Ziel, eine kontrollierte Freisetzung zu erreichen, eignet sich überkritisches CO₂ jedoch unter Bedingungen wie einer Temperatur unter 100°C und einem Druck unter 350 bar zur Lösung der meisten Polymere nicht.⁴⁹ Verhältnisse, die über diese Rahmenbedingungen hinausgehen scheinen mit der Unversehrtheit einer IOL nicht vereinbar. Ein weiteres Problem bei der Imprägnierung mit überkritischem CO₂ ist das Schäumen der IOL beim Auf- oder Abbau des Drucks. Dies gilt es zum Erhalt optischer Eigenschaften zu vermeiden, wengleich Techniken beschrieben sind, das Schäumen zu verhindern.⁴⁸

Bei oben genanntem Soaking wird die IOL in eine mit einem Medikament gesättigte wässrige Lösung für mehrere Tage eingelegt.^{40, 50} So konnte beispielsweise die Freisetzung von Erlotinib über 8-13 Tage abhängig von der verwendeten IOL erreicht werden.⁴⁰ PLGA besitzt jedoch hydrophobe Regionen und wird über Hydrolyse abgebaut.³⁹ Ein Auflösen in wässriger Lösung zum Soaking ist daher weder möglich noch sinnvoll.

Soll eine kontrollierte Medikamentenfreisetzung mittels PLGA durch eine IOL erreicht werden, scheint die Beschichtung mittels Besprühens und Verdampfens unter Zuhilfenahme eines Lösungsmittels vorteilhaft. In der Literatur werden verschiedene Lösungsmittel zur Herstellung der Beschichtungslösung verwendet. Tetrahydrofuran, Dichlormethan, Dimethylformamid, Ethylacetat und Chloroform sind Beispiele publizierter Lösungsmittel.^{26, 43, 45, 51} Für einige dieser Lösungsmittel wurden schädigende Auswirkungen bei Kontakt mit der IOL in meiner Arbeit herausgestellt. Zehn unterschiedliche Lösungsmittel wurden auf deren Verträglichkeit mit der IOL und der Lösung von PLGA getestet. Da Lösungsmittel, die PLGA lösten gleichzeitig die IOL beschädigten, wurden Lösungsmittel gemischt, welche PLGA lösten mit denjenigen, die der IOL makroskopisch nicht schaden. Besonders Gemische, in denen Aceton, Methylacetat und Propan-2-ol enthalten waren, zeigten sich geeignet und wurden weiter auf deren Verdampfungsverhalten getestet. Die Kombination aus 30 % Aceton und 70 % Methanol erwies sich in allen Versuchen als vielversprechend. Hierbei ist im Rahmen des Beschichtungsverfahrens ein Kontakt von mindestens einer Stunde zwischen Lösungsmittelgemisch und IOL möglich, ohne makroskopische Veränderungen der IOL hervorzurufen. Dies lässt Freiraum, um unterschiedliche Beschichtungsverfahren mittels Verdampfens zu evaluieren.

4.2 Auswahl und Zusammensetzung eines Polymers

Für die lange und kontrollierte Medikamentenfreisetzung durch eine beschichtete IOL soll der Wirkstoff mit einem Polymer wie PLGA oder PLA kombiniert werden. PLA zeigte im evaluierten Lösungsmittelgemisch jedoch keine Löslichkeit, so dass es für weiterführende Versuche nicht geeignet scheint. Die genaue Abstimmung der Beschichtungslösung beispielsweise des Verhältnisses von Medikament zu Polymer oder die Auswahl des Polymers haben Einfluss auf die spätere Wirkstofffreisetzung.

Zur Anwendung von PLGA für eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung existieren reichlich Daten. Eine beschichtete IOL mit der Kombination aus Rapamycin und PLGA im Verhältnis 50:50 Lactid zu Glycolid führte im Hasenmodell zu einer Verlängerung der Zeitspanne bis zum Auftreten des Nachstars.²⁶ Bei einer unbeschichteten IOL und einer mit lediglich PLGA beschichteten IOL traten ab dem 16. Tag Zeichen eines Nachstars auf, bei der Rapamycin-PLGA-IOL dauerte dies 89 Tage. Das Verhältnis Rapamycin zu PLGA betrug 4:1.²⁶ Bei der Herstellung von medikamentenfreisetzenden Scheiben, die auf die Haptik der IOL aufgehängt wurden, mit Triamcinolonacetonid und PLGA 50:50 wurde der Einfluss eines unterschiedlichen Molekulargewichts derselben PLGA-Zusammensetzung auf die Wirkstofffreisetzung untersucht.⁵² Jede Scheibe wurde mit der gleichen Menge Triamcinolonacetonid und PLGA hergestellt. Bei PLGA mit niedrigerem Molekulargewicht war die freigesetzte Gesamtmenge des Medikaments *in vitro* höher, bei höherem Molekulargewicht zeigte sich eine konstantere Freisetzung ohne Konzentrationsspitzen.⁵² Beim Vergleich der Wirkstofffreisetzung kombiniert mit demselben PLGA *in vivo* im Hasenmodell mit den Ergebnissen *in vitro* wurde Triamcinolonacetonid *in vivo* schneller, in größerer Menge und ohne Konzentrationsspitzen freigesetzt.⁵² Ein gesteigerter Lactidanteil des PLGAs wurde in Verbindung mit Bromfenac untersucht. PLGA 75:25 Lactid zu Glycolid wurde *in vitro* innerhalb von zwei Monaten abgebaut. Bis dahin war Bromfenac nachweisbar, jedoch wurden 81,7 % des Wirkstoffs bereits nach drei Tagen und 91,2 % nach 14 Tagen freigegeben.⁴⁵ Möglich ist hier, dass bei veränderter Anpassung der Verhältnisse von PLGA zu Bromfenac eine konstantere Freisetzung

erreicht werden kann, da PLGA mit höherem Lactidgehalt langsamer abgebaut wird.⁵³

Zur Beeinflussung der Wirkstofffreisetzung kann zu PLGA ein Copolymer in die Beschichtungslösung gegeben werden.⁴⁴ Bei der Kombination aus Dexamethason, PLGA und Polycaprolacton zur Beschichtung von Silikonsubstraten bildeten sich Nanoporen, in denen sich der Wirkstoff ansammelte. Dexamethason wurde *in vitro* mit einem initialen Konzentrationsanstieg in den ersten 24 h, gefolgt von einem exponentiellen Konzentrationsanstieg und zuletzt einer Phase der konstanten Freisetzung über insgesamt 70 Tage freigegeben. Die größte Masse an Dexamethasonfreisetzung wurde bei einem Mischverhältnis PLGA/Polycaprolacton zu Dexamethason 2:1 erreicht.⁴⁴

Unterschiedliche PLGA-Zusammensetzungen wurden in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Löslichkeit in einem Lösungsmittelgemisch aus 30 % Aceton und 70 % Methanol untersucht. Je höher der Anteil des Lactids war, desto schlechter war PLGA löslich. PLA zeigte keine Löslichkeit im Lösungsmittelgemisch. Eine Kombination aus PLGA unterschiedlicher Lactid- und Glycolidverhältnisse ist bis zu einer Zusammensetzung von 85:15 Lactid:Glycolid laut den Daten dieser Arbeit möglich. Weiter evaluiert werden muss in zukünftigen Studien, welche Kombination zu einer konstanten Medikamentenfreisetzung führen wird.

4.3 Intraokuläre Anwendung von MTX

In Zellkulturmodellen wurde in dieser Arbeit ein Konzentrationsbereich von 100 nM bis 1 µM MTX ermittelt, um Vorgänge des Nachstars zu hemmen. Innerhalb dieses Bereichs soll eine medikamentenfreisetzende Intraokularlinse den Wirkstoff kontrolliert und kontinuierlich abgeben.

MTX ist in der intraokulären Anwendung vor allem als intravitreale Injektion bekannt. Beispielsweise wird bei vitreoretinalen Lymphomen ein Therapieregime mit 25 Injektionen a 400 µg MTX über ein Jahr befolgt.⁵⁴ Die Frequenz der Injektionen nimmt im Laufe der Therapie ab. Eine häufige Nebenwirkung ist dabei die Keratopathie, die von ihrem Schweregrad von Keratitis superficialis punctata bis zur schweren Epitheliopathie beschrieben wird. Berichtet wird das Auftreten

üblicherweise nach drei Injektionen. Sie bildete sich bei größer werdenden Intervallen zwischen den Injektionen zurück.^{54, 55} Wird parallel Folsäure oral substituiert, wurde ein deutlicher Rückgang der Keratopathie innerhalb einer Woche erzielt.⁵⁶ Seltener kam ein erhöhter Augeninnendruck durch Neovaskularisationen vor, welche operativ behandelt werden mussten. Bei zwei von 26 Patient/innen führten die intravitrealen MTX-Injektionen zu schweren Entzündungsreaktionen wie steriler Endophthalmitis oder Vorderkammerreaktion. Beides konnte mit topischen Steroiden behandelt werden.⁵⁴ Des Weiteren wird ein Katarakt-Progress beobachtet.⁵⁴ Bei der intravitrealen Injektion von MTX-PLGA-Implantaten im Hasenmodell wurde eine Konzentration von 0,1-1,0 μM MTX von Tag 3 bis Tag 56 erreicht, wobei am ersten Tag eine erhöhte Konzentration von 28,88 μM gemessen wurde.⁵⁷ Beim Vergleich mit MTX-freien Implantaten wurde kein toxischer Effekt durch das MTX-haltige Implantat auf die Retina festgestellt, die Kornea blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum klar und der intraokuläre Druck unterschied sich nicht.⁵⁸ Der freigesetzte MTX-Konzentrationsbereich entspricht dem in dieser Arbeit ermittelten Bereich, der laut Zellkulturversuchen einen Nachstar hemmen kann.

Soll zur Hemmung des Nachstars beispielsweise eine Freisetzung von MTX über 40 Tage im Bereich von 100 nM bis 1 μM erreicht werden, würde die IOL über die gesamte Dauer 4-40 μM MTX freigeben. Eine intravitreale Injektion wie bei der Lymphomtherapie angewandt, enthält das zehnfache bis hundertfache an Wirkstoff. Häufige Nebenwirkungen werden ab drei Injektionen beobachtet.⁵⁴ Zu vermuten ist daher, dass im gewünschten Konzentrationsbereich selten und wenig Nebenwirkungen zu erwarten sind. Studien zur intraokulären Anwendung von MTX existieren meines besten Wissens nach bisher jedoch nur zur intravitrealen Applikation. Bei der medikamentenfreisetzenden IOL wird der Wirkstoff direkt in den Kapselsack abgegeben. Die anatomischen Kompartimente und damit einhergehende pharmakokinetische Vorgänge sind möglicherweise unterschiedlich. Zur tatsächlichen Abschätzung von Nebenwirkungen fehlen derzeit Daten *in vivo*.

4.4 Ermittlung einer geeigneten MTX-Konzentration zur Nachstarhemmung

Eine Proliferationshemmung konnte bei FHL-124 bereits ab einer MTX-Konzentration von 10 nM erreicht werden. Kontraktionen als Zeichen der myofibroblastischen Transformation von in Gele gegossenen FHL-124 wurden ab einer MTX-Konzentration von 100 nM signifikant gehemmt. Bei der Behandlung humaner Kapselsäcke konnte der Bewuchs der hinteren Kapsel erst ab einer Konzentration von 1 μ M signifikant verzögert werden. Eine darauffolgende immunhistochemische Färbung wies auf eine verminderte Expression von Fibrosemarkern in behandelten Proben hin, bot aber diesbezüglich keine konzentrationsabhängige Aussage. Anzunehmen ist anhand dieser Ergebnisse, dass sich die konstante MTX-Konzentration, welche von einer beschichteten IOL abgegeben werden soll, zwischen 100 nM und 1 μ M zur Hemmung des Nachstars befindet. Inwieweit diese Ergebnisse sich auf die Physiologie *in vivo* übertragen lassen, müssen zukünftige klinische Studien zeigen.

4.5 Limitationen einer medikamentenbeschichteten Intraokularlinse

Eine medikamentenbeschichtete IOL birgt Herausforderungen. Optische Eigenschaften müssen erhalten bleiben. Bei dem Besprühen von MTX und PLGA in Isopropanol auf eine IOL wurden keine makroskopischen Transparenzveränderungen der IOL festgestellt.⁴² Die Beschichtung einer IOL mit PLGA, Polycaprolacton und Dexamethason führte zu einer aufgerauten Oberfläche, dies bedingte jedoch keine Veränderungen der optischen Eigenschaften.⁴³ Es wurde gezeigt, dass Veränderungen der optischen Eigenschaften, die durch die Medikamentenbeladung entstehen, nach Freisetzung fast vollständig reversibel sein können.⁵⁹ Untersucht wurde hierbei die Modulationsübertragungsfunktion als Parameter für die Bildqualität, die spektrale Transmission und die Brechkraft einer beschichteten und unbeschichteten IOL bzw. einer beschichteten IOL, die den Wirkstoff bereits vollständig abgegeben hat.⁵⁹ Bei der beschichteten IOL war die Modulationsübertragungsfunktion herabgesetzt, nach Freisetzung des Medikaments jedoch der der unbehandelten IOL nahezu identisch. Die spektrale Transmission war durch die Beschichtung nur minimal reduziert und der einer unbehandelten

IOL nach Medikamentenfreisetzung ebenbürtig. Die Beschichtung zeigte keinen Einfluss auf die Brechkraft der IOL.⁵⁹

Zur Vermeidung der Beeinflussung optischer Eigenschaften kann die Optik bei der Beschichtung ausgespart werden. Beschrieben sind beispielsweise die Beschichtung des Rands der IOL oder der Haptiken und die Produktion eines medikamentenfreisetzenden Rings um die Optik.^{26, 45, 51} Makroskopische Veränderungen der IOL nach Kontakt mit in der Literatur verwendeten Lösungsmitteln zur Beschichtung wurden in dieser Arbeit gezeigt. Besonders bei einer dreiteiligen IOL muss außerhalb der optischen Eigenschaften auch an die Intaktheit der anhaftenden Haptiken gedacht werden, welche sich durch Lösungsmittel in Versuchen abgelöst haben.

Eine Beschichtung der IOL wird mit der Synthese von Implantaten völlig verhindert. Berichtet wird von Scheiben, die an die Haptiken aufgehängt werden oder Medikamentendepots, welche der Optik anhängen.^{52, 60}

Limitierend wirkt sich außerdem ein Erhalt der Faltpbarkeit der IOL aus. Sie führt zu kleineren Inzisionen während der Operation und zu damit verbundener geringerer Wundfläche.¹ Bei zusätzlichen medikamentenfreisetzenden Implantaten ist die Erhaltung der Faltpbarkeit nicht möglich.^{52, 60} Bei der Beschichtung einer IOL mit PLGA, Polycaprolacton und Dexamethason waren Beschädigungen des Films nach Falten der IOL zu erkennen, die Beschichtung blätterte aber nicht ab.⁴³

4.6 Ausblick

Versuche haben gezeigt, dass MTX ein geeignetes Medikament zur Hemmung des Nachstars ist.^{36, 42} Es konnte ein Lösungsmittelgemisch gefunden werden, welches die Kombination aus MTX und PLGA erlaubt und gleichzeitig der IOL makroskopisch bis zum Verdampfen des Lösungsmittelgemisches keinen Schaden zufügt. Zukünftig wird die Zusammensetzung aus PLGA unterschiedlicher Lactid- und Glycolidanteile und MTX evaluiert werden müssen, um eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs im ermittelten Konzentrationsbereich zu erreichen. Eine detaillierte Beschichtungstechnik hinsichtlich der Applikationsart und einfacher oder mehrfacher Beschichtung wird entwickelt werden müssen. Der erarbeitete Konzentrationsbereich von MTX *in vitro* scheint im Vergleich mit

intraokulär angewendeten MTX-Konzentrationen nebenwirkungsarm zu sein. Hierzu werden *in vivo* Experimente folgen müssen, um tatsächliche Nebenwirkungen einer direkten Freisetzung von MTX ins Kammerwasser im Vergleich zur bisher angewandten intravitrealen Injektion abschätzen zu können. Die Voraussetzungen für weitere Entwicklungen einer medikamentenbeschichteten IOL mit MTX und PLGA zur Nachstarprophylaxe wurden geschaffen.

Zusammenfassung

Die Katarakt-OP gilt als eine der häufigsten operativen Eingriffe in der Ophthalmologie. Eine der Hauptkomplikationen stellt die Entstehung des Nachstars dar. Dabei wachsen verbleibende Linsenepithelzellen nach Entfernung der getrübten Linse über die hintere Kapsel des Kapselsacks in den Bereich der optischen Achse ein. Im Rahmen einer Wundheilungsreaktion erfolgt eine myofibroblastische Transformation der Zellen und eine Veränderung der extrazellulären Matrix. Daraus resultiert eine stark verminderte Sehleistung. Zur Prophylaxe wurden bereits unterschiedliche pharmakologische Ansätze publiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass MTX das Wachstum von Linsenepithelzellen *in vitro* hemmen kann, ohne toxisch auf Linsenepithel- oder Endothelzellen zu wirken. Um den Wirkstoff möglichst nah an den Ort der pathophysiologischen Vorgänge zu applizieren und Nebenwirkung durch geringere wirkungsvolle Konzentrationen zu minimieren, scheint eine medikamentenbeschichtete IOL vorteilhaft. Zur kontinuierlichen und verlängerten Freisetzung des Wirkstoffs, soll die IOL mit MTX und dem Polymer PLGA mittels Verdampfens beschichtet werden.

Zur Herstellung der Beschichtungslösung muss ein Lösungsmittel gefunden werden, das PLGA löst, aber gleichzeitig der IOL, die selbst ein Polymer ist, nicht schadet. Außerdem muss ein Konzentrationsbereich von MTX *in vitro* ermittelt werden, in welchem unterschiedliche Pathomechanismen des Nachstars gehemmt werden können.

Zehn unterschiedliche Lösungsmittel wurden auf deren Verträglichkeit bezüglich der IOL und der Löslichkeit von PLGA getestet. Dabei wurden Lösungsmittel, welche PLGA lösen konnten mit Lösungsmitteln, die der IOL nicht schaden, kombiniert. Im Anschluss wurde die Dauer bis zum Verdampfen der Lösungsmittelgemische untersucht.

Zur Evaluation der benötigten MTX-Konzentration zur Proliferationshemmung von Linsenepithelzellen wurden FHL-124 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 10 nM und 2 µM behandelt. Zur Auswertung wurde die freie Fläche der Zellkulturplatte gegen die bewachsene Oberfläche in Relation gestellt. Um den Einfluss von MTX auf die myofibroblastische Transformation *in vitro* zu beobachten, wurden FHL-124 Zellen in Gele gegossen und mit MTX-Konzentrationen zwischen 10 nM und 2 µM behandelt. Im Anschluss wurde die Kreisoberfläche der Gele über 12 Tage verglichen, da bei myofibroblastischer

Transformation eine Kontraktion zu erwarten ist. Humane Kapselsäcke wurden mit einer IOL versehen und mit MTX-Konzentrationen zwischen 10 nM und 1 μ M behandelt. Nach Dokumentation der Dauer bis zur Konfluenz der hinteren Kapsel wurden α -SMA, F-Aktin und Fibronectin immunhistochemisch angefärbt.

Bei der Untersuchung von Lösungsmittelgemischen erwies sich die Kombination aus 30 % Aceton und 70 % Methanol in Bezug auf Löslichkeit von PLGA, Verträglichkeit mit der IOL und Verdampfungsverhalten als vielversprechend.

MTX konnte ab einer Konzentration von 10 nM und einer Behandlungsdauer von fünf Tagen die Proliferation von FHL-124 signifikant hemmen. Die Schrumpfung der Gele und damit die Kontraktion von FHL-124 konnte ab einer MTX-Konzentration von 100 nM bei einer Behandlungsdauer über 12 Tage signifikant vermindert werden. Bei der Beobachtung von humanen Kapselsäcken konnte die Konfluenz der hinteren Kapsel bei einer Konzentration von 1 μ M MTX von 19 ± 3 Tage (SD) in den unbehandelten Kontrollen auf 39 ± 20 Tage (SD) verlängert werden. In der immunhistochemischen Färbung fiel eine verminderte Expression von α -SMA, f-Aktin und Fibronectin im Vergleich zu den Kontrollen auf. Außerdem trat nach MTX-Exposition ein tendenziell epitheloider Phänotyp der Zellen auf, im Gegensatz zu einem fibroblastischen Phänotyp bei der unbehandelten Kontrolle

Eine Lösung von PLGA zur Beschichtung einer IOL scheint mittels eines Lösungsmittels als vorteilhaft. Mit dem gefundenen Lösungsmittelgemisch konnte eine Unversehrtheit der IOL makroskopisch für einen Zeitraum ausreichend zur Verdampfung sichergestellt werden. Der ermittelte MTX-Konzentrationsbereich scheint im Vergleich zu intraokulären MTX-Injektionen gering und lässt eine nebenwirkungsarme Therapie vermuten. Um diesen Konzentrationsbereich für die konstante MTX-Freisetzung durch eine IOL zu erreichen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, beispielsweise das Molekulargewicht und die Zusammensetzung von PLGA zu variieren. Limitierend wirken sich das Erhalten optischer Eigenschaften und die Faltbarkeit der IOL auf die Beschichtung aus. Eine genaue Untersuchung einer mit MTX und PLGA beschichteten IOL auf deren Intaktheit und Medikamentenfreisetzung sowie Experimente *in vivo* müssen in Zukunft erfolgen, um eine neue Therapieoption für den Nachstar zu schaffen.

Literaturverzeichnis

1. Davis G. The Evolution of Cataract Surgery. *Mo Med* 2016;113:58-62.
2. Wormstone IM, Wang L, Liu CS. Posterior capsule opacification. *Exp Eye Res* 2009;88:257-269.
3. Nibourg LM, Gelens E, Kuijer R, Hooymans JM, van Kooten TG, Koopmans SA. Prevention of posterior capsular opacification. *Exp Eye Res* 2015;136:100-115.
4. Wormstone IM. Posterior capsule opacification: a cell biological perspective. *Exp Eye Res* 2002;74:337-347.
5. Ursell PG, Dhariwal M, O'Boyle D, Khan J, Venerus A. 5 year incidence of YAG capsulotomy and PCO after cataract surgery with single-piece monofocal intraocular lenses: a real-world evidence study of 20,763 eyes. *Eye (Lond)* 2020;34:960-968.
6. Kossack N, Schindler C, Weinhold I, et al. German claims data analysis to assess impact of different intraocular lenses on posterior capsule opacification and related healthcare costs. *Z Gesundh Wiss* 2018;26:81-90.
7. Konopińska J, Młynarczyk M, Dmuchowska DA, Obuchowska I. Posterior Capsule Opacification: A Review of Experimental Studies. *J Clin Med* 2021;10.
8. Meacock WR, Spalton DJ, Stanford MR. Role of cytokines in the pathogenesis of posterior capsule opacification. *Br J Ophthalmol* 2000;84:332-336.
9. Jiang J, Shihan MH, Wang Y, Duncan MK. Lens Epithelial Cells Initiate an Inflammatory Response Following Cataract Surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59:4986-4997.
10. Buechler MB, Fu W, Turley SJ. Fibroblast-macrophage reciprocal interactions in health, fibrosis, and cancer. *Immunity* 2021;54:903-915.
11. Mamuya FA, Wang Y, Roop VH, Scheiblin DA, Zajac JC, Duncan MK. The roles of α V integrins in lens EMT and posterior capsular opacification. *J Cell Mol Med* 2014;18:656-670.
12. Hu HH, Chen DQ, Wang YN, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact* 2018;292:76-83.
13. Dawes LJ, Eldred JA, Anderson IK, et al. TGF beta-induced contraction is not promoted by fibronectin-fibronectin receptor interaction, or alpha SMA expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:650-661.
14. Ma B, Kang Q, Qin L, Cui L, Pei C. TGF- β 2 induces transdifferentiation and fibrosis in human lens epithelial cells via regulating gremlin and CTGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;447:689-695.
15. Ma B, Yang L, Jing R, et al. Effects of Interleukin-6 on posterior capsular opacification. *Exp Eye Res* 2018;172:94-103.
16. Lang GK, Esser J, Gareis O, et al. *Augenheilkunde*. Stuttgart: Thieme; 2019.
17. Aron-Rosa DS, Aron JJ, Cohn HC. Use of a pulsed picosecond Nd: YAG laser in 6,664 cases. *J Am Intraocul Implant Soc* 1984;10:35-39.

18. Trinavarat A, Atchaneeyasakul L, Udompunturak S. Neodymium:YAG laser damage threshold of foldable intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:775-780.
19. Ambler JS, Constable IJ. Retinal detachment following Nd:YAG capsulotomy. *Aust N Z J Ophthalmol* 1988;16:337-341.
20. Zhao Y, Yang K, Li J, Huang Y, Zhu S. Comparison of hydrophobic and hydrophilic intraocular lens in preventing posterior capsule opacification after cataract surgery: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e8301.
21. Hazra S, Palui H, Vemuganti GK. Comparison of design of intraocular lens versus the material for PCO prevention. *Int J Ophthalmol* 2012;5:59-63.
22. 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.
23. Menapace R. Routine posterior optic buttonholing for eradication of posterior capsule opacification in adults: report of 500 consecutive cases. *J Cataract Refract Surg* 2006;32:929-943.
24. Nishi O, Nishi K, Menapace R, Akura J. Capsular bending ring to prevent posterior capsule opacification: 2 year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:1359-1365.
25. Mylona I, Tsinopoulos I. A Critical Appraisal of New Developments in Intraocular Lens Modifications and Drug Delivery Systems for the Prevention of Cataract Surgery Complications. *Pharmaceuticals (Basel)* 2020;13.
26. 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.
27. Liu H, Zhang Y, Ma H, Zhang C, Fu S. Comparison of posterior capsule opacification in rabbit eyes receiving different administrations of rapamycin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014;252:1111-1118.
28. An JA, Kasner O, Samek DA, Lévesque V. Evaluation of eyedrop administration by inexperienced patients after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 2014;40:1857-1861.
29. González-Chomón C, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Drug-Eluting Intraocular Lenses. *Materials (Basel)* 2011;4:1927-1940.
30. Anderson EM, Noble ML, Garty S, et al. Sustained release of antibiotic from poly(2-hydroxyethyl methacrylate) to prevent blinding infections after cataract surgery. *Biomaterials* 2009;30:5675-5681.
31. Luk A, Junnarkar G. Critical challenges to the design of drug-eluting medical devices. *Ther Deliv* 2013;4:471-477.
32. Cullin F, Busch T, Lundström 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.
33. Cooksley G, Lacey J, Dymond MK, Sandeman S. Factors Affecting Posterior Capsule Opacification in the Development of Intraocular Lens Materials. *Pharmaceutics* 2021;13.

34. 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.
35. Findl O, Buehl W, Bauer P, Sycha T. Interventions for preventing posterior capsule opacification. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;Cd003738.
36. Wertheimer C, Kassumeh S, Piravej NP, et al. The Intraocular Lens as a Drug Delivery Device: In Vitro Screening of Pharmacologic Substances for the Prophylaxis of Posterior Capsule Opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58:6408-6418.
37. Ma WL, Hou HA, Hsu YJ, et al. Clinical outcomes of primary intraocular lymphoma patients treated with front-line systemic high-dose methotrexate and intravitreal methotrexate injection. *Ann Hematol* 2016;95:593-601.
38. Lewis DH. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. *Biodegradable polymers as drug delivery systems* 1990;1-41.
39. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* 2011;3:1377-1397.
40. 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;96:e874-e882.
41. Ongkasin K, Masmoudi Y, Wertheimer CM, Hillenmayer A, Eibl-Lindner KH, Badens E. Supercritical fluid technology for the development of innovative ophthalmic medical devices: Drug loaded intraocular lenses to mitigate posterior capsule opacification. *Eur J Pharm Biopharm* 2020;149:248-256.
42. Kassumeh SA, Wertheimer CM, von Studnitz A, et al. Poly(lactic-co-glycolic) Acid as a Slow-Release Drug-Carrying Matrix for Methotrexate Coated onto Intraocular Lenses to Conquer Posterior Capsule Opacification. *Curr Eye Res* 2018;43:702-708.
43. Karamitsos A, Lamprogiannis L, Karagkiozaki V, et al. Design, characterisation and drug release study of polymeric, drug-eluting single layer thin films on the surface of intraocular lenses. *IET Nanobiotechnol* 2020;14:501-507.
44. Lamprogiannis L, Karamitsos A, Karagkiozaki V, et al. Design and fabrication of drug-eluting polymeric thin films for applications in ophthalmology. *IET Nanobiotechnol* 2018;12:1074-1079.
45. Zhang X, Lai K, Li S, et al. Drug-eluting intraocular lens with sustained bromfenac release for conquering posterior capsular opacification. *Bioact Mater* 2022;9:343-357.
46. Cleary G, Spalton DJ, Zhang JJ, Marshall J. In vitro lens capsule model for investigation of posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2010;36:1249-1252.
47. Wormstone IM, Tamiya S, Marcantonio JM, Reddan JR. Hepatocyte growth factor function and c-Met expression in human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4216-4222.

-
48. Bouledjoudja A, Masmoudi Y, Sergent M, Trivedi V, Meniai A, Badens E. Drug loading of foldable commercial intraocular lenses using supercritical impregnation. *Int J Pharm* 2016;500:85-99.
49. Davies OR, Lewis AL, Whitaker MJ, Tai H, Shakesheff KM, Howdle SM. Applications of supercritical CO₂ in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:373-387.
50. Vieira AP, Pimenta AFR, Silva D, et al. Surface modification of an intraocular lens material by plasma-assisted grafting with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), for controlled release of moxifloxacin. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;120:52-62.
51. Tan DW, Lim SG, Wong TT, Venkatraman SS. Sustained Antibiotic-Eluting Intra-Ocular Lenses: A New Approach. *PLoS One* 2016;11:e0163857.
52. Eperon S, Bossy-Nobs L, Petropoulos IK, Gurny R, Guex-Crosier Y. A biodegradable drug delivery system for the treatment of postoperative inflammation. *Int J Pharm* 2008;352:240-247.
53. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Ther Deliv* 2015;6:41-58.
54. Frenkel S, Hendler K, Siegal T, Shalom E, Pe'er J. Intravitreal methotrexate for treating vitreoretinal lymphoma: 10 years of experience. *Br J Ophthalmol* 2008;92:383-388.
55. Zhou X, Zhou X, Shi H, et al. Reduced frequency of Intravitreal methotrexate injection lowers the risk of Keratopathy in Vitreoretinal lymphoma patients. *BMC Ophthalmol* 2020;20:189.
56. Gorovoy I, Prechanond T, Abia M, Afshar AR, Stewart JM. Toxic corneal epitheliopathy after intravitreal methotrexate and its treatment with oral folic acid. *Cornea* 2013;32:1171-1173.
57. Manna S, Donnell AM, Faraj RQC, et al. Pharmacokinetics and Toxicity Evaluation of a PLGA and Chitosan-Based Micro-Implant for Sustained Release of Methotrexate in Rabbit Vitreous. *Pharmaceutics* 2021;13.
58. Manna S, Caixeta Faraj RQ, Riemann B, et al. Non-invasive evaluation of toxicity in vitreoretinal domain following insertion of sustained release methotrexate micro-implant. *Exp Eye Res* 2021;205:108505.
59. Artigas JM, García-Domene MC, Navea A, Botella P, Fernández E. Intra-ocular lens optical changes resulting from the loading of dexamethasone. *Biomed Opt Express* 2017;8:4621-4628.
60. Siqueira RC, Filho ER, Fialho SL, et al. Pharmacokinetic and toxicity investigations of a new intraocular lens with a dexamethasone drug delivery system: a pilot study. *Ophthalmologica* 2006;220:338-342.

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst meiner Doktormutter apl. Prof. Dr. med. Claudia Priglinger sowie dem Direktor der Augenklinik der LMU Prof. Dr. med. Siegfried Priglinger, die diese Promotion möglich gemacht haben.

Meinen Betreuern PD Dr. med. Christian Wertheimer und Dr. med. Stefan Kasumeh danke ich für die Bereitstellung des Themas sowie für die zahlreichen kritischen und gleichzeitig produktiven Diskussionen über Ergebnisse, Fortschritt und weiterer Projektplanung. Besonders Christian, als meinen primären Ansprechpartner möchte ich für seinen Einsatz, seinen Rat und seine Mühe danken.

Ich bin überzeugt, dass unsere hitzigen Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als wichtige fachliche und moralische Stütze gilt mein ausdrücklicher Dank meinen Mitpromovierenden. Allen voran Natalie Tersi, die immer ein offenes Ohr hatte und mit großer Hilfsbereitschaft glänzte. Annabel von Studnitz und Dr. med. Anna Hillenmayer danke ich für die Weitergabe ihres Wissens und die Geduld, die sie mir allzeit entgegengebracht haben.

Ich möchte apl. Prof. Dr. med. Andreas Ohlmann als Leiter des Zell- und Molekularbiologischen Labors danken, dass er eine schützende Hand auf alle Promovierenden gehalten hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Danke an meine Familie Birgit, Stefan und Benedikt Bill, die immer mein Bestes im Sinn haben und jederzeit Rückhalt geben.

Als letztes möchte ich meinem Freund Vincenz Buschinger danken, der jedes Hoch und Tief miterlebt und unermüdlich jede neue Korrektur durchgelesen hat. Danke, dass du mir den Rücken stärkst und die größte Stütze bist.

Publikationsliste

Originalartikel

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in

Clarissa Bill, Stefan Kassumeh, Christina Hilterhaus, Natalie Tersi, Arne J Speidel, Andreas Ohlmann, Siegfried Priglinger, Claudia Priglinger, Armin Wolf, Christian M Wertheimer. **Conditions for modifying intraocular lenses as drug carriers for methotrexate using poly (lactic-co-glycolic acid).**

In European Journal of Ophthalmology, März 2024.

30.09.2021 Kongress der deutschen ophthalmologischen Gesellschaft:

- Clarissa Bill, Natalie Tersi, Stefan Kassumeh, Andreas Ohlmann, Claudia Priglinger, Siegfried Priglinger, Armin Wolf, Christian Wertheimer. **Charakterisierung von Wirkdosis und -art von Methotrexat in der Nachstarprophylaxe.**
- Christian Wertheimer, Natalie Tersi, Stefan Kassumeh, Andreas Ohlmann, Claudia Priglinger, Siegfried Priglinger, Armin Wolf, Clarissa Bill. **Empirische Untersuchung zur Herstellung der Trägersubstanz einer medikamentenfreisetzenden Intraokularlinse.**

Eidesstattliche Erklärung

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

Optimierung der Intraokularlinse als Medikamententräger in der okulären Wundheilung

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

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

München, den 21.10.2024

Ort, Datum

Clarissa Bill

Unterschrift Doktorandin