

***Entwicklungsbegleitende  
ex-vivo Evaluation von thermosensitiven  
Hydrogelen als Glaskörperersatzstoffe***

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN



**Promotionsschrift zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin**

**Vorgelegt**

**von**

**Sabrina Miriam Bohnacker**

**München 2016**

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Klinikum rechts der Isar

Direktor: Prof. Dr. Dr. (Lond.) C. P. Lohmann

**Entwicklungsbegleitende  
ex-vivo Evaluation von thermosensitiven  
Hydrogelen als Glaskörperersatzstoffe**

**Sabrina Miriam Bohnacker**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

**Vorsitzender:** Prof. Dr. E. J. Rummeny

**Prüfer der Dissertation:**

1. Prof. Dr. Dr. (Lond.) C. P. Lohmann
2. apl. Prof. Dr. M. M. Maier

Die Dissertation wurde am 24.11.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.11.2017 angenommen.

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>  | <b>I</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>v</b>  |
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Der Glaskörper .....   | 2         |
| 1.1.1 Struktur und Eigenschaften .....                                     | 2         |
| 1.1.2 Funktion .....   | 4         |
| 1.1.3 Alterungsprozess .....   | 5         |
| 1.2 Anwendungsgebiete für Glaskörperersatzstoffe .....                     | 6         |
| 1.2.1 Krankheitsbilder .....   | 6         |
| 1.2.2 Vitrektomie .....  | 7         |
| 1.3 Stand der klinischen Erfahrungen mit Glaskörperersatz .....            | 8         |
| 1.3.1 Glaskörpertransplantate .....  | 8         |
| 1.3.2 Gase .....   | 9         |
| 1.3.3 Flüssigkeiten .....  | 10        |
| 1.4 Anforderungen an Biomaterialien als Glaskörperersatz .....             | 15        |
| 1.5 Polymergele als Glaskörperersatz in der experimentellen<br>Phase ..... | 16        |
| 1.5.1 Biopolymere .....  | 17        |
| 1.5.2 (Semi-) Synthetische Polymere .....                                  | 18        |
| <b>2 Fragestellung</b>   | <b>25</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3 Material und Methoden</b>                                      | <b>27</b> |
| 3.1 Thermosensitive Hydrogele .....                                 | 27        |
| 3.2 Entwicklungsbegleitende operative Handling-Versuche .....       | 32        |
| 3.2.1 Physikalische und mechanische Eigenschaften der<br>Gele ..... | 33        |
| 3.2.2 Operative Handhabbarkeit der Gele.....                        | 33        |
| 3.3 Entwicklungsbegleitende Zytotoxizitätstests.....                | 34        |
| 3.3.1 Direct contact test .....                                     | 34        |
| 3.3.2 Variante des direct contact test für pH-Versuche .....        | 38        |
| 3.3.3 Test with liquid extracts from the test material .....        | 39        |
| 3.4 Erweiterte Biokompatibilitätstests in vitro .....               | 42        |
| 3.4.1 Materialien.....  | 42        |
| 3.4.2 Methode der Gewebepräparation.....                            | 42        |
| 3.4.3 Perfusionskultur .....  | 44        |
| 3.4.4 Histologie .....  | 46        |
| <b>4 Studiendesign</b>  | <b>47</b> |
| <b>5 Ergebnisse</b>   | <b>48</b> |
| 5.1 Ergebnisse der operativen Handling-Versuche .....               | 48        |
| 5.1.1 Herstellung des flüssigen Gels.....                           | 48        |
| 5.1.2 Gelierfähigkeit in vitro.....                                 | 49        |
| 5.1.3 Gelverhalten ex vivo.....                                     | 50        |
| 5.1.4 Injizierbarkeit.....  | 50        |
| 5.1.5 Visualisierbarkeit und Mischbarkeit .....                     | 51        |
| 5.2 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests .....                        | 52        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.2.1 Gele aus Gruppe 2.....  | 52        |
| 5.2.2 Gele aus Gruppe 3.....  | 52        |
| 5.2.3 Gele aus Gruppe 4.....  | 53        |
| 5.2.4 Gele aus Gruppe 5.....  | 55        |
| 5.2.5 Gele aus Gruppe 6.....  | 55        |
| 5.2.6 Gele aus Gruppe 7.....  | 56        |
| 5.2.7 Gele aus Gruppe 8.....  | 57        |
| 5.2.8 Gele aus Gruppe 9.....  | 57        |
| 5.2.9 Gele aus Gruppe 10.....   | 59        |
| 5.2.10 Gele aus Gruppe 11.....  | 60        |
| 5.2.11 Gele aus Gruppe 12.....  | 60        |
| 5.2.12 Gele aus Gruppe 13.....  | 61        |
| 5.2.13 Gele aus Gruppe 14.....  | 61        |
| 5.2.14 Gele aus Gruppe 15.....  | 64        |
| 5.2.15 Gele aus Gruppe 16.....  | 66        |
| 5.2.16 Zusammenfassung der Ergebnisse der<br>Zytotoxizitätstests..... | 67        |
| 5.3 Ergebnisse der erweiterten Biokompatibilitätsversuche .....       | 77        |
| <b>6 Diskussion</b>   | <b>80</b> |
| 6.1 Operative Handhabbarkeit von thermosensitiven Hydrogelen...       | 81        |
| 6.2 Zytotoxizität von thermosensitiven Hydrogelen .....               | 86        |
| 6.3 Biokompatibilität von thermosensitiven Hydrogelen .....           | 88        |
| 6.4 Resümee und Ausblick.....   | 89        |
| <b>7 Zusammenfassung</b>  | <b>92</b> |
| <b>8 Literaturverzeichnis</b>   | <b>94</b> |

---

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| <b>9</b>  | <b>Abbildungsverzeichnis</b>   | <b>101</b> |
| <b>10</b> | <b>Tabellenverzeichnis</b>   | <b>105</b> |
| <b>11</b> | <b>Anhang</b>  | <b>106</b> |
| 11.1      | Material.....  | 106        |
| 11.1.1    | Bedarf für Handling-Versuche.....  | 106        |
| 11.1.2    | Allgemeiner Zellkulturbedarf.....  | 107        |
| 11.1.3    | Zusätzlicher Bedarf für direct contact test .....                                  | 108        |
| 11.1.4    | Zusätzlicher Bedarf für „test with liquid extract from the<br>test material“ ..... | 109        |
| 11.1.5    | Zusätzlicher Bedarf für erweiterte<br>Biokompatibilitätstests.....                 | 109        |
| 11.2      | Methoden.....  | 111        |
| 11.2.1    | Auftauen von Zellen .....  | 111        |
| 11.2.2    | Allgemeine Zellkulturbedingungen .....   | 111        |
| 11.2.3    | Passagieren von Zellen.....  | 112        |
| 11.2.4    | Zählen von Zellen.....   | 112        |
| 11.2.5    | HE-Färbung.....  | 113        |
| <b>12</b> | <b>Danksagung</b>  | <b>115</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| AMD              | altersabhängige Makuladegeneration                              |
| °C               | Grad Celsius  |
| ca               | circa   |
| cm               | Zentimeter  |
| CO <sub>2</sub>  | Kohlendioxid  |
| cP               | Centipoise  |
| cSt              | Centistokes   |
| d                | Tage  |
| d.h.             | das heißt   |
| DMEM             | Dulbecco's Modified Eagle Medium (Zellkulturmedium)             |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid  |
| dpt              | Dioptrien   |
| EDC              | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)Carbodiimid Hydrochlorid       |
| et al.           | et alii (maskulinum) / et aliae (femininum) / et alia (neutrum) |
| etc.             | et cetera   |
| g                | Gramm   |
| G                | Gauge   |
| G.I.             | growth inhibition   |
| GmbH             | Gesellschaft mit beschränkter Haftung                           |
| ggf.             | gegebenenfalls  |
| h                | Stunden   |
| HA               | Hyaluronsäure   |
| H <sub>2</sub> O | Wasser  |
| ISO              | International Organization for Standardization                  |
| MDa              | Megadalton  |
| µl               | Microliter  |
| µm               | Micrometer  |

|                |  |
|----------------|--|
| min            | Minuten  |
| ml             | Milliliter   |
| mosmol/l       | Milliosmol pro Liter   |
| n              | Anzahl   |
| NaCl           | Natriumchlorid   |
| nAMD           | Neovaskuläre altersabhängige Makuladegeneration                                      |
| nm             | Nanometer  |
| O <sub>2</sub> | Sauerstoff   |
| P              | Passage  |
| PEPE           | Poly(ethylen glycol)- <i>b</i> -Poly(propylenglycol)- <i>b</i> -Poly(ethylen glycol) |
| PPV            | pars plana Vitrektomie   |
| PFCL           | Perfluorcarbon-Flüssigkeiten   |
| pRPEC          | Porc Retina Pigmentepithel Choroidea   |
| PVR            | proliferative Vitreoretinopathie   |
| RPE            | retinales Pigmentepithel   |
| u.a.           | unter anderem  |
| v.a.           | vor allem  |
| VEGF           | vascular endothelial growth factor   |
| z.B.           | zum Beispiel   |

# 1 Einleitung

Der Glaskörper ist ein komplexes okuläres Gewebe dessen biomechanische, optische und biochemische Bedeutung noch nicht sehr lange bekannt ist. Pathologische Veränderungen des Glaskörpers treten meist in Begleitung retinaler Erkrankungen auf, wie z.B. bei der proliferativen Vitreoretinopathie oder der diabetischen Retinopathie. Letztere stellt die dritthäufigste Erblindungsursache in Deutschland dar (Finger, Fimmers et al. 2011).

Fortschritte auf dem Gebiet der vitreoretinalen Chirurgie, v.a. bei der Behandlung von komplizierten Netzhautablösungen könnten in Kombination mit geeigneten Langzeit-Glaskörperersatzmaterialien noch bessere Erfolge erzielen. Denn bisher verfügbare Glaskörperersatzstoffe weisen eine Reihe von Limitationen auf und müssen früher oder später wieder aus dem Glaskörperaum entfernt werden.

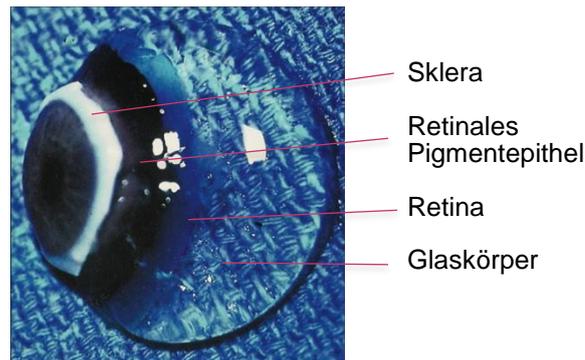
Die Suche nach einem geeigneten Material, das als dauerhafter Glaskörperersatz eingesetzt werden kann, ist seit Jahrzehnten eine große Herausforderung. Trotz vieler Neuentwicklungen ist es bisher nicht gelungen, eine Substanz zu finden, die allen Anforderungen gerecht wird.

Wie kaum ein anderes hat dieses Forschungsgebiet das Potenzial, die Behandlung vitreoretinaler Erkrankungen zu verbessern. Früher hatten Glaskörpertamponadematerialien lediglich die Aufgabe, den Glaskörperaum zu füllen, den intraokulären Druck aufrechtzuerhalten und die Netzhaut wieder an das retinale Pigmentepithel anzulegen. Zukünftige Glaskörperersatzstoffe hingegen sollen weitere Funktionen erfüllen und als Medikamenten-Langzeitdepot fungieren, die visuelle Rehabilitation verbessern und beschleunigen, durch dauerhafte Präsenz eine Wiederablösung der Netzhaut verhindern und die Kombination mit einer Stammzelltherapie ermöglichen.

## 1.1 Der Glaskörper

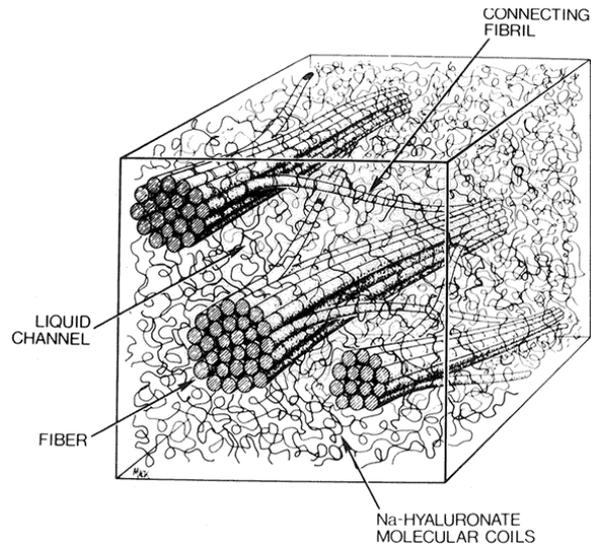
### 1.1.1 Struktur und Eigenschaften

Der Glaskörper, Corpus Vitreum, liegt zwischen Linse und Retina und nimmt etwa zwei Drittel des Augenvolumens ein.



**Abbildung 1** Humaner Glaskörper nach Entfernung von Sklera, Aderhaut und Netzhaut (Sebag 1989)

Mit einem Wassergehalt von 99 % (Sebag 1992) und einem dreidimensionalen Netzwerk aus Kollagenfasern und Glycosaminoglycanen ist der humane Glaskörper ein natürliches Hydrogel mit viskoelastischen Eigenschaften. Die Kollagenfaserbündel, die überwiegend aus dem fibrillären Kollagen Typ II, dem fibrillenassoziierten Kollagen Typ IX, sowie Kollagen Typ V und XI bestehen (Bishop 2000) und v.a. in anterior-posteriorer Richtung verlaufen (Sebag and Balazs 1989), bilden ein stabiles Gerüst, in welches Glycosaminoglycane, hauptsächlich Hyaluronsäure, knäueförmig eingelagert sind. Hyaluronsäure ist ein unverzweigtes Polyanion, das aus den sich abwechselnden glycosidisch verbundenen Monosacchariden N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure besteht und die Fähigkeit besitzt, hohe Mengen an Wasser zu binden. Dadurch entsteht ein gewisser Quelldruck. Die Hyaluronsäuremoleküle zeigen eine ungleiche Verteilung und sind am posterioren Kortex am höchsten konzentriert. Insgesamt liegt die Hyaluronsäurekonzentration im menschlichen Glaskörper bei 0,03 - 0,10 % (Foster 2008).



**Abbildung 2** "Schematic diagram of adult human vitreous ultrastructure. Parallel collagen fibrils are packed into bundles that aggregate and ultimately form visible fibers. Hyaluronic acid and water molecules fill the interfibrillar spaces." (Sebag and Balazs 1989)

Der Glaskörper eines erwachsenen Menschen wiegt etwa 4g, hat eine Dichte von 1,0053 - 1,0089 g/cm<sup>3</sup> mit der höchsten Dichte an der Ora serrata und am Cortex, einen Brechungsindex von 1,3349 - 1,336 (Sebag 1992; Keirl A. 2007), sein pH-Wert variiert zwischen 7,0 und 7,4 und seine Viskosität liegt bei 300 - 2000 cP (Lee, Litt et al. 1992) , welche am posterioren Cortex am höchsten ist, da sie von der Hyaluronsäurekonzentration abhängt.

Die Glaskörperrinde bildet zusammen mit der inneren limitierenden Membran (ILM) der Netzhaut die sogenannte vitreoretinale Grenzschicht. V.a. durch biochemische Interaktionen zwischen vitrealen Ankerfibrillen und den Glykoproteinen Laminin und Fibronectin (Stalmans, Benz et al. 2012) besteht eine starke Adhäsion zwischen Glaskörperrinde und ILM der Netzhaut. Besonders stark ist die Verbindung zwischen Glaskörper und Netzhaut an der Glaskörperbasis, am Sehnervenkopf, an den retinalen Gefäßen und an der Makula.

Anterior ist der Glaskörper über eine flächige Adhärenz mit der Linsenrückfläche verbunden (Ligament nach Wieger). Hinter der Linse liegt der sog. Berger'sche Raum, von dem aus sich der Cloquet'sche Kanal durch den Glaskörper schlängelt, der in der Embryonalzeit die linsenversorgende Arteria hyaloidea

fürte. Schließlich mündet dieser Kanal im Martiganiraum, welcher sich präpapillär befindet.

### 1.1.2 Funktion

Während der embryologischen Entwicklung des Auges kommt dem Glaskörper eine wichtige Rolle bei Wachstumsprozessen von Netzhaut und Linse zu.

Darüberhinaus tragen unterschiedliche Dichte- und Viskositätsverteilungen sowie die inhomogene Architektur des Glaskörpers mit Zisternen und Fasern (Sebag and Balazs 1989) zur Entstehung von Gradienten bei, durch die eine ständige Zirkulation von Nährstoffen und Metaboliten wie Glucose, Laktat, Ascorbat und Sauerstoff gewährleistet wird. Unter anderem durch seinen relativ hohen Ascorbatgehalt birgt der Glaskörper ein großes antioxidatives Potenzial. Man nimmt an, dass Veränderungen dieses Milieus zu pathologischen Prozessen im Auge beitragen.

Außerdem besitzt der Glaskörper eine wichtige Barrierefunktion gegenüber dem Eindringen von Makromolekülen und Zellen. Zusammen mit der Blut-Retina-Schranke und der Blut-Kammerwasser-Schranke verhindert er Proliferation, Entzündung und Neovaskularisation im Auge (Cunha-Vaz 1997; Slevin, Krupinski et al. 2007).

Der Glaskörper ist ein avaskuläres, zellfreies Gewebe. Nur an der Glaskörperbasis und am Cortex finden sich Hyalozyten (90 %), Fibroblasten (10 %) und Makrophagen (Baino 2011). Als hochtransparentes Medium erlaubt der Glaskörper 90 % Lichttransmission von Licht mit Wellenlängen von 300 - 1400 nm (Sebag and Balazs 1989).

Aufgrund seiner viskoelastischen Eigenschaften wirkt der Glaskörper bei ständigen Augenbewegungen oder bei Traumata stoß- und vibrationsdämpfend und schützt die umliegenden Gewebe vor mechanischer Schädigung.

### 1.1.3 Alterungsprozess

Im Rahmen von Altersveränderungen erfährt die gelartige Struktur des Glaskörpers eine zunehmende Verflüssigung (Synchisis). Durch Aggregation von Kollagenfibrillen entstehen dazwischenliegende kollagenfreie Lakunen, die mit Hyaluronsäure und Flüssigkeit gefüllt sind. Auf diese Weise liegen bei über 80-Jährigen etwa 50 % des Glaskörpers verflüssigt vor (Diaz-Llopis and Cervera 2007). Klinisch kann sich die veränderte Glaskörperstruktur als Mouches volantes und vermehrte Lichtstreuung bemerkbar machen. Der durch Synchisis verflüssigte Glaskörper kann eine physiologische hintere Glaskörperabhebung von der Netzhaut (Synerese) verursachen, indem flüssige Anteile durch ein Loch im hinteren Cortex des Glaskörpers brechen und die Glaskörperrinde von der inneren limitierenden Membran trennen. Dieser Prozess beginnt meist vor der Makula und kann sich über einen längeren Zeitraum erstrecken. Bei über 65-Jährigen liegt in 65 % der Fälle eine hintere Glaskörperabhebung vor (Gekeler, Priglinger et al. 2015) nach (Girach and de Smet 2014).

Da der Glaskörper an der Glaskörperbasis, an den großen Gefäßen, um die Papille und um die Makula am stärksten an der Retina angeheftet ist und im Rahmen von degenerativen Prozessen zusätzlich an untypischen Stellen solche Verbindungen bestehen können, werden bei Glaskörperabhebungen manchmal auch Zugkräfte auf die Netzhaut ausgeübt.

Anormale hintere Glaskörperabhebungen sind gekennzeichnet durch Vitreoschisis oder ungleichmäßige Abhebung des Glaskörpers mit konsekutiver Entstehung von persistierender oder starker vitreomakulärer Adhäsion, vitreomakulärer Traktion, Makulaschichtforamen, durchgreifendem Makulaforamen (Duker, Kaiser et al. 2013) epiretinaler Gliose und peripheren Netzhautforamina mit oder ohne Netzhautablösung.

Das komplexe Zusammenspiel altersbedingter Strukturveränderungen des Glaskörpers durch molekulare Veränderungen v.a. der vitreoretinalen Grenzfläche und eine damit einhergehend veränderte vitreoretinale Adhäsion liegt auch einer rhegmatogenen (rissbedingten) Netzhautablösung zugrunde (Mitry, Fleck et al. 2010).

## 1.2 Anwendungsgebiete für Glaskörperersatzstoffe

Glaskörperersatzstoffe werden erforderlich, wenn der Glaskörper seine Funktionen nicht mehr erfüllen kann, z.B. durch Trübung oder im Rahmen der Behandlung von komplizierten vitreoretinalen Ereignissen.

### 1.2.1 Krankheitsbilder

Vitreoretinale Störungen können durch Tumore, Traumata, Infektionen, Entzündungen, Degeneration, hereditär oder auch spontan auftreten.

Eine Reihe das Sehvermögen gefährdende Ereignisse, wie vitreomakuläre Traktionen, traktive Makulaödeme, Makulaforamina, Netzhautrisse (Rieserisse, posteriore Risse), Glaskörpereinblutungen, proliferative Membranen und komplizierte Netzhautablösungen erfordern eine Vitrektomie mit Instillation eines Glaskörperersatzstoffs zur Tamponade retinaler Defekte oder um eine Wiederanlage der Netzhaut zu erreichen.

Mit der degenerativen Verflüssigung des Glaskörpers, aber auch nach Pars-Plana-Vitrektomie, geht die Barrierefunktion des Glaskörpers und somit auch seine regulierende Wirkung auf den Molekültransport im Auge verloren. Folge ist eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks, was gesteigerten oxidativen Stress für die Linse bedeutet und eine schnellere Progression einer Katarakt nach sich zieht.

Des Weiteren können Zytokine wie vascular endothelial growth factor (VEGF) vermehrt vom posterioren Kompartiment in das anteriore Kompartiment des Auges gelangen. Vorteil ist ein gesenktes Risiko für retinale Neovaskularisationen und Makulaödem, der Nachteil besteht in einem erhöhten Risiko für Irisneovaskularisationen und Cataractformation. (Stefansson 2009)

Durch einen adäquaten Glaskörperersatz könnte die Barrierefunktion des Glaskörpers imitiert werden, um einerseits postoperative Blutungen zu verhindern und andererseits, um die Menge intravitreal zirkulierender Mitogene

zu senken, was u.a. bei der Entstehung von proliferativer Vitreoretinopathie und bei der proliferativen diabetischen Retinopathie von Relevanz ist.

Als häufigste Ursache für eine Wiederablösung der Netzhaut nach erfolgreicher Ablatiochirurgie gilt die proliferative Vitreoretinopathie (PVR), bei der Narbengewebe auf oder unter die Netzhaut vorwächst und durch Kontraktion zur Netzhautablösung führt. Ursächlich ist das Einwandern von retinalen Pigmentepithelzellen in den Glaskörperraum, welche dann durch eine Entzündungsreaktion zu Myofibroblasten transformieren (Saika, Yamanaka et al. 2008). Diese können proliferative Zellaggregate mit extrazellulärer Matrix bilden und so zur Entstehung von fibrotischen PVR-Membranen führen, die Traktion auf die Netzhaut ausüben und zur Wiederablösung der Netzhaut führen können.

Ein inkomplett abgelöster Glaskörper kann außerdem ein Risikofaktor für die Entstehung und Progression einer neovasulären altersbedingten Makuladegeneration (Schulze, Hoerle et al. 2008) (Mojana, Cheng et al. 2008) (Maier, Pfrommer et al. 2012) darstellen, ebenso für das Voranschreiten einer proliferativen diabetischen Retinopathie. Beide Krankheitsbilder gehören zu den drei häufigsten Erblindungsursachen in den Industrieländern.

### **1.2.2 Vitrektomie**

Vitrektomie bezeichnet die operative Entfernung des Glaskörpers. Indikationen zur partiellen oder kompletten Vitrektomie, die in den frühen 1970er Jahren erstmals von Machemer beschrieben wurde (Machemer, Buettner et al. 1971; Machemer 1995), sind durch verschiedene vitreoretinale Erkrankungen gegeben (siehe Krankheitsbilder 1.2.1). In der Regel findet dies als 3 Port pars plana Vitrektomie (PPV) statt. Dabei werden im Bereich der Pars Plana des Ziliarkörpers drei Zugänge zum Glaskörperraum geschaffen, über die eine Lichtquelle, ein Infusionsschlauch und ein Vitrektor in das Auge eingeführt werden können. Der Vitrektor ist ein Saug-Schneid-Gerät, mit dem

Glaskörpermaterial portionsweise angesaugt und abgetragen werden kann. Sowohl intra- als auch postoperativ kommen verschiedene Glaskörperersatzstoffe zum Einsatz, die die Netzhaut wieder an das retinale Pigmentepithel anlegen, in Position halten oder Blutungen verhindern können. Die Entscheidung ob und welches Tamponadematerial eingesetzt wird hängt von der Therapieindikation ab.

### **1.3 Stand der klinischen Erfahrungen mit Glaskörperersatz**

Nach Vitrektomie werden in der Regel Substanzen benötigt, die den Augeninnendruck aufrecht erhalten, Blutungen verhindern und die ggf. abgelöste Netzhaut wieder an ihre Unterlage, das retinale Pigmentepithel, anlegen. Zu diesem Zweck kommen sowohl intra- als auch postoperativ eine Reihe unterschiedlicher Substanzen zum Einsatz. Im Folgenden sollen Vor- und Nachteile von bereits in klinischem Gebrauch befindlichen Glaskörperersatzstoffen angeführt sowie Limitationen ihres Einsatzes aufgezeigt werden. (Überblick siehe Tabelle 1)

#### **1.3.1 Glaskörpertransplantate**

Erste Versuche, den menschlichen Glaskörper zu ersetzen, fanden Anfang des 20. Jahrhunderts mit Glaskörpertransplantaten von Kälbern und Kaninchen, später auch von humanen Glaskörpern, statt (Cutler 1947). Die Transplantation von tierischem und menschlichem Glaskörpermaterial erwies sich allerdings als ungeeignete Methode des Glaskörperersatzes, da Entzündungen als Folge einer Immunantwort auftraten, sowie postoperative Komplikationen wie Glaukom, Katarakt und Netzhauterkrankungen.

### 1.3.2 Gase

Gase tamponieren die Netzhaut durch Auftriebskraft und Oberflächenspannung. *Luft* war das erste Gas, das intravitreal zum Einsatz kam (Ohm 1911). Doch mit einer nur kurzen Verweildauer von ein paar Tagen (Marcus, D'Amico et al. 1994), die durch Diffusion der Luft bedingt ist, nimmt der Tamponadeeffekt schnell ab.

*Sulphurhexafluorid* ( $SF_6$ ) und Perfluorcarbon-Gase wie *Perfluorethan* ( $C_2F_6$ ) und *Perfluorpropan* ( $C_3F_8$ ) sind expandierende Gase, d.h. sie dehnen sich nach Injektion in das Auge durch Absorption von in okulären Geweben gelösten Gasen wie Stickstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid aus (Chan, Tolentino et al. 1984) und sind dadurch bessere Netzhauttamponaden als Luft. Durch ihre niedrige Wasserlöslichkeit verweilen diese Gase länger im Glaskörperaum als Luft und werden abhängig von Einflussgrößen wie Augeninnendruck und Kammerwasserproduktion innerhalb von 10-14 Tagen ( $SF_6$ ) bzw. 55-65 Tagen ( $C_3F_8$ ) resorbiert ((Faude and Wiedemann 1999) nach (Chang 1989)) und anschließend durch Kammerwasser ersetzt. Eine Operation zur Entfernung des Gases ist somit nicht erforderlich.

Momentan sind  $SF_6$  und  $C_3F_8$  die Tamponadematerialien der Wahl, allerdings müssen Patienten postoperativ oft tagelang in derselben Position verweilen, um einen ausreichenden Tamponadeeffekt an der gewünschten Stelle zu erreichen und dennoch sind inferior gelegene Netzhautlöcher mit diesen Gasen nur schwierig zu behandeln. Außerdem birgt das Expansionsvermögen der Gase die Gefahr, einen zu hohen Augeninnendruck zu verursachen, der zu Schäden des N. opticus oder zu Netzhautdurchblutungsstörungen führen kann, weshalb Patienten mit intraokularer Gastamponade den Aufenthalt in hohen Höhen wie z.B. Flugreisen meiden sollten. Weitere Komplikationen stellen Kataraktbildung, Ziliarkörper- und Netzhautschäden dar. Außerdem sollten Laserbehandlungen an gasgefüllten Augen vermieden werden, da hier hochgiftige Gase entstehen können. (Faude and Wiedemann 1999)

Als temporärer Glaskörperersatz kommen diese Gase, auch als Gemisch mit Luft, häufig zum Einsatz, als dauerhafte Glaskörperersatzstoffe sind sie

aufgrund ihrer begrenzten Verweildauer im Glaskörperraum allerdings nicht geeignet.

### 1.3.3 Flüssigkeiten

Die ersten Flüssigkeiten, die man als Netzhauttamponaden einsetzte, waren *Wasser* und *balancierte Salzlösung (BSS)*. Diese physiologischen Lösungen mit geringer Viskosität und nur kurzer intraokularer Verweildauer bilden im Glaskörperraum keine ausreichende Phasengrenzfläche aus, wodurch effektive Tamponadeeigenschaften ausbleiben. Dennoch wird balancierte Salzlösung für intraokuläre Spülungen verwendet oder um andere flüssige Glaskörperersatzstoffe aus dem Auge zu entfernen. (Colthurst, Williams et al. 2000)

Die derzeit am ehesten geeigneten Langzeit-Glaskörperersatzstoffe sind *Silikonöle*, obwohl sie zahlreiche Nachteile aufweisen. Silikonöle wurden in den 1960er Jahren durch Cibis in die vitreoretinale Chirurgie eingeführt (Cibis, Becker et al. 1962). Es handelt sich um synthetische Polymere, die zur Klasse der Polydimethylsiloxane gehören. Die hydrophoben Eigenschaften von Silikonölen sorgen für eine Grenzflächenspannung zwischen Tamponadmaterial, Kammerwasser und Netzhaut, welche im Vergleich zu Gasen allerdings schwächer ausfällt. Zusammen mit der hohen Viskosität, welche Turbulenzen im Bereich von Netzhautlöchern minimiert, ermöglichen diese Kräfte den zuverlässigen Verschluss von Netzhautlöchern. Ihre höchste Effektivität erreichen Silikonöltamponaden am Apex. Da ihre Dichte geringer ist als die von Wasser, schwimmen Silikonöle auf nach Vitrektomie verbliebenen flüssigen Glaskörperresten. Dadurch können inferior gelegene Netzhautlöcher nicht effektiv tamponiert werden. Gelangt Flüssigkeit durch den Defekt unter die Netzhaut droht eine erneute Netzhautablösung.

Silikonöle verbleiben so lange im Glaskörperraum bis sie operativ entfernt werden. Als diagnostisch vorteilhaft erweist sich der gute Funduseinblick unter Silikonöltamponade. Eine Ölentfernung wird in der Regel nach 3-6 Monaten erforderlich, weil Silikonöle erwiesenermaßen eine Reihe von Langzeit-

komplifikationen verursachen, wie Katarakt, Glaukom, Hornhautschäden und Netzhautreaktionen (Versura, Cellini et al. 2001). Solche Komplikationen werden in der Literatur selbst nach Ölentfernung beschrieben (Federman and Schubert 1988). Es wird diskutiert, dass diese Komplikationen nicht von einer Eigentoxizität der Öle selbst herrühren, was ein typischer Befund für niedrigmolekulare Monomere und Polymerisationsrückstände wäre (Pastor, Zarco et al. 1998), sondern vielmehr von abnormalem Zellverhalten, ausgelöst durch Ölemulsifikation und –dispersion (Ohira, Wilson et al. 1991). Nach Ölentfernung kommt es in ca 25% der Fälle zu einer Wiederablösung der Netzhaut (Jonas, Knorr et al. 2001).

Sogenannte *Second generation silicone oils* wie Fluorosilikon-Öl (poly(methyl-3,3,3-trifluoro-propylsiloxan) und Silikon/Fluorosilikon Co-Polymer (poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxan-co-dimethylsiloxan) sind durch ihre größere Dichte als Wasser auch zur Tamponade inferior gelegener Netzhautlöcher geeignet. Nachteile stellen eine höhere Emulsifikationsrate sowie geringere Gewebeverträglichkeit dar.

*Schwere Silikonöle* sind Mischungen aus Silikonöl und semifluorierten Alkanen (SFAs). Verschiedene Vertreter dieser Gruppe wie Densiron-68, Oxane HD und HWS 46-3000 enthalten unterschiedlich hohe Anteile an Silikonöl bzw. SFAs. In Studien zeigen sie gute anatomische Ergebnisse bei inferioren Netzhautablösungen und guter Gewebeverträglichkeit.

Aber auch schwere Silikonöle können eine PVR-Entstehung mit konsekutiver Wiederablösung der Netzhaut nicht verhindern. Es findet vielmehr eine Verlagerung des Problems zu den oberen Netzhautquadranten hin statt. In einer großen prospektiven, randomisierten Multicenterstudie, die schwere Silikonöle mit Standardsilikonölen bei der Behandlung inferior gelegener PVR verglich, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tamponadematerialien hinsichtlich anatomischem und funktionellem Erfolg verzeichnet werden. (Joussen, Rizzo et al. 2011)

Eine weitere Gruppe flüssiger Glaskörperersatzstoffe wird aus *Perfluorcarbon-Flüssigkeiten* (*Perfluorcarbon liquids PFCLs*) gebildet. Häufige Vertreter sind

Perfluordecalin (PFD), Perfluorhexyloctan ( $F_6H_8$ ) und Perfluorperhydrophenantren. Als Besonderheit weisen sie eine hohe  $O_2$ - und  $CO_2$ -Transportkapazität auf, die in Tierstudien neuroprotektive Effekte auf die Retina zeigte (Kleinberg, Tzekov et al. 2011). Brechungsindices von 1,28 - 1,33 bei Raumtemperatur (Peyman, Schulman et al. 1995) erlauben die intraoperative Verwendung von konventionellen Kontaktlinsen für eine gute Sicht. Des Weiteren ist eine Endolaserkoagulation durch PFCLs hindurch möglich (Azzolini, Docchio et al. 1992). Durch ihre niedrige Viskosität stellen PFCLs während eines Eingriffs kein Hindernis für Injektionen, Gewebemanipulation oder -entfernung dar. Somit sind PFCLs gute intraoperative Instrumente, um die Netzhaut in ihrer Position zu halten respektive abgelöste Netzhaut durch Grenzflächenspannung zur Wiederanlage zu bringen. Sie müssen jedoch noch intraoperativ oder wenige Tage postoperativ in einem erneuten Eingriff vollständig entfernt und gegebenenfalls durch einen Langzeit-Glaskörperersatzstoff ausgetauscht werden, da sie langfristig toxisch auf die okulären Gewebe wirken. In Studien konnten bereits nach 2-4 Tagen Verweildauer von PFCLs in Kaninchenaugen irreversible Zellschäden nachgewiesen werden (Eckardt, Nicolai et al. 1991). Wahrscheinliche Ursache dafür sind mechanische Zellschäden durch Kompression aufgrund der hohen Dichte von PFCLs sowie eine nahezu vollständige Emulsifikation der Flüssigkeit eine Woche postoperativ (Orzalesi, Migliavacca et al. 1998).

*Semifluorierte Alkane (SFAs)* sind schwerer als Wasser und haben eine geringere Dichte als PFCLs. Deshalb können sie nicht nur intraoperativ eingesetzt werden, sondern auch als längerfristige Netzhauttamponaden für eine Dauer von bis zu 2-3 Monaten, bringen jedoch das Problem der Emulsifizierung mit sich (Kirchhof, Wong et al. 2002). Weiterhin werden SFAs als Lösungsmittel für Silikonöle verwendet. Die Kombination hat einen positiven Einfluss auf das Emulsifikationsverhalten der Öle. Solche Mischungen aus Silikonöl und SFAs können entweder als homogene Lösungen, sog. „schwere Silikonöle“, hergestellt werden oder als zweiphasige „*Double Fills*“, deren leichtere Phase aus Silikonöl die obere Netzhaut tamponiert, während die

schwereren SFAs als Netzhauttamponade für untere Netzhautabschnitte fungieren. Diese simultane Netzhauttamponade gestaltete sich in der Praxis jedoch schwierig.

**Tabelle 1** Overview of the main vitreous tamponade agents and substitutes used in clinical practice (human patients) (modifiziert nach (Baino 2011))

| First use | Substance   | Type* | Remarks   |
|-----------|---|-------|---|
| 1911      | Air   | G     | Short residence time (few days); suitable for air / PFCL exchange   |
| 1912      | Water   | L     | Short residence time  |
| 1948      | Saline solutions  | L     | Short residence time; suitable for the vitreous cavity saline / PFCL exchange and for rinsing   |
| 1962      | Silicone oil  | L     | Long-term vitreous substitute, with problems of oil toxicity mainly due to emulsification   |
| 1973      | SF <sub>6</sub>   | G     | Short residence time; cataract, problems due to IOP rise  |
| 1980      | C <sub>2</sub> F <sub>6</sub> , C <sub>4</sub> F <sub>8</sub> , C <sub>3</sub> F <sub>8</sub> | G     | More prolonged tamponade than SF <sub>6</sub> ; cataract, problems due to IOP rise  |
| 1982      | Xenon   | G     | Very short residence time (few hours)   |
| 1988      | Perfluoro-n-octane, perfluorodecalin  | L     | Intraoperative use only is recommended; it is usually the agent of choice   |
| 1990      | Fluorosilicone oil  | L     | Useful in the treatment of inferior RD; drawbacks analogous to those of silicone oil  |
| 1992      | Perfluorotetradecahydrophenantrene  | L     | Intraoperative use only is recommended  |
| 2002      | Perfluorohexyloctane  | L     | Good clinical outcomes; cataract; removal recommended 2-3 months after operation  |
| 2003      | Oxane HD®   | L     | Adverse effects including emulsification, cataracts, IOP rise   |
| 2005      | Densiron-68®  | L     | Good clinical outcomes; possible emulsification (oil removal after 3 months is strongly recommended)  |
| 2007      | HW 46-3000  | L     | Very good success rate in retinal reattachment; high rate of cataract formation; no inflammation and emulsification                                 |
| 2013      | HeavySil  | L     | Effective in treating complicates inferior retinal detachments; no major complication; high rate of cataract formation (Romano, Zenoni et al. 2013) |

\* G = gas; L = liquid

## 1.4 Anforderungen an Biomaterialien als Glaskörperersatz

Mit dem heute vorhandenen Wissen über die komplexe Funktion und die Bedeutung des Glaskörpers für das intraokulare Milieu werden Anforderungen an Glaskörperersatzstoffe gestellt, die weit über einen alleinigen Tamponadeeffekt auf die Netzhaut hinausreichen.

Der ideale künstliche Glaskörper erfüllt folgende Kriterien (Chirila, Tahija et al. 1994; Bairo 2011):

Er sollte *optisch klar* und *transparent* sein und einen *Brechungsindex* sowie eine *Dichte* haben, die denen des natürlichen Glaskörpers so nahe wie möglich kommen, damit die Sehfunktion des Patienten unbeeinträchtigt bleibt und Lichtstrahlen, die in das Auge einfallen ungehindert die Netzhaut erreichen können. Diese Transparenz sollte beibehalten werden ohne eine spätere Ausbildung von Verdichtungen des Glaskörperersatzmaterials.

Ein künstlicher Glaskörper darf *nicht toxisch* sein, sollte eine hohe *Biokompatibilität* mit okulären Geweben aufweisen und sollte des Weiteren *biologisch und chemisch inert* sein, um abnorme Zellreaktionen, Entzündungen und postoperative Komplikationen zu vermeiden.

Damit er eine effektive Tamponadefunktion erfüllt, sollte ein Glaskörperersatzstoff fest genug sein und weder absorbierbar noch biologisch abbaubar sein.

Wünschenswert wäre ein Material, dessen Tamponadeeffekt zirkulär auf die komplette Netzhaut wirksam ist und sich nicht, wie bisher, durch Auftriebskraft und Oberflächenspannung lagerungsabhängig auf einen bestimmten Netzhautbereich beschränkt.

Die Struktur des Glaskörperersatzstoffes sollte die Bewegung von Metaboliten, Proteinen und gelösten Stoffen erlauben, um die Voraussetzung für die intravitreale Applikation von Medikamenten zur Behandlung vitreoretinaler Erkrankungen zu erfüllen.

Gleichzeitig hat der ideale Glaskörperersatzstoff eine gewisse *Barrierefunktion* und wirkt antiproliferativ.

Für das minimalinvasive Einbringen des Glaskörperersatzes in das Auge sollte er durch Kanülen mit kleinem Durchmesser *injizierbar* sein, ohne dabei seine optischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften zu verlieren.

Zuletzt muss ein Glaskörperersatzmaterial ohne Verlust seiner Eigenschaften sterilisiert und gelagert werden können.

## **1.5 Polymergele als Glaskörperersatz in der experimentellen Phase**

Gemäß der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ sind Polymergele Polymernetzwerke, welche sich durch eine Flüssigkeit ausdehnen können. Bei Hydrogelen ist diese Flüssigkeit Wasser. (Slomkowski, Alemán et al. 2011)

Polymere können in natürliche (Biopolymere) bzw. modifizierte natürliche (semisynthetische) Polymere und synthetische Polymere unterteilt werden. Natürliche Polymere sind nicht toxisch, biodegradibel und durch eher instabile mechanische Eigenschaften sowie die Neigung zu immunogener Aktivität gekennzeichnet. Synthetische Polymere hingegen sind durch ihre definierbare Architektur, fein einstellbare mechanische Eigenschaften, langanhaltende Stabilität aber auch geringere Biokompatibilität charakterisiert. (Kirchhof, Goepferich et al. 2015)

Des Weiteren werden physikalische Hydrogele von chemischen Hydrogelen unterschieden. Erstgenannte werden durch reversible Kräfte geformt, wie Aggregation von Polymerketten, durch molekulare Verknüpfung, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Interaktionen, ionische Bindungen oder durch Komplexbildung. Physikalische Hydrogele sprechen außerdem auf Stimuli wie z.B. Temperatur, pH-Wert usw. an. Die Polymernetzwerke chemischer Hydrogele hingegen enthalten kovalente Bindungen, die irreversibel sind. (Drury and Mooney 2003). Einen Überblick über Glaskörperersatzstoffe in der experimentellen Phase bietet Tabelle 2.

### 1.5.1 Biopolymere

Die strukturelle Nachahmung des Glaskörpers mit Ersatzmaterial aus natürlichen Glaskörperbestandteilen, wie Hyaluronsäure oder Kollagen, ist eine naheliegende Idee.

Untersuchungen von Hyaluronsäure und ihren Derivaten als Glaskörperersatz in menschlichen Augen zeigten eine ausgezeichnete Biokompatibilität und Gewebeverträglichkeit ohne toxische Effekte. Bei der Untersuchung von Kollagengelen konnten hingegen Entzündungsreaktionen beobachtet werden. Zusätzlich verloren diese Gele bei Injektion in das Auge ihre Struktur. Aufgrund der kurzen Verweildauer in vivo kommen beide Biopolymere als Glaskörperersatzstoff nicht in Frage. Hyaluronsäure findet jedoch in zahlreichen anderen Bereichen der Ophthalmologie und Ophthalmochirurgie Anwendung.

Mit der Herstellung von Mischgelen aus Hyaluronsäure und Kollagen erhoffte man sich eine Verbesserung der physikalischen Eigenschaften der Gele. Die Mischung konnte bei niedrigen Temperaturen injiziert werden und gelierte erst im Auge bei Körpertemperatur. Die Gelstruktur blieb jedoch nicht erhalten, es konnten Trübungen beobachtet werden und nach 5 Monaten wurde das Gel vollständig abgebaut ((Baino 2011) nach (Balazs and Sweeney 1966)).

Gele aus Hyaluronsäure und Gellan-Gummi liegen bei Raumtemperatur bereits gelförmig vor und können diese Struktur auch bei Körpertemperatur beibehalten. In Studien zeigten sie gute Eigenschaften als kurzzeitiger Glaskörperersatz. Allerdings fanden schon innerhalb einer Woche Abbauvorgänge statt, sodass auch dieses Material nicht als Langzeit-Glaskörperersatz geeignet ist. (Suri and Banerjee 2006)

Versuche mit *Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)* zeigten einerseits eine sehr gute Biokompatibilität, andererseits war die Substanz schon nach 10 Wochen nicht mehr im Glaskörperraum nachweisbar. Diese kurze Verweildauer konnte auch durch Veränderungen des Molekulargewichts von HPMC kaum verbessert werden, so schied HPMC als Langzeit-Glaskörperersatzstoff aus. (Fernandez-Vigo, Refojo et al. 1990)

### 1.5.2 (Semi-) Synthetische Polymere

Nachdem Biopolymere als Glaskörperersatzstoffe an ihren ungünstigen physikalischen Eigenschaften scheiterten, konzentrierte man sich mehr auf die Nachahmung funktioneller Aspekte des Glaskörpers, wie optische und mechanische Eigenschaften.

Als erstes synthetisches Polymer wurde *Poly(1-Vinyl-2-Pyrrolidon)* (PVP) im Hinblick auf seine Eignung als Glaskörperersatz untersucht. Nach ersten Ergebnissen, die Trübungen der Substanz nach Implantation in Kaninchenaugen zeigten ((Baino 2011) nach (Scuderi 1954)), fanden Weiterentwicklungen des 1-Vinyl-2-Pyrrolidon Monomers statt, wie etwa seine Co-Polymerisierung mit 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) unter Verwendung von Divinylglycol (DVG) oder Diallylether (DAE) als Quervernetzer. Dadurch konnte ein transparentes Hydrogel hergestellt werden, welches dem natürlichen Glaskörper ähnliche mechanische Eigenschaften aufweist. (Hong, Chirila et al. 1996)

Diese wurden jedoch bei Injektion des Gels in Kaninchenaugen beeinträchtigt, es kam zur Fragmentierung des Gels. Klinisch wurden Geltrübungen und Entzündungsreaktionen berichtet, in der Zellkultur konnten Zellen mit zahlreichen Vakuolen nachgewiesen werden, was auf Phagozytose des Materials hindeutet. (Hong, Chirila et al. 1998)

Ein weiteres Hydrogel mit besonders starkem Quellvermögen ist *Polyglyceryl Methacrylat* (PGMA). Trotz guter Biokompatibilität, wurde es als Glaskörperersatz ebenfalls für unpassend befunden. Gründe dafür sind der zu langsam ablaufende Schwellvorgang, welcher eine sofortige Netzhauttamponade nicht gewährleistet, und eine zu traumatische Art der Implantation, denn PGMA muss über eine Inzision in das Auge eingebracht werden (Daniele, Refojo et al. 1968). Der Versuch, durch Quervernetzung ein injizierbares PGMA herzustellen, war nicht erfolgreich, da durch Scherkräfte während der Injektion des Hydrogels eine Zerstörung seiner Struktur stattfand ((Hogen-Esch, Shah et al. 1976) nach (Baino 2011)).

Auch *Poly(2-Hydroxyethylmethacrylat)* (PHEMA) wurde untersucht und in Kaninchenaugen implantiert. PHEMA behielt aufgrund seiner festen Struktur seine intraokuläre Position bei, unterlag weder Abbau noch Absorption und zeigte gute Gewebeverträglichkeit. Doch die Implantation des festen PHEMA war zu traumatisch und bereitete oft Schwierigkeiten, deshalb wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. (Refojo 1971)

Implantationsschwierigkeiten sind bei *Poly(2-Hydroxyethylacrylat)* (PHEA) nicht gegeben, denn das Gel lässt sich problemlos injizieren und besitzt auch sonst hervorragende physikalische Eigenschaften. Allerdings löste PHEA in Versuchen an Kaninchenaugen Hornhautödeme, Schäden an Linse und Netzhaut sowie Trübungen und Membranbildung im Glaskörperraum aus. Aufgrund dessen wurde auch diese Substanz als potenzieller Glaskörperersatz verlassen. (Chan, Tolentino et al. 1984)

Als Substanz mit vielversprechenden physikalischen Eigenschaften wurde das Poloxamer *Pluronic® F-127* an Kaninchenaugen getestet. Eine Lösung mit einem Massenanteil des Polymers von 20% liegt bei niedrigen Temperaturen flüssig vor und bildet bei 21°C eine Gelstruktur aus mit einem Brechungsindex von 1,032 ((Baino 2011) nach (Schmolka 1972)). Rheologische Tests allerdings zeigten bei Einwirkung von Scherkräften auf das Gel eine deutliche Abnahme der Viskosität. Dadurch ist dieses Gel nicht injizierbar. Außerdem konnten durch toxische Effekte hervorgerufene Veränderungen der Netzhautarchitektur beobachtet werden, wodurch *Pluronic® F-127* als langfristiger Glaskörperersatz ungeeignet ist (Davidorf, Chambers et al. 1990).

Weiterhin wurden *Silikongele* mit unterschiedlichen Polymerformeln untersucht. Nach Injektion des flüssigen Gels in die Augen von Affen gelierte es innerhalb von 15-30 min in situ (Swindle and Ravi 2007). Abgesehen von geringen Entzündungsreaktionen, die etwa eine Woche postoperativ vorhanden waren, wurden keine unerwünschten Effekte oder Netzhautschäden beobachtet.

Dennoch sind Silikongele kein geeignetes Glaskörperersatzmaterial, weil sie durch ihre hydrophoben Eigenschaften die Netzhaut nicht ausreichend tamponieren.

Ein anderes Hydrogel namens *Adcon®-L-Hydrogel* aus Proteoglycanestern und Gelatine wird bereits erfolgreich in der Neurochirurgie eingesetzt und weist eine gute Biokompatibilität auf. Untersuchungen dieses Hydrogels an Kaninchenaugen zeigten jedoch starke, anhaltende postoperative Entzündungen mit Hornhauttrübungen und Katarakt. Zusätzlich fanden Abbauprozesse statt, sodass das Gel schon nach 3 Wochen nicht mehr nachweisbar war (De Jong, Bali et al. 2000). Diese erheblichen Nachteile machen Adcon®-L-Hydrogel als Glaskörperersatzstoff ungeeignet.

Erste Untersuchungen von *Polyvinylalkohol (PVA) Hydrogelen* fanden bereits 1991 statt, doch erst durch zahlreiche Veränderungen des Herstellungsverfahrens, wie Quervernetzung der Polymere mit Trinatriumtrimetaphosphat, Sterilisation durch Autoklavieren und Gelierung mittels  $\gamma$ -Strahlung, gelang es, Gele mit vielversprechenden Eigenschaften zu entwickeln. Die besten Ergebnisse erzielten Gele mit einem Verhältnis von PVA zu Trinatriumtrimetaphosphat von 8:1. Umfangreiche Tests konnten gute optische und rheologische Eigenschaften, sowie Langzeit-Biokompatibilität nachweisen. Allerdings stellten Feng et al. fest, dass diese Hydrogele nach 180 Tagen im Kaninchenauge einer Biodegradation mit Verlust ihrer rheologischen Eigenschaften unterlagen.

Nachdem Polyvinylalkohol (PVA) Hydrogele als Glaskörperersatzstoffe gescheitert waren, schlugen Feng et al 2013 als neuen Ansatz für Langzeitglaskörperersatz eine faltbare Glaskörperkapsel vor, welche mit PVA Hydrogel befüllt werden kann (Feng, Chen et al. 2013). Nach Vitrektomie und Lensektomie erfolgte die Implantation der faltbaren Glaskörperkapsel über eine 3 mm große Inzision. Anschließend wurden 1,4 ml PVA Hydrogel über ein Schlauch-Ventil-System in die Glaskörperkapsel injiziert. Somit konnte das Problem der Biodegradation von PVA Hydrogelen überwunden werden, jedoch

stellt die Implantation der künstlichen Glaskörperkapsel ein relativ traumatisches Verfahren dar.

Ein Material, das bereits vor vierzig Jahren als Glaskörperersatzstoff untersucht wurde, aber längere Zeit von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen worden ist, ist Polyacrylamid. Eine Pilotstudie zu *Polyacrylamidgelen*, die in situ gelieren, wurde 2009 veröffentlicht (Swindle-Reilly, Shah et al. 2009). Nach Co-Polymerisation von Acrylamid und N-Phenylacrylamid, unter Verwendung von Bisacrylamino-diethyldisulfid (BAC) als Quervernetzer, wurde das entstandene Hydrogel reduziert. Dabei wurden die initial vorhandenen Disulfidbindungen gelöst und lineare Polymere mit Thiolgruppen gebildet. In dieser Form konnte das Gel durch eine 25 G Nadel in den Glaskörperraum eines Kaninchenauges injiziert werden, ohne dabei seine mechanischen Eigenschaften zu verlieren. In situ gelierte das Hydrogel innerhalb einer Stunde durch Oxidation bei 5 % Sauerstoff und physiologischem pH-Wert. Polyacrylamid Hydrogele mit einer Co-Polymerkonzentration von 2 % imitierten die optischen und mechanischen Eigenschaften des natürlichen Glaskörpers am besten. Das Gel blieb optisch klar und transparent und füllte den Glaskörperraum aufgrund seines hydrophilen Charakters komplett aus, was v.a. einen Vorteil für die Tamponade inferior gelegener Netzhautlöcher bietet. Über einen Beobachtungszeitraum von einer Woche waren klinisch und histologisch weder toxische Effekte noch signifikante Entzündungen oder Veränderungen der Netzhautarchitektur zu sehen. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse deuten auf ein großes Potenzial dieser Polyacrylamidgele als Langzeit-Glaskörperersatz hin. Weitere Untersuchungen zu Langzeit-Biokompatibilität und Verweildauer folgen.

Im Jahr 2011 veröffentlichten Su et al eine Studie, die ein Hyaluronsäure-Adipinsäure-Dihydrazid-Hydrogel als Glaskörperersatz vorschlägt (Su, Chen et al. 2011). Bei der Herstellung wurde *oxidierte Hyaluronsäure mit ADH quervernetzt*. Dieses Hydrogel sei injizierbar, nicht toxisch und erfülle physikalische Anforderungen wie Brechungsindex nahe physiologischen Werten. In Degradationstests blieb die Gelstruktur über 35 Tage erhalten. Des

Weiteren zeigten sich bei in vivo Versuchen am Kaninchenauge nach drei Wochen keine nennenswerten biologischen Veränderungen.

Die Gruppe um Prof. Spitzer entwickelte Hydrogele aus *quervernetzter Hyaluronsäure* als Glaskörperersatz. Es wurden zwei verschiedene Gele hergestellt und untersucht. Einmal wurde das Biopolymer Hyaluronsäure ähnlich wie in der Studie von Su et al mit Adipinsäure-Dihydrazid (ADH) durch Carboxylierung mit *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDCI) quervernetzt. Weitere Untersuchungen zeigten allerdings eine milde Zytotoxizität dieser Gele. In einem zweiten Ansatz erfolgte eine Quervernetzung von Hyaluronsäure mittels UV-Licht und N-vinyl-pyrrolidinone. Diese Gele zeigten nicht nur vorteilhafte physikalische Eigenschaften und fehlende Toxizität, sondern waren auch nach 6 Wochen in vivo noch an Ort und Stelle nachweisbar. (Schramm, Spitzer et al. 2012)

In jüngster Vergangenheit synthetisierten Liang, Ravi et al. ein Poly(MAM-co-MAA-co-BMAC) Hydrogel, welches durch Luftoxidation in situ geliert. Dabei war die Idee, die Eigenschaften von Polymethacrylamid (MAM), Polymethacrylat (MAA) und bis-Methacryloylzystamin (BMAC) zu kombinieren, um den natürlichen Glaskörper nachzuahmen. Die Gelierzeit konnte auf 3 Tage reduziert werden. In Zytotoxizitätstests zeigte sich nach 21 Tagen keine Toxizität der Gele. In vivo Tests sind noch ausstehend. (Liang, Struckhoff et al. 2016)

**Tabelle 2** Experimental polymers for vitreous substitution (modifiziert nach (Baino 2011))

| First use | Polymer  | Type* | Recipient** | Toxicity | Persistence*** | Remarks   |
|-----------|--|-------|-------------|----------|----------------|---|
| 1954      | Poly(1-vinyl-2-pyrrolidone) solutions            | SP    | A           | No       | ST             |   |
| 1961      | Hyaluronic acid solutions                        | MNP   | H           | No       | ST             |   |
| 1966      | Polygeline                                       | MNP   | A, H        | No       | ST             |   |
| 1966      | Hyaluronate/collagen gel                         | MNP   | A           | No       | ST             |   |
| 1968      | Polyacrylamide                                   | SP    | A           | No       | LT             | Promising physico-mechanical properties; possible gel degradation during injection                            |
| 1968      | Poly(glyceryl methacrylate)                      | SP    | A           | No       | LT             | Traumatic implantation (dense pieces) or degradation during injection (gel)                                   |
| 1969      | Collagen   | MNP   | A, H        | Yes      | ST             | Unsuitable  |
| 1971      | Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)                | SP    | A           | No       | LT             | Unsuitable (too traumatic implantation)   |
| 1984      | Poly(2-hydroxyethyl acrylate)                    | SP    | A           | Yes      | LT             | Unsuitable  |
| 1990      | Hydroxypropyl methylcellulose                    | SP    | A           | No       | ST             | Unsuitable  |
| 1990      | Pluronic F127                                    | SP    | A           | Yes      | ST             |   |
| 1991      | Poly(vinyl alcohol) hydrogels                    | SP    | A           | No       | LT             | Biodegradation after 180 days   |
| 1992      | Silicone gel                                     | SP    | A           | No       | LT             | Lacking of retinal tamponade effect   |
| 1993      | Hyaluronic acid hydrogel                         | MNP   | A           | No       | ST/LT          | Potential problems of gel coherence. Degradation time (>1 month) depends on the amount of cross-linking agent |
| 1995      | Poly(1-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels            | SP    | A           | No       | LT             | Possible gel degradation during injection   |
| 1995      | Poly(methyl 2-acrylamido-glycolate methyl ether) | SP    | A           | Yes      | LT             | Unsuitable  |

|      |   |     |    |     |    |  |
|------|---|-----|----|-----|----|--|
| 1997 | Methylated collagen   | MNP | A  | No  | ST |  |
| 2000 | Adcon®-L hydrogel   | SP  | A  | Yes | ST | Unsuitable   |
| 2004 | Poly(vinyl alcohol methacrylate)  | SP  | IV | No  | LT | Significantly stiffer than natural vitreous  |
| 2006 | Hyaluronic acid/gellan gum  | MNP | IV | No  | ST | Insufficient mechanical properties   |
| 2009 | Crosslinked polyacrylamide hydrogel   | SP  | A  | No  | LT | Biocompatible, good physical and optical characteristics (Swindle-Reilly, Shah et al. 2009)                        |
| 2010 | Gelatin hydrogels   | MNP | A  | No  | ST |  |
| 2011 | Hyaluronic acid / adipic acid dihydrazide hydrogel                            | MNP | A  | No  | LT | Gel maintenance over 35 days (Su, Chen et al. 2011)  |
| 2012 | Photo-crosslinked hyaluronic acid / N-vinyl-pyrrolidinone hydrogel            | MNP | A  | No  | LT | Promising physical properties, in vivo maintenance for 6 weeks (Schramm, Spitzer et al. 2012)                      |
| 2013 | Foldable capsular vitreous body injected with Polyvinylalcohol Hydrogel       | SP  | A  | No  | LT | Decreased biodegradation, good rheological features but relatively traumatic implantation (Feng, Chen et al. 2013) |
| 2016 | Poly(methacrylamide-co-methylacrylate-co-bis-methacryloyl cystamine) hydrogel | SP  | IV | No  |    | No cytotoxicity, in vivo tests underway (Liang, Struckhoff et al. 2016)  |

\* MNP, modified natural polymers; SP, synthetic polymers.

\*\* A, animal; H, human; IV, in vitro only.

\*\*\* ST, short-term (due to resorption or degradation); LT, long-term.

## 2 Fragestellung

Auf der Suche nach einem langfristigen Glaskörperersatz gilt es eine Reihe von Hürden zu überwinden bis eine Substanz den Anforderungen gerecht wird. Als neuer Ansatz auf diesem Gebiet werden thermosensitive Hydrogele auf der Basis von Biopolymeren entwickelt und untersucht.

Dies geschieht im Rahmen eines Kooperationsprojekts, welches vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert wird (Fördernummer BMBF AZ 13N 10326). Projektpartner sind die Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, das Zentrum für Biomaterialentwicklung des Helmholtz-Zentrums Geesthacht und Fluoron GmbH, sowie Dr. Schmidt Intraocularlinsen GmbH. Die thermosensitiven Hydrogele werden von den Projektpartnern Helmholtz-Zentrum und Fluoron GmbH synthetisiert und aufbereitet. Uns, der Augenklinik der TU München, obliegt die entwicklungsbegleitende ex vivo Evaluation der thermosensitiven Hydrogele. Letztgenannter Teil ist Gegenstand dieser Arbeit.

Die Materialprototypen müssen hinsichtlich ihrer optischen, mechanischen und chemischen Eigenschaften sowie auf Zytotoxizität und Biokompatibilität untersucht werden.

Diese Arbeit soll durch entwicklungsbegleitende Handling-Versuche, Zytotoxizitätstests und erweiterte Biokompatibilitätstests folgende Fragen beantworten:

- Wie ist die operative Handhabbarkeit dieser Gele? Sind sie durch dünne Kanülen injizierbar? Gelieren die Gele bei der gewünschten Temperatur? Zeigt ihr Gerlierverhalten Reversibilität? Lassen sich die Gele mit einer wässrigen Phase mischen oder mit Farbstoff anfärben? Bleiben die optischen Eigenschaften der Gele nach Kontakt mit einer wässrigen Phase erhalten?

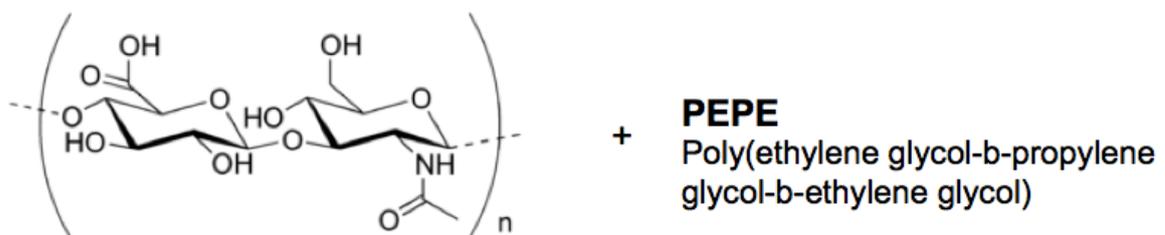
- Sind Zellen in der Umgebung dieser Gele überlebensfähig? Können Zellen auf den Gelen oder in unmittelbarer Nähe der Gele wachsen ohne abzusterben? Findet ein dreidimensionales Einwachsen von Zellen in die Gele statt?
- Welche Wirkung haben diese Gele auf die Netzhaut? Lösen die Gele bei Kontakt mit der Netzhaut über einen definierten Zeitraum histologisch sichtbare Veränderungen der Netzhautarchitektur aus?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Thermosensitive Hydrogele

Thermosensitive Hydrogele sind dreidimensionale Polymernetzwerke auf der Basis von Biopolymeren, die in der Lage sind, große Mengen an Wasser aufzunehmen. Eine Komponente stellt das Triblock-Copolymer Poly(ethylen glycol)-*b*-Poly(propylen glycol)-*b*-Poly(ethylen glycol) (PEPE) mit seinen thermosensitiven Eigenschaften dar, dessen Sol-Gel-Übergang, also der Übergang vom flüssigen in den gelförmigen Zustand, auf der Bildung von Mizellen beruht. Die zweite Komponente ist ein Biopolymer (Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat), welches die Mizellen vernetzt. Durch physikalische Mischung dieser beiden Komponenten entstehen Polymerblends, bei denen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Carboxylgruppen der Hyaluronsäuremoleküle und den Aminogruppen der PEPE-Moleküle zum Tragen kommen.

Die Geliertemperatur ( $T_{gel}$ ), also die Temperatur, bei der sich die Mizellen zusammen tun und ein Gel bilden, hängt von der Menge an aminiertem PEPE sowie von dessen Funktionalisierungsgrad (mono-Amino-PEPE oder di-Amino-PEPE) in der Komposition ab und kann in einem Bereich zwischen 27°C und 39°C eingestellt werden.



**Abbildung 3** Zusammensetzung von thermosensitiven Hydrogelen auf Hyaluronsäurebasis

Im Rahmen der Entwicklung thermosensitiver Hydrogele haben die Projektpartner zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die die Eigenschaften der Gele charakterisieren. Dazu zählen Messungen von Lichttransmission, Brechungsindex, Dichte, Osmolarität, Rheologie und Permeabilität. Diese Ergebnisse sind nicht Gegenstand dieser Arbeit, können aber, soweit von unseren Projektpartnern bereits veröffentlicht (Santan, Neffe et al. 2012) (Santan 2013), recherchiert werden.

Die Proben, die wir von den Projektpartnern erhalten, werden entwicklungsbegleitend untersucht. Dabei sind die Ergebnisse der Zytotoxizitäts- und Biokompatibilitätstests ausschlaggebend für eine Änderung des chemischen Aufbaus oder des Syntheseprozesses der thermosensitiven Hydrogele.

Anhand ihrer Herstellungscharge, pro Charge gibt es unterschiedlich viele Gelproben, sind die Gele für die Zytotoxizitätstests in Gruppen eingeteilt worden, welche nachfolgend vorgestellt werden. Sofern nicht anders beschrieben, wurde als Biopolymer für die Herstellung des Hydrogels Hyaluronsäure (HA) mit einer atomaren Masse zwischen 1,2 MDa und 3 MDa verwendet. Das Verhältnis von Biopolymer zu Poloxamer in der Komposition variierte zwischen den unterschiedlichen Gelgruppen.

Bis auf die Gele der Gruppen 1 - 3 wurden alle Substanzen von den Projektpartnern 20 min bei 121°C und 1 bar dampfsterilisiert und steril an uns ausgehändigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Gele konstant bei +4°C im Kühlschrank gelagert wurden. Nach Herstellerangaben der Projektpartner wurde bei allen Proben jeweils ein pH-Wert von 7 gemessen.

### **Gruppe 1**

Gele dieser Gruppe wurden uns von den Projektpartnern pulverförmig und unsteril bereitgestellt. Nach Herstellerangaben betrug das Verhältnis zwischen

Biopolymer und Poloxamer 2,8 : 97,2. Das Poloxamer lag vorwiegend in monoaminierter Form vor.

### **Gruppe 2**

Diese Proben lagen uns ebenfalls als Pulver in nicht sterilisierter Form vor. Nach Herstellerangaben betrug das Verhältnis zwischen Biopolymer und Poloxamer 3,5 : 96,5. Das Poloxamer lag vorwiegend in monoaminierter Form vor.

### **Gruppe 3**

Auch diese Proben haben wir als Pulver in nicht sterilisierter Form erhalten. Das Poloxamer in dieser Komposition lag ebenfalls vorwiegend in monoaminierter Form vor.

### **Gruppe 4**

Gele dieser Gruppe lagen in Natriumphosphatpuffer gelöst und steril vor. Als Sterilisationsverfahren hat sich 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C und 1 bar durchgesetzt. Der von uns gemessene pH-Wert der Proben war 6,5-6,8. Das Poloxamer lag vorwiegend in monoaminierter Form vor. Das Verhältnis zwischen Biopolymer und Poloxamer betrug 2,6 : 97,4. Bei diesen Gelen wurde von den Projektpartnern eine Osmolaritätsbestimmung durchgeführt, welche eine Osmolarität von 800 mosmol/l ergab.

### **Gruppe 5**

Proben dieser Gruppe lagen ebenfalls steril und in Natriumphosphatpuffer gelöst vor. Laut Hersteller erfolgte bei der Synthese dieser Gele ein weiterer Aufreinigungsschritt. Das Verhältnis zwischen Biopolymer und Poloxamer betrug 2,5 : 97,5. Das Poloxamer lag vorwiegend in monoaminierter Form vor. Die Osmolarität dieser Gele betrug 800 mosmol/l.

### **Gruppe 6**

Als Lösungsmittel wurde Natriumphosphatpuffer verwendet. Bis auf Probe 6 waren alle Proben klar und bei Raumtemperatur flüssig. Mit Probe 6 ist beim

Sterilisieren anders verfahren worden. Es fand laut Hersteller eine Hitzesterilisation bei 165°C über 90 min statt, mit dem Resultat, dass das Gel gelblich verfärbt und bei Raumtemperatur geliert vorliegt. Aufgrund dieser Eigenschaften, die auf eine zerstörte Gelstruktur hindeuten, wurden keine weiteren Versuche mit Probe 6 durchgeführt. Das Verhältnis zwischen Biopolymer und Poloxamer bei Proben dieser Gruppe betrug 2,6 : 97,4. Das Poloxamer lag vorwiegend in monoaminierter Form vor. Die Osmolarität dieser Gele betrug 800 mosmol/l.

### **Gruppe 7**

Gele dieser Gruppe unterschieden sich in ihrem Biopolymer von den anderen Gelgruppen. Hier erfolgte die Herstellung der Gele durch Aufpolymerisieren von Chondroitinsulfat anstelle von Hyaluronsäure. Das Verhältnis zwischen Biopolymer und Poloxamer betrug 2,7 : 97,3. Das Poloxamer lag vorwiegend in monoaminierter Form vor. Als Lösungsmittel wurde Natriumphosphatpuffer verwendet. Zur Osmolarität dieser Gele wurden keine Angaben gemacht. Die Proben waren bei Raumtemperatur flüssig und leicht gelblich verfärbt. Nach Angaben des Herstellers lag die Gelierungstemperatur dieser Gele bei 30°C.

### **Gruppe 8**

Bei den Proben dieser Gruppe handelte es sich um kommerziell erhältliches Poloxamer, welches in Natriumphosphatpuffer gelöst wurde. Somit kann untersucht werden, ob es bezüglich der Zytotoxizität einen Unterschied im Vergleich zu Gelen mit funktionalisiertem Poloxamer gibt. Der von uns gemessene pH-Wert beträgt 7,1-7,4.

### **Gruppe 9**

Die Gele dieser Gruppe enthalten monoaminiertes Poloxamer, welches in Natriumphosphatpuffer gelöst wurde. Die Proben lagen von Anfang an leicht gelblich verfärbt vor. Der von uns gemessene pH-Wert betrug 6,8. Um den Einfluss des pH-Werts auf die Zytotoxizität genauer zu beobachten, ist eine Probe dieser Charge zusätzlich zum test with liquid extracts from the test

material und zum direct contact test mit einer Variante des direct contact tests untersucht worden (Versuchsaufbau siehe 3.3.2 Variante des direct contact tests).

### **Gruppe 10**

Zur Reduzierung der Osmolarität wurde die pulverförmige Gelgrundlage im Gegensatz zu den bisher getesteten Substanzen nicht in Natriumphosphatpuffer gelöst, sondern in Reinstwasser. Die Osmolarität dieser Proben betrug laut Hersteller 400 mosmol/l. Das Verhältnis zwischen Biopolymer und Poloxamer betrug 2,6 : 97,4. Das Poloxamer lag vorwiegend in monoaminierter Form vor. Der von uns gemessene pH-Wert betrug 6,3.

### **Gruppe 11**

Die Proben enthielten wieder Hyaluronsäure als Biopolymer und sowohl mono- als auch di-Amino-PEPE. Als Lösungsmittel wurde Natriumphosphatpuffer verwendet. Der von uns gemessene pH-Wert betrug 7,43.

### **Gruppe 12**

Diese Gelgruppe enthielt Hyaluronsäure und den Quervernetzer 1- Ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) in Natriumphosphatpuffer gelöst, jedoch ohne Poloxamer. Aufgrund der geringen Materialmenge konnten wir nur Tests with liquid extracts from the test material durchführen.

### **Gruppe 13**

Von den Proben dieser Gruppe haben wir ebenfalls nur wenig Material erhalten. Sie bestehen laut Herstellerangaben aus Hyaluronsäure, EDC und mono-Amino-PEPE und sind in Natriumphosphatpuffer gelöst worden.

### **Gruppe 14**

Gele dieser Gruppe enthielten laut Hersteller vorwiegend diaminiertes Poloxamer, welches in Natriumphosphatpuffer gelöst wurde. Das Verhältnis zwischen Biopolymer und Poloxamer betrug 5 : 95. Die Osmolarität dieser

Proben konnte von unseren Projektpartnern nicht bestimmt werden. Unsere Projektpartner gaben einen pH-Wert von 7 an, unsere eigene Messung ergab jedoch einen pH-Wert von 6,6. Daher ist von einer Änderung des pH-Wertes auszugehen. Aufgrund dieses relativ sauren, unphysiologischen pH-Werts der Proben findet in den direct contact tests eine engmaschigere Beobachtung statt (nach 1,5 h, nach 2,5 h, nach 4 h, nach 24 h und nach 72 h) um die Entwicklung der Zellen nachzuvollziehen. Anschließend haben wir zusätzlich einen modifizierten direct contact test (Versuchsaufbau siehe 3.3.2 Variant des direct contact test) durchgeführt um den Einfluss des pH-Werts auf die Zytotoxizität zu untersuchen.

### **Gruppe 15**

Gele dieser Gruppe lagen in Natriumphosphatpuffer gelöst und steril vor. Sie zeigten sich klar und transparent. Das enthaltene Poloxamer lag vorwiegend in diaminierter Form vor und das Verhältnis zwischen Biopolymer und Poloxamer lag bei 5 : 95. Bei diesen Gelen wurde von den Projektpartnern eine Osmolarität von ca 460mOsmol/l gemessen. Der von uns bestimmte pH-Wert der Proben betrug 7,6.

### **Gruppe 16**

Bei den Proben dieser Gruppe handelte es sich um mit di-Amino-PEPE aufpolymerisierte Hyaluronsäure, welche in Natriumphosphatpuffer gelöst wurde. Der von uns bestimmte pH-Wert betrug 5,1.

## **3.2 Entwicklungsbegleitende operative Handling-Versuche**

Entwicklungsbegleitend werden Versuche zur operativen Handhabbarkeit der Gele in vitro und ex vivo mit folgender Fragestellung durchgeführt: Welche physikalischen und mechanischen Eigenschaften besitzen die Gele? Welche Aussagen können über das operative Handling getroffen werden?

### 3.2.1 Physikalische und mechanische Eigenschaften der Gele

Da wir die ersten Gelproben in Pulverform erhalten, besteht der erste Schritt in der Herstellung eines flüssigen Gels. Das Pulver, das im Kühlschrank bei +4°C gelagert wurde, wird nun bei Raumtemperatur in intraokularer Spülflüssigkeit (BSS plus, Firma AriTec) mit 20 % Massenanteil unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers aufgelöst.

Bei der Untersuchung der Thermosensitivität beobachtet man das Viskositätsverhalten der Gele bei Temperaturänderung. Dazu werden die Gele aus dem Kühlschrank genommen um einen Geltröpfchen auf einen Objektträger zu geben, der auf einer Wärmeplatte bei 37°C erwärmt wird. Um die Reversibilität einer Viskositätsänderung zu prüfen, wird das Gel anschließend wieder abgekühlt und beobachtet.

Des Weiteren wird Gel im flüssigen Zustand auf die Netzhaut eines Eyecups gegeben, welches ebenfalls auf der Wärmeplatte bei 37°C erwärmt wird. So kann das Gelierungsverhalten des Gels auf der Netzhaut ex vivo beobachtet werden.

### 3.2.2 Operative Handhabbarkeit der Gele

Für das operative Handling ist die Injizierbarkeit eines Gels entscheidend. Diese kann durch Injektionsversuche mit Kanülen unterschiedlicher Größe (20 G, 21 G und 27 G) getestet werden. Dazu wird ein flüssiger Geltröpfchen bei Raumtemperatur jeweils durch eine Kanüle aspiriert und wieder auf den Objektträger injiziert. Anschließend wird der Objektträger mit dem Geltröpfchen auf die Wärmeplatte gegeben um zu testen, ob die Gelierungsfähigkeit des Gels durch die Injektion durch dünne Kanülen beeinflusst worden ist.

Um die Visualisierbarkeit des Gels und seine Mischbarkeit mit einer wässrigen Phase zu testen, wird das Gel auf der Wärmeplatte mit intraokularer Spülflüssigkeit überschichtet. Die wässrige Phase wurde vorher zur besseren Visualisierbarkeit mit Brillant Peel (FLUORON GmbH) angefärbt.

### 3.3 Entwicklungsbegleitende Zytotoxizitätstests

Um die Zytotoxizität der Testsubstanzen zu untersuchen wurden zwei Methoden ausgewählt. Beide Methoden entsprechen den Anforderungen der ISO 10993-5, 1999 (Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity) und eignen sich zur Beurteilung der zytotoxischen Effekte von implantierbaren Materialien, welche langfristig in vivo verweilen und in engem Kontakt mit körpereigenen Geweben stehen.

Je Gel-Typ werden nach Möglichkeit beide Testmethoden angewendet. Je Gelprobe und Testverfahren werden mindestens drei Wiederholungsversuche durchgeführt.

Für alle Zellkulturversuche werden Mausfibroblasten der Linie 929 verwendet, einer etablierten Zelllinie, die in der ISO 10993-5 empfohlen wird.

Vom Auftauen der Zellen bis Versuchsbeginn vergehen durchschnittlich sieben Tage und die Zellen sind mindestens zweimal passagiert worden, bevor sie zu Versuchen herangezogen werden. Die allgemeinen Zellkulturbedingungen sind im Anhang unter Punkt 11.2.2 genauer beschrieben.

#### 3.3.1 Direct contact test

Der direct contact test ist dadurch gekennzeichnet, dass Zellen in direkten Kontakt mit der Testsubstanz gebracht werden. Dieser Test ermöglicht sowohl eine quantitative, als auch eine qualitative Bewertung des Zellwachstums mittels Durchlichtmikroskopie.

#### Material

Der Test wird an Mausfibroblasten L929 in 12-well Kulturplatten durchgeführt. Benötigt werden sterile Glasplättchen, Kulturmedium, PBS Spülflüssigkeit, Testsubstanz, Eppendorfpipetten und für die Bewertung am Ende Trypanblau sowie ein Lichtmikroskop (siehe 11.1.3).

### **Methode**

Mausfibroblasten der Linie L929 werden in einer 75 ml Kulturflasche unter Standardbedingungen herangezüchtet (siehe 11.2.2) bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist und die Zellen zu 80 % konfluent sind, d.h. sie sind am Ende der logarithmischen Wachstumsphase angelangt (ISO 10993-5, S.2). In diesem Stadium werden die Zellen passagiert und sind dann für den Versuch bereit. Die 12-well Kulturplatte wird präpariert, indem in jedes well ein steriles Glasplättchen gelegt wird, welches gegebenenfalls als herausnehmbare Unterlage dient. Anschließend werden jeweils 100 µl der Testsubstanz auf die Glasplättchen in den wells gegeben. Die letzte Spalte der 12-well Platte bleibt dabei frei von Testsubstanz und dient als Kontrolle. Nun wird die 12-well Platte für 3 min in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gegeben, damit die Gele gelieren. Als nächstes wird in jedes well 100 µl Zellsuspension á 20.000 Zellen pipettiert. Somit werden die Zellen in direkten Kontakt mit der Testsubstanz gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C im CO<sub>2</sub> Inkubator wird jedes well vorsichtig mit 2 ml Kulturmedium aufgefüllt und für 4 Tage in den Inkubator gegeben. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank. Nach 4 Tagen können die Zellen unter dem Lichtmikroskop begutachtet werden.

Zur deutlicheren Differenzierung von vitalen und toten Zellen wird ein Trypanblau-Test durchgeführt. Hierzu werden mit einer Pipette 2 Tropfen Trypanblau in jedes well gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 2 min spült man jedes well mit PBS und pipettiert die Spülflüssigkeit anschließend vorsichtig ab. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau nicht auf, da ihre Zellmembran intakt ist. Tote Zellen färben sich hingegen blau an, was unter dem Lichtmikroskop zu beobachten ist.

## Beurteilung

Die Beurteilung erfolgt am vierten Tag nach folgenden Kriterien:

- Substanz: Um zu beurteilen, wie sich die Testsubstanz (= Gel) in der Zellkultur verändert hat, werden die in Tabelle 3 angeführten Kriterien berücksichtigt.

**Tabelle 3** Beurteilung der Testsubstanz (= Gel) im direct contact test

| Beurteilungskriterium             | ja/nein |
|-----------------------------------|---------|
| bleibt als Gel am Boden des Wells | +/-     |
| bleibt klar                       | +/-     |
| mischt sich mit Medium            | +/-     |

- Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle:

Wie gut die Zellen im Untersuchungszeitraum gewachsen sind, d.h. wie stark die Zellzahl gestiegen ist, soll durch einen Schätzwert der Zellzahl in Prozent objektiviert werden. Hierzu werden vier Stufen unterschieden, die in Tabelle 4 genannt sind.

**Tabelle 4** Beurteilung des Zellwachstums im direct contact test

| Benennung         | Definition   | Zeichen |
|-------------------|--|---------|
| kein Wachstum     | es sind keine Zellen gewachsen                       | 0       |
| geringes Wachstum | < 50 % der Fläche eines wells ist mit Zellen bedeckt | +       |
| mäßiges Wachstum  | > 50 % der Fläche eines wells ist mit Zellen bedeckt | ++      |
| starkes Wachstum  | hyperkonfluent, mehrschichtiger Zellrasen            | +++     |

- Zelltod: Mithilfe der Trypanblaufärbung kann zwischen toten und vitalen Zellen unterschieden werden. Zur Bestimmung der Anzahl abgestorbener Zellen werden drei Stufen unterschieden, die in Tabelle 5 aufgelistet sind.

**Tabelle 5** Beurteilung des Zelltods im direct contact test

| Benennung          | Definition                         | Zeichen |
|--------------------|------------------------------------|---------|
| keine toten Zellen | Es sind keine Zellen abgestorben   | 0       |
| geringer Zelltod   | < 50 % der Zellen sind abgestorben | -       |
| starker Zelltod    | > 50 % der Zellen sind abgestorben | --      |

- Zelllokalisierung: Hier soll beobachtet werden, ob ein Einwandern von Zellen in die Substanz stattfindet und ob Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zur Substanz wachsen können. Die genauen Beurteilungskriterien sind Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6** Beurteilung der Zelllokalisierung im direct contact test

| Zelllokalisierung                             | ja/nein |
|---|---------|
| Zellen sind auf der Geloberfläche adhärent    | +/-     |
| Zellen sind im well unter dem Gel adhärent    | +/-     |
| Zellen wachsen dreidimensional in das Gel ein | +/-     |

### 3.3.2 Variante des direct contact test für pH-Versuche

Bei diesem Versuch lautet die Fragestellung, welchen Einfluss der pH-Wert auf die Zytotoxizität hat. Dazu werden zunächst die Ausgangs-pH-Werte ausgesuchter Gele mit Indikatorpapier bestimmt. Anschließend werden Gele und ihre Verdünnungen mit Natronlauge bzw. Salzsäure auf verschiedene pH-Werte titriert und das Zellwachstum über 24 h beobachtet.

Der Ansatz in der 12-well-Platte ist wie folgt (Tabelle 7):

Mausfibroblasten L929 P4

- 1) 1 ml Substanz für 3 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator vorinkubiert
- 2) 100 µl Zellsuspension á 20.000 Zellen werden hinzugegeben
- 3) ggf. Titration
- 4) ggf. Verdünnung mit DMEM

**Tabelle 7** Versuchsaufbau der Variante des direct contact tests (schematisch): 12-well-Platte mit Gelen, welche auf unterschiedliche pH-Werte titriert wurden

|   |  |   |
|---|--|---|
| <b>DMEM (Kontrolle)</b><br><b>pH 7,4</b><br><br>n=1 | <b>Gel aus Gruppe 9</b><br><b>pH 6,8</b><br><b>pur</b><br><br>n=1                                      | <b>Gel aus Gruppe 14</b><br><b>pH 6,6</b><br><b>pur</b><br><br>n=1                                      |
| <b>DMEM</b><br><b>pH 6,5 titriert</b><br><br>n=2    | <b>Gel aus Gruppe 9</b><br><b>pH 7,4 titriert</b><br><br>n=2   | <b>Gel aus Gruppe 14</b><br><b>pH 7,4 titriert</b><br><br>n=2   |
|   | <b>Gel aus Gruppe 9</b><br><b>pH 7,4 titriert</b><br><b>1:1 verdünnt mit</b><br><b>DMEM</b><br><br>n=1 | <b>Gel aus Gruppe 14</b><br><b>pH 7,4 titriert</b><br><b>1:1 verdünnt mit</b><br><b>DMEM</b><br><br>n=2 |

### 3.3.3 Test with liquid extracts from the test material

Gemäß ISO ermöglicht dieser Test die Untersuchung der Zytotoxizität flüssiger Extrakte von festen Testsubstanzen. Da die Testsubstanzen in unserem Fall flüssig sind, sprechen wir nicht von Extrakten, sondern von Verdünnungen.

Bei diesem Test wird das zytotoxische Potential verschiedener Verdünnungen der Testsubstanz auf die Zellvitalität und –proliferation untersucht. Durch eine colorimetrische Auswertung im Mikrotiterplatten-Photometer ist eine quantitative Beurteilung möglich.

#### Material

Der Test wird mit Mausfibroblasten der Zelllinie L929 durchgeführt. Außerdem benötigt man eine 96-well Kulturplatte, Kulturmedium, PBS-Puffer, 0,9 % NaCl, DMSO, Eppendorfpipetten sowie die thermosensitiven Hydrogele als Testsubstanzen. Zur Auswertung werden EZ4U® (non radioactive cell proliferation & cytotoxicity assay) und ein Photometer verwendet (siehe Anhang 11.1.4)

#### Methode

Für die Beurteilung der Zellvitalität wird hier ein Mitochondrien-Viabilitäts-Test (EZ4U®) verwendet, ein nicht radioaktiver Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest.

Prinzip: da nur vitale Zellen intakte Mitochondrien besitzen, kann mit diesem Test zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen unterschieden werden. Intakte Mitochondrien weisen eine metabolische Aktivität auf und können die zugegebene Farbstofflösung, eine leicht gelb gefärbte Tetrazoliumverbindung, in das optisch dichtere ziegelrote Formazanderivat umsetzen. (Quelle: EZ4U® user manual) Dieser Farbumschlag lässt sich photometrisch genau ermitteln und somit der prozentuale Anteil an vitalen Zellen. Der Ansatz gilt dann als zytotoxisch, wenn im Vergleich zur Kontrolle mehr als 30% Wachstums- hemmung (growth inhibition G.I.) vorliegt. Die Berechnung der G.I. erfolgte nach folgender Formel:

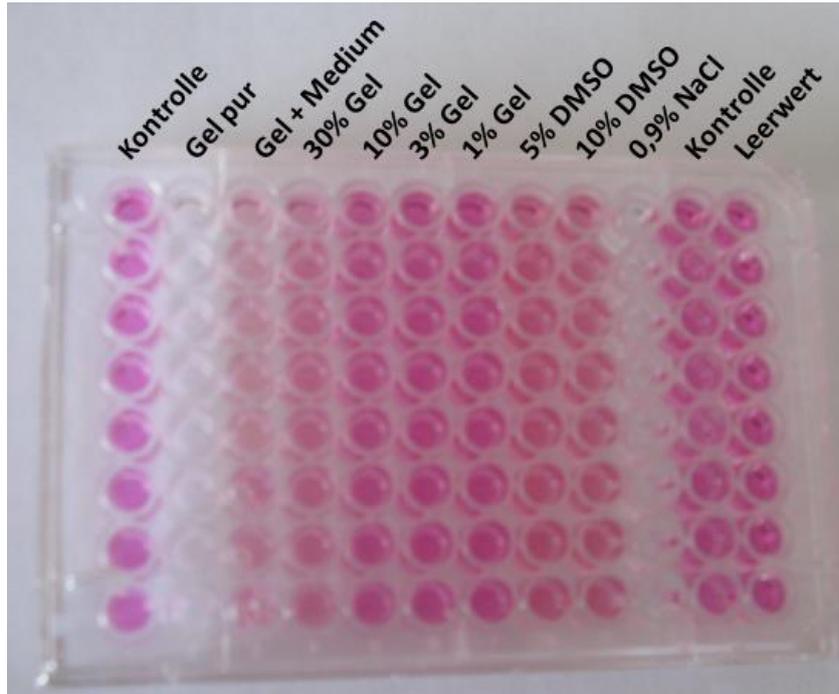
$$G.I. [\%] = 100 - 100 \times \frac{A_{492 \text{ nm Probe}}}{A_{492 \text{ nm Kontrolle}}}$$

Durchführung: Entsprechend der Gebrauchsanweisung für EZ4U® werden 200 µl Zellsuspension à 2000 Zellen (Mausfibroblasten L929, unter Standardbedingungen vorkultiviert) in jedes well gegeben. Nach ca. 72 h bei 37°C im CO<sub>2</sub> Inkubator ist eine Konfluenz der Zellen von etwa 80 % erreicht, d.h. die Zellen befinden sich am Ende der logarithmischen Wachstumsphase (ISO 10993-5, S.2).

Der nächste Schritt besteht in der Herstellung einer Verdünnungsreihe der Testsubstanz. Dafür werden vier verschiedene Verdünnungen des Gels mit Kulturmedium angefertigt. Das Verhältnis Gel/Medium beträgt 0,3 / 0,7 (30 % Gel); 0,1 / 0,9 (10 % Gel); 0,03 / 0,97 (3 % Gel) und 0,01 / 0,99 (1 % Gel). Zum direkten Vergleich wird in einer Spalte der Kulturplatte pure Testsubstanz direkt auf die Zellen gegeben. Als weitere Testmöglichkeit wurde folgende Variante eingeführt: Auf den Zellrasen werden zuerst 100 µl Gel pur gegeben, welches dann mit 100 µl Kulturmedium überschichtet wird, ohne dabei beide Substanzen zu vermischen.

Als Negativkontrolle, laut ISO ein Material, das keine zytotoxische Antwort hervorruft, dient reines Kulturmedium und als Positiv-Kontrolle, gemäß ISO ein Material, das reproduzierbare zytotoxische Antworten hervorruft, verwenden wir 0,9 % Natriumchlorid (NaCl) sowie Dimethylsulfoxid (DMSO). Das DMSO kommt mit Kulturmedium verdünnt als 5-prozentige bzw. 10-prozentige Lösung zum Einsatz.

In jedes well werden jeweils 200 µl Gel in seinen verschiedenen Verdünnungen oder Kontrollsubstanz gegeben (Versuchsaufbau siehe Abbildung 4). In den mit „Leerwert“ beschrifteten wells befindet sich nur Kulturmedium ohne Zellen.



**Abbildung 4** Versuchsaufbau "test with liquid extracts from the test material" nach Zugabe des EZ4U® Farbstoffs

Nachdem die 96-well Kulturplatte weitere 72 h im CO<sub>2</sub> Inkubator bei 37°C inkubiert wurde, erfolgt die Auswertung. Hierfür werden jeweils 20 µl EZ4U® Farbstofflösung, bestehend aus Substrat und Aktivator, in jedes well gegeben und eine Inkubationszeit von 3 h bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator eingehalten. Schließlich kann die Kulturplatte zum Ablesen in einen Mikrotiterplatten-Photometer gegeben werden. Dieser misst die Extinktion (optische Dichte) bei 492 nm mit 620 nm als Referenzwert.

### 3.4 Erweiterte Biokompatibilitätstests in vitro

Je näher das im Versuch verwendete Gewebe an die Realität der Netzhaut in vivo reicht, desto zutreffender lassen sich Aussagen über Netzhauteffekte der Gele machen. Zellkulturversuche besitzen nur eine begrenzte Aussagekraft über das Verhalten der Netzhaut unter dem Einfluss von semisynthetischen Glaskörperersatzstoffen. Als nächste Stufe vor dem Tierversuch bietet sich ein organotypisches Modell der Netzhaut in der Perfusionskultur an. Dieses etablierte Modell ermöglicht die Testung der Netzhautverträglichkeit von Glaskörperersatzstoffen. Dazu wird die Retina mit dem darunterliegenden retinalen Pigmentepithel und Choroidea präpariert und in eine Perfusionskammer gegeben, in der eine ständige Versorgung mit Kulturmedium gewährleistet ist. Schließlich erfolgt die histologische Beurteilung der Netzhaut mit dem Lichtmikroskop.

#### 3.4.1 Materialien

Das für den Versuch benötigte Netzhautgewebe wird aus porkinen Bulbi gewonnen, die gekühlt in 0,9% NaCl direkt vom Schlachthof in das Labor transportiert werden. Des Weiteren benötigt man für die Gewebepräparation eine E nukleationsschere, Einmalskalpelle, Tupfer, eine Styroporplatte und Nadeln zur Fixierung, eine gezahnte und eine ungezahnte Pinzette, eine Spritze mit Kulturmedium und ein Operationsmikroskop. Die Elemente und der Aufbau des Perfusionskultursystems werden im Folgenden genauer beschrieben.

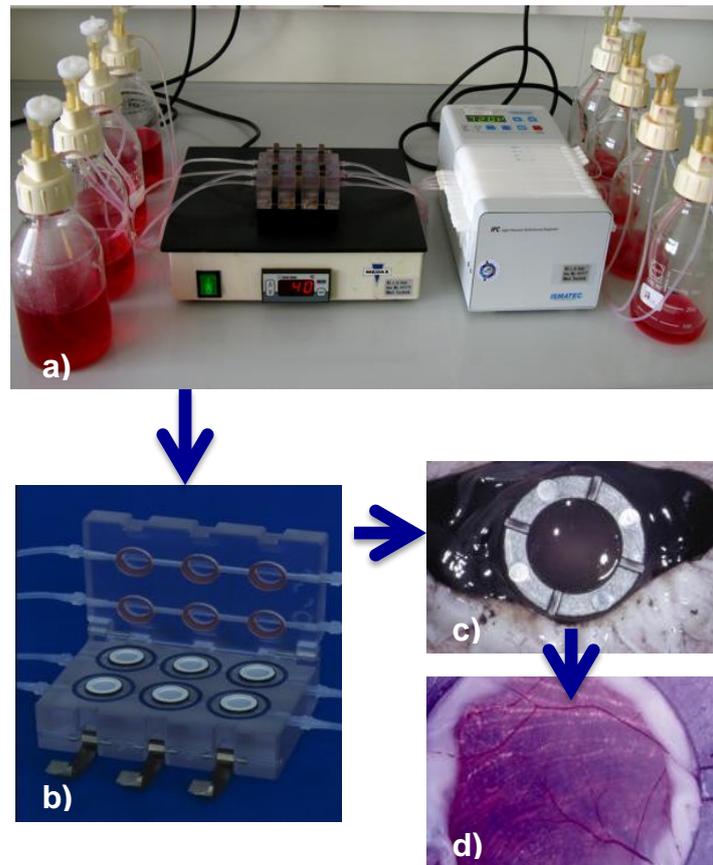
#### 3.4.2 Methode der Gewebepräparation

Unter dem OP-Mikroskop soll Netzhautgewebe als **porc Retina Pigmentepithel Choroidea (pRPEC)** präpariert werden. Dabei ist auf möglichst arme Lichtverhältnisse Wert zu legen, damit die Retina nicht unnötig strapaziert wird. Zuerst werden Muskelgewebe und Bindehaut mit einer E nukleationsschere vom Bulbus entfernt. Anschließend erfolgt die Eröffnung des Bulbus durch Inzision

mit einem Skalpell 2-3 mm vom Limbus entfernt und kreisrundes Ausschneiden des Vordersegments mit einer Eukleationsschere. Mit einer gezahnten Pinzette kann das gesamte Vordersegment angehoben werden. Mit einem Tupfer entfernt man den Glaskörper vorsichtig aus dem Bulbus, ohne dabei das Netzhautgewebe zu beschädigen. Im nächsten Schritt halbiert man das leere Eyecup auf Höhe der Papilla Nervi Optici mit der Eukleationsschere. Zur Präparation des pRPEC wird die größere Hälfte herangezogen. Vom Rand aus beginnt man nun Sklera und Choroidea voneinander zu trennen. Um die anatomische Wölbung des Bulbus zu glätten, wird die Sklera vom Rand aus an mehreren Stellen inzidiert und mit Nadeln auf der Styroporplatte fixiert. Dies gewährleistet ein faltenfreies Arbeiten im Präparationsgebiet. Mit einer gezahnten Pinzette wird der Rand des pRPEC vorsichtig angehoben und die an manchen Stellen noch haftenden chorioskleralen Fasern mit dem Skalpell scharf durchtrennt. Mit dieser Technik arbeitet man auf den Sehnerven zu bis man eine Fläche pRPEC von etwa  $1,5 \text{ cm}^2$  bis  $2 \text{ cm}^2$  mobilisiert hat. Währenddessen sollte das pRPEC stets mit Kulturmedium benetzt sein. Wichtig ist, bei der Präparation darauf zu achten, dass sich Retina und Choroidea nicht voneinander lösen. Anschließend wird das pRPEC in einen Gewebeträger eingelegt. Dieser besteht aus einem Doppelringssystem, einem kleinen und einem größeren Kunststoffring, die ineinander passen. Um das Gewebe in den Träger einzuspannen, schiebt man den kleineren Ring unter Anheben des pRPEC vorsichtig darunter und lässt das Gewebe faltenfrei zum Liegen kommen. Dann platziert man den größeren Ring exakt auf dem kleineren und fixiert das pRPEC zwischen den Ringen durch leichtes Andrücken. Gewebeüberstände, die über den Rand der Ringe hinausragen, werden mit einer Schere entfernt. Pro Exemplar beträgt die Präparationsdauer etwa 15 min. Die Zeiten von Präparationsbeginn bis zur Applikation der Testsubstanz auf der Netzhaut und bis zum Start der Perfusionskultur werden jeweils schriftlich festgehalten.

### 3.4.3 Perfusionskultur

Das Perfusionskultursystem ist wie folgt aufgebaut (Abbildung 5): Vier Glasflaschen dienen als Mediumzufuhr. Über Silikonschläuche wird Kulturmedium aus jeder der vier Flaschen mithilfe einer Peristaltikpumpe in die Kammer mit den Präparaten transportiert. Die Kammer steht auf einer Wärmeplatte. Außerdem hat die Kammer 6 Präparatplätze, die in 2 Reihen à 3 Plätzen angeordnet sind. Werden später die Gewebeträger mit den Netzhautpräparaten platziert, unterteilen sie jeden Präparatplatz in ein oberes und ein unteres Kompartiment, mit einem Volumen von jeweils 0,5 ml. So können die Präparate von beiden Seiten mit Medium umströmt werden. Dementsprechend hat die Kammer vier Ein- und vier Ausgänge, für jede der beiden Reihen einen für die Etage über dem Präparat und einen unterhalb des Präparats. Ebenfalls über vier Silikonschläuche kann das Medium in vier Auffangbehälter abfließen.



**Abbildung 5** Darstellung des Perfusionskultursystems

- a) Perfusionskultursystem; von rechts nach links: Kulturmediumzufuhr, Peristaltikpumpe, Wärmeplatte mit Präparatkammer, Kulturmediumauffangbehälter
- b) Perfusionskammer mit eingesetzten Gewebeträgern
- c) Präparieren des pRPEC
- d) Präparat im Gewebeträger

Das Perfusionskultursystem wird an der Sterilbank vorbereitet. Zuerst werden die Flaschen, die als Mediumzufuhr dienen, mit Kulturmedium gefüllt. Anschließend werden die einzelnen Komponenten unter sterilen Bedingungen zusammengebaut. Jene Öffnung der Flaschenverschlusskappen, welche für den Druckausgleich vorgesehen ist, wird mit einem 0,20µm Sterilfilter verschlossen. Außerdem werden die Verschlusskappen der Flaschen mit dem Schlauchsystem verbunden. Dieses besteht je Flasche aus einer Hintereinanderschaltung von einem 18cm langen Förderschlauch, zwei Zulaufschläuchen mit jeweils 50cm Länge und einem Pumpschlauch. Jeweils das freie Ende des Pumpschlauchs wird an die Kammer angeschlossen. Alle

bisher genannten Elemente bilden den Zulaufschenkel des Systems. Der Ablaufschenkel besteht aus vier jeweils 50 cm langen Silikonschläuchen, die das Medium über die Ausgänge der Kammer in vier Auffangbehälter ableiten. Ist das Perfusionskultursystem fertig vorbereitet, können mit einer sterilen Pinzette die Präparate im Gewebeträger in die Perfusionskammer eingesetzt werden. Dabei bleiben bei jedem Versuch jeweils 2 Präparate frei von Testsubstanz, welche als Kontrollpräparate dienen. Anschließend wird die Kammer mit den dafür vorgesehenen Klemmen verschlossen. Um die Perfusion zu starten, wird an der Peristaltikpumpe eine Flussgeschwindigkeit des Mediums von ca. 72  $\mu\text{l}/\text{min}$  eingestellt, welche über den Zeitraum von vier Tagen beibehalten wird. Nach Ablauf der vier Tage wird der Versuch beendet.

#### **3.4.4 Histologie**

Nach Beenden der Perfusion werden die Präparate der Kammer wieder entnommen, zur Fixierung für ca 48 h in 12-well-Kulturplatten in 4% Paraformaldehyd gelegt und gekühlt. Als nächstes wird der Gewebeträger unter dem OP-Mikroskop geöffnet und das Gewebe vorsichtig herausgenommen. Auf einem Paraffinblock wird die zentrale Netzhaut für die Lichtmikroskopie mit einer Rasierklinge zugeschnitten. Damit sich Netzhaut und Aderhaut während der folgenden Schritte nicht gegeneinander verschieben, wird das zugeschnittene pRPEC auf ein angefeuchtetes Zellulose regeneratfasergewebe gelegt, welches, durch Umklappen des freien Teils, das Präparat von beiden Seiten umgibt. Das vorbereitete Präparat wird in eine Einbettkassette gegeben und in Formaldehyd eingelegt zum Pathologischen Institut transportiert, wo es nach dem Standardprotokoll des Institutes für Pathologie der Technischen Universität München in Paraffin eingebettet wird. Anschließend werden Schnitte von 4-6  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt und eine HE-Färbung durchgeführt (siehe Kapitel 11.2.5). Mit dem Durchlichtmikroskop werden die fertigen Präparate histologisch beurteilt. Dabei werden der allgemeine Erhalt der Netzhautarchitektur einerseits und der morphologische Gewebeerhalt der einzelnen Netzhautschichten andererseits bewertet.

## 4 Studiendesign

Bei der Untersuchung der Gele auf ihre Eigenschaften, ihre Zytotoxizität und ihre Netzhautverträglichkeit ist wie folgt verfahren worden: Handling-Versuche zur Untersuchung der Geleigenschaften wurden zu Beginn, nach Erhalt der Gelproben, vorgenommen. Es erfolgten mindestens 3 Zytotoxizitätstests mit Gelen aus jeder Gelgruppe. Abhängig von den Ergebnissen der Zytotoxizitätstests wurden mit ausgewählten Gelen weiterhin Biokompatibilitätstests in der Perfusionskultur durchgeführt. Die Anzahl der Versuche richtete sich auch nach der zur Verfügung stehenden Menge an Testsubstanz.

Tabelle 8 bietet einen Überblick über die durchgeführten Versuche. Gele aus Gruppe 1 waren unsteril, deshalb wurde auf Zytotoxizitätstests verzichtet.

**Tabelle 8** Übersicht über die durchgeführten Versuche

| Gelgruppe | direct contact test | test with liquid extracts | Perfusionskultur | Handling-Versuche* |
|-----------|---------------------|---------------------------|------------------|--------------------|
| 1         | -                   | -                         | -                | n=1                |
| 2         | n=3                 | -                         | -                | n=1                |
| 3         | n=3                 | -                         | -                | n=1                |
| 4         | n=3                 | n=16                      | n=4              | n=1                |
| 5         | n=3                 | n=24                      | -                | n=1                |
| 6         | n=12                | n=34                      | n=2              | n=1                |
| 7         | n=6                 | n=32                      | -                | n=1                |
| 8         | n=3                 | n=8                       | -                | n=1                |
| 9         | n=3                 | n=8                       | -                | n=1                |
| 10        | n=6                 | n=16                      | -                | n=1                |
| 11        | n=3                 | n=7                       | -                | n=1                |
| 12        | -                   | n=4                       | -                | n=1                |
| 13        | -                   | n=4                       | -                | n=1                |
| 14        | n=6                 | n=8                       | -                | n=1                |
| 15        | n=9                 | n=8                       | n=6              | n=1                |
| 16        | n=3                 | n=8                       | -                | n=1                |

\* bezieht sich ausschließlich auf die Aspekte Injizierbarkeit und Thermosensitivität der Gele. Weitere Handling-Versuche wurden aufgrund der geringen Probenmengen der zu untersuchenden Gele nicht mit allen Gelen durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

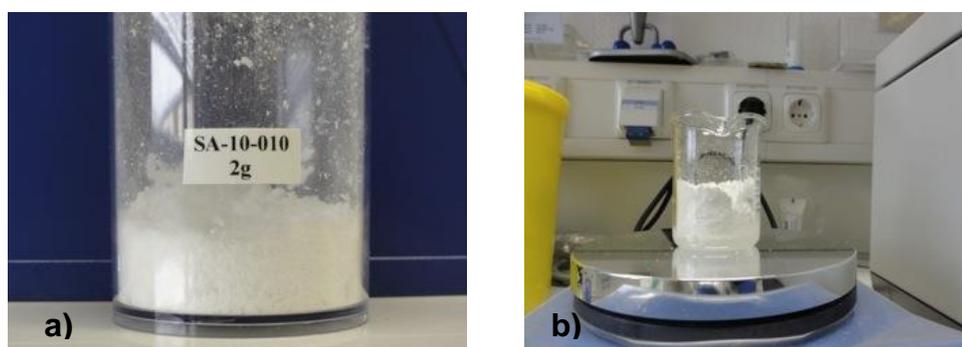
### 5.1 Ergebnisse der operativen Handling-Versuche

Ziel der Handling-Versuche war, sowohl die physikalischen und mechanischen Eigenschaften als auch die operative Handhabbarkeit der Gele funktionell zu testen.

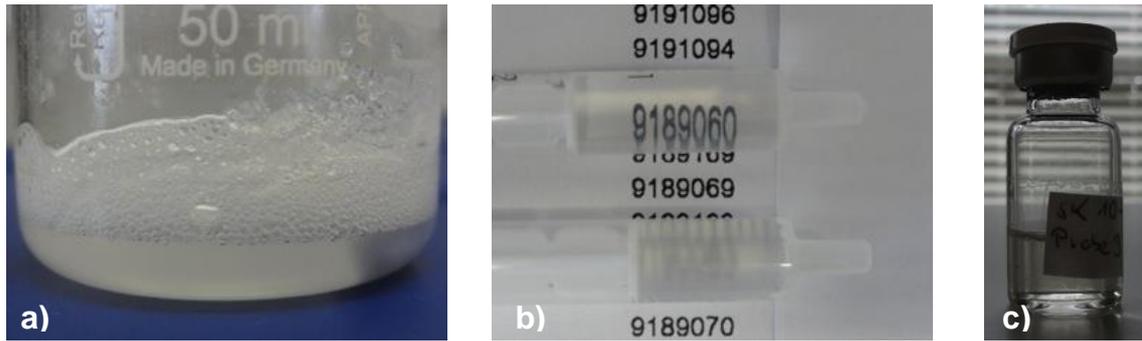
#### 5.1.1 Herstellung des flüssigen Gels

Die zu untersuchenden Substanzen der Gruppen 1-3 wurden uns von den Projektpartnern in Pulverform ausgehändigt. Bei der Herstellung eines Gels (Abbildung 6), wie im Methodenteil beschrieben, konnte ein leichtes Schäumen beobachtet werden (Abbildung 7a). Außerdem war das flüssige Gel leicht milchig, sodass zum Beispiel Zahlen durch eine mit Gel aufgezogene Spritze nicht mehr lesbar waren (Abbildung 7b).

Später hergestellte Gele sind uns bereits in flüssiger und sterilisierter Form bereitgestellt worden. Außerdem wurde im Herstellungsverfahren ein weiterer Aufreinigungsschritt eingeführt. Als Folge waren diese Gele klar und farblos (Abbildung 7c).



**Abbildung 6** Zu testende Substanz  
a) in Pulverform  
b) Herstellung des Gels bei Raumtemperatur mit Magnetrührer durch Auflösen in intraokulärer Spülflüssigkeit

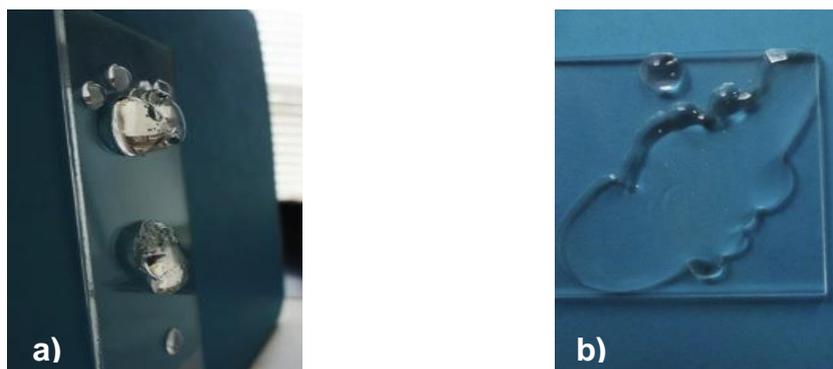


**Abbildung 7** flüssiges Gel

- a) leichtes Schäumen bei der Herstellung des Gels
- b) unten: Gel erscheint leicht milchig; oben: Zum Vergleich  $H_2O$
- c) klares, farbloses Gel nach Einführen eines weiteren Aufreinigungsschrittes

### 5.1.2 Gelierfähigkeit in vitro

Wurde das bei Raumtemperatur flüssige Gel auf eine Wärmeplatte mit  $37^{\circ}C$  gegeben, fand innerhalb von 2 min eine Gelierung des Gels statt. Nach Entfernung des Objektträgers mit dem gelierten Gel von der Wärmeplatte und Abkühlen auf Zimmertemperatur war eine Viskositätsänderung hin zum flüssigen Zustand zu beobachten (Abbildung 8). Dieser Vorgang von Verflüssigung und Regelierem des Gels war mehrfach reversibel.



**Abbildung 8** Gelierfähigkeit

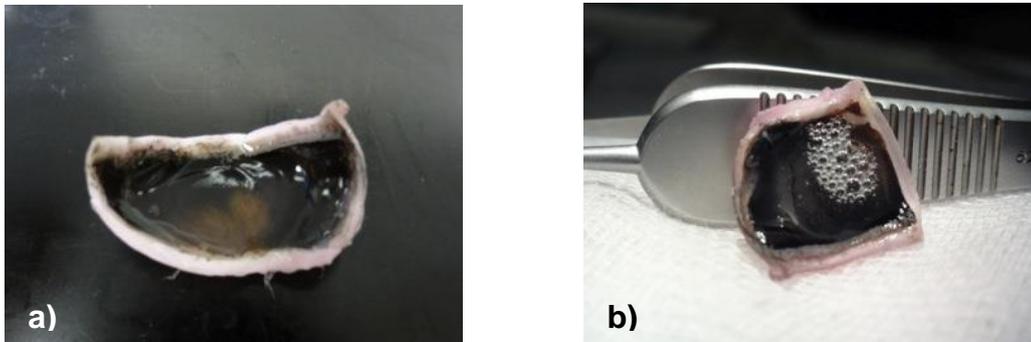
- a) gelierte Geltropfen auf aufrecht gehaltenem Objektträger
- b) Verflüssigung der Geltropfen nach Abkühlen

### 5.1.3 Gelverhalten ex vivo

Für diesen Versuch wurde exemplarisch ein Gel aus Gruppe 4 verwendet, da uns von dieser Substanz eine relativ große Menge zur Verfügung stand.

Nach Injektion des flüssigen Gels auf die Netzhaut eines Eyecups, welches auf der Wärmeplatte mit 37°C platziert wurde, konnte man innerhalb weniger Minuten einen Gelierungsprozess beobachten. Durch Hin- und Her-kippen des Eyecups war die Viskositätszunahme deutlich sichtbar.

Nach ½ h auf der Wärmeplatte war das Gel vollständig geliert und bildete einen gleichmäßigen Film auf der Netzhaut aus. Auch beim Schneiden des Präparates mit einer Rasierklinge war das Gel auf der Retina adhärent (Abbildung 9 b).



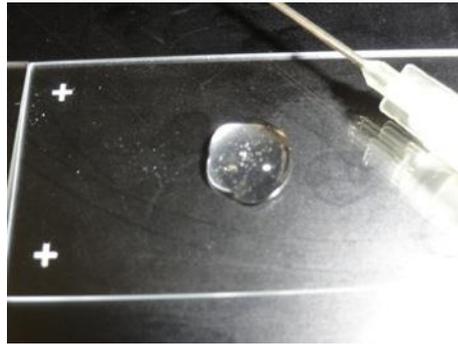
**Abbildung 9**

a) Eyecup mit Gelfilm auf Wärmeplatte

b) Präparat nach Schneiden, Gel immer noch adhärenz an Retina, zur besseren Sichtbarkeit des Gels wurden beim Aufbringen des Gels auf die Netzhaut Luftblasen erzeugt.

### 5.1.4 Injizierbarkeit

Im Versuch ließen sich die flüssigen Gele bei Raumtemperatur problemlos durch 20 G -, 21 G - und 27 G -Kanülen injizieren (Abbildung 10). Auch die Gelierfähigkeit der Gele auf der Wärmeplatte wurde dadurch nicht beeinträchtigt.

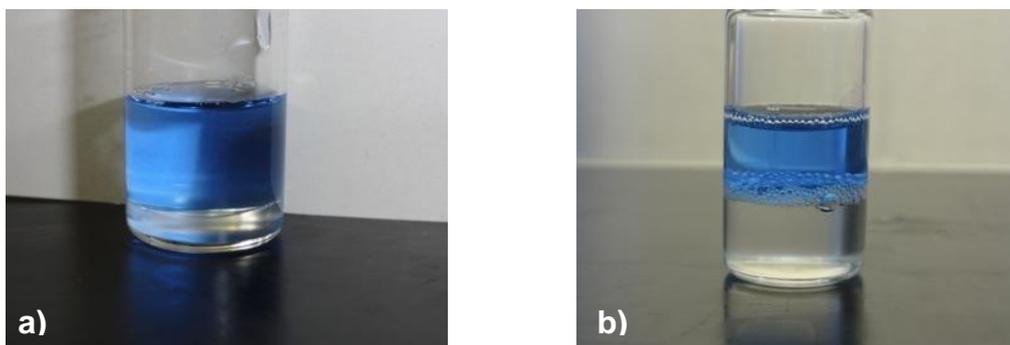


**Abbildung 10** unbeeinträchtigte Gelierbarkeit des Gels nach Injektion durch eine 27 G Kanüle

### 5.1.5 Visualisierbarkeit und Mischbarkeit

Nach Überschichten des Gels auf der Wärmeplatte mit intraokularer Spülflüssigkeit, welche mit Brillant Peel angefärbt wurde, fand zunächst keine Mischung von Gel und wässriger Phase statt (Abbildung 11a). Mit der Zeit nahm das Gelvolumen zu. Nach 3 Tagen war eine deutliche Volumenzunahme der Gele mit HA-mono-Amino-PEPE zu sehen, das Gel hatte sich verflüssigt und seine Gelierfähigkeit verloren. Chemisch weiterentwickelte Gele mit einer zusätzlichen Aminierung des PEPE-Moleküls zu HA-di-Amino-PEPE wiesen eine höhere Stabilität gegenüber Verdünnung auf.

Bei keinem der Gele war eine Blaufärbung sichtbar, der Brillant Peel-Farbstoff wurde nicht von den Gelen aufgenommen.



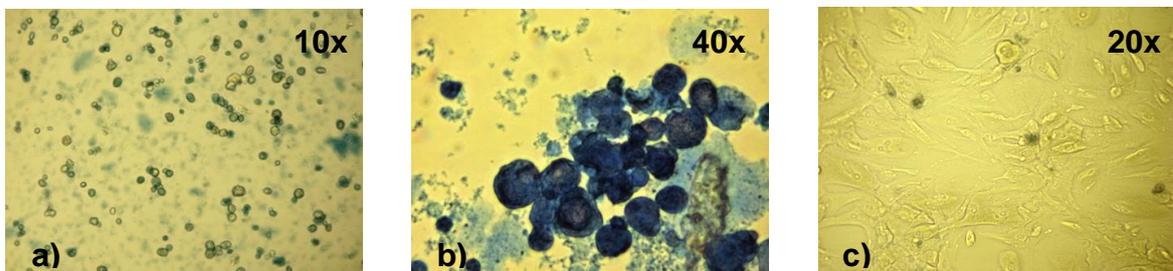
**Abbildung 11**

- a) Gel auf Wärmeplatte mit Brillant Blue gefärbter Intraokularflüssigkeit überschichtet
- b) Volumenzunahme des Gels nach 3 Tagen ohne Farbstoffaufnahme

## 5.2 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests

### 5.2.1 Gele aus Gruppe 2

Erste direct contact Versuche zeigten eine starke Zytotoxizität der untersuchten Substanzen. Tests mit Gelen aus Gruppe 2 fanden mit RPE-Zellen statt und sind nach einem Tag ausgewertet worden. Obwohl sie eigentlich zu den Vorversuchen gehören, sollen die Beobachtungen hier erwähnt werden. Da die Gele nicht steril waren, konnte in allen wells bakterielle Kontamination nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kontrolle fand kein Zellwachstum statt und alle Zellen unterlagen starkem Zelltod (Abbildung 12 a+b).



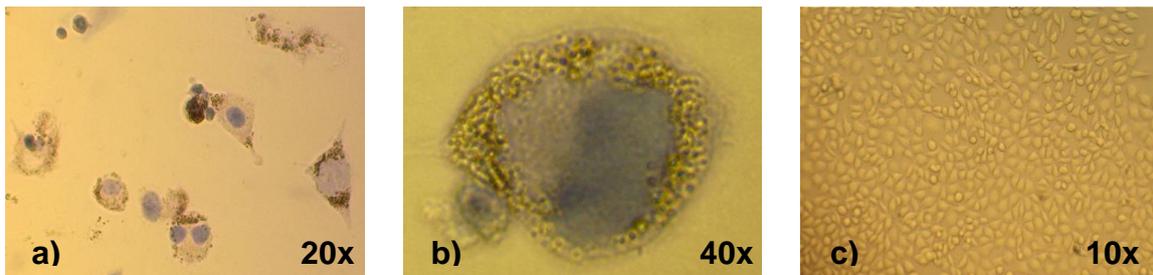
#### Abbildung 12

- a)+b) RPE-Zellen mit Gel aus Gruppe 2 nach Trypanblau-Färbung, alle Zellen abgestorben, pyknotisch  
c) Kontrolle: konfluente Zellrasen

### 5.2.2 Gele aus Gruppe 3

Die Gelproben aus Gruppe 3 waren anfangs weiß und geleeartig. Aufgrund der Erfahrung des letzten Versuchs mit bakterieller Kontamination bei Verwendung unsteriler Proben, haben wir diese Proben durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Danach lagen die Proben gelblich und zäh vor. Der direct contact Test zeigte eine leichte Veränderung der Gelbeschaffenheit. Das Gel ist etwas gequollen und mischte sich mit dem Kulturmedium. Zum Beurteilungszeitpunkt war das Gel am Boden des wells nachweisbar und hat sich nicht von seiner Unterlage abgehoben. Des Weiteren konnte keine

zusätzliche Trübung des Gels beobachtet werden. Zellwachstum fand in geringem Maße statt (< 50% der Fläche des wells sind mit Zellen bedeckt), jedoch sind alle Zellen abgestorben (Abbildung 13a). Auf der Geloberfläche waren Zellen nachweisbar. Das Gel selbst blieb zellfrei, es fand kein dreidimensionales Einwachsen von Zellen in das Gel statt.



### Abbildung 13

- a) Mausfibroblasten L929 auf Gel aus Gruppe 3; tote Zellen mit Vakuolen und Granula
- b) Zelle mit Vakuolen; 40-fache Vergrößerung
- c) Kontrolle, dichter Zellrasen

Auffallend war der Nachweis von Vakuolen mit granulösem Material im Zytoplasma der abgestorbenen Zellen, die die Zellen als Schaumzellen imponieren ließen und auf Phagozytose hinwiesen (Abbildung 13b).

### 5.2.3 Gele aus Gruppe 4

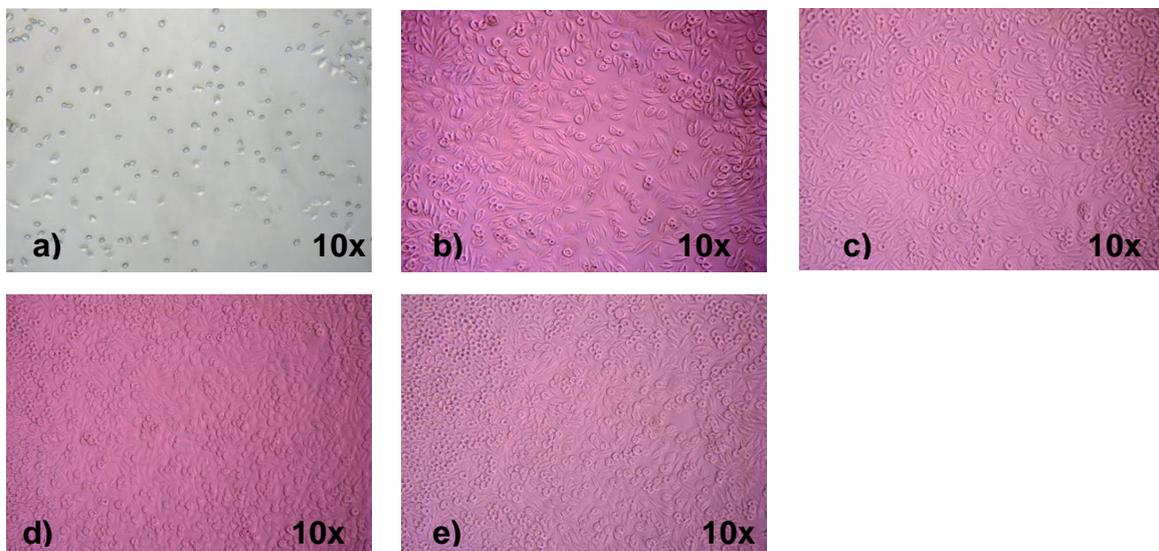
Die Ergebnisse der ersten Zytotoxizitätstests, die starken Zelltod, Schaumzellen und bakterielle Kontamination zeigten, führten konsequenterweise zu einer Änderung des Herstellungsverfahrens der Gele. Es wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt eingeführt, durch den Reste von bei der Synthese beteiligten Agenzien entfernt werden konnten. Des Weiteren wurden die Gele vom Projektpartner bei 121°C für 20 min dampfsterilisiert. Die Gelproben aus Gruppe 4 waren bei Zimmertemperatur flüssig und klar.

Im direct contact Test behielt das Gel seine Transparenz bei und mischte sich während des Beobachtungszeitraums von 4 Tagen mit dem Medium, sodass es

nicht am Boden des wells liegen blieb, sondern im Medium schwamm. Es konnte ein geringes Zellwachstum beobachtet werden, d.h. < 50 % der Fläche des wells waren mit Zellen bedeckt, jedoch waren alle Zellen abgestorben. Nach einem Tag waren Zellen auf dem Gel adhären. Nach 4 Tagen lagen die Zellen unter dem schwimmenden Gel gleichmäßig auf dem Boden der wells lokalisiert vor. Es fand kein Einwachsen von Zellen in das Gel statt.

Die Ergebnisse der tests with liquid extracts from the test material zeigten in den wells, in denen pures Gel, 30%ige Gelverdünnung oder 10%ige Gelverdünnung angesetzt wurde, eine growth inhibition über 30 %, somit waren diese Ansätze als zytotoxisch zu werten. Der Ansatz „Gel mit Medium überschichtet“ wurde mit dieser Gelgruppe nicht durchgeführt.

In den wells mit 30%iger bzw. 10%iger, 3%iger und 1%iger Verdünnung des Gels konnte beobachtet werden, wie mit abnehmender Gelkonzentration die G.I. sank. In 3%iger und 1%iger Verdünnung war das Gel nicht mehr zytotoxisch.



**Abbildung 14** test with liquid extracts from the test material zeigten eine mit abnehmender Gelkonzentration steigende Zellzahl: a) Gel pur; b) 30 % Gel; c) 10 % Gel; d) 3 % Gel; e) 1 % Gel

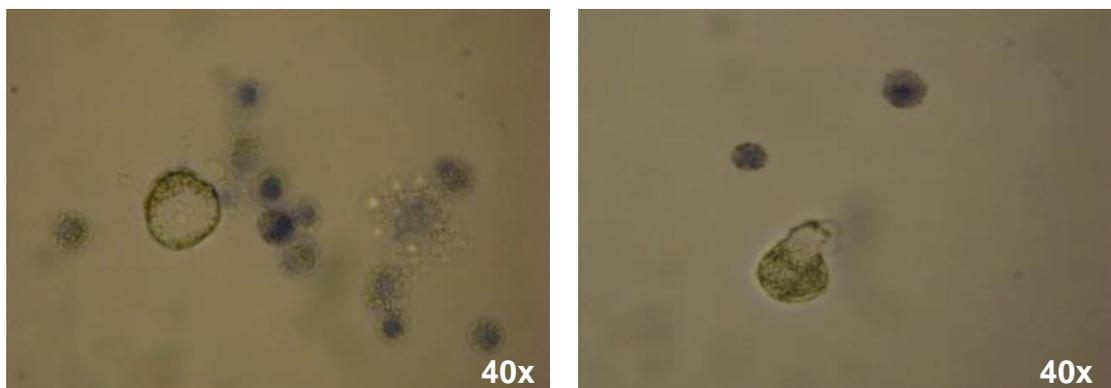
### 5.2.4 Gele aus Gruppe 5

Im direct contact Test behielten diese Gelproben ihre Transparenz bei. Das Gel mischte sich jeweils mit dem Medium, löste sich vom Boden der wells ab und schwamm im Medium. Proliferationsgeschwindigkeit und Zellwachstum waren als gering einzustufen (< 50% der Fläche des wells sind mit Zellen bedeckt) und es war ein geringer Zelltod zu beobachten (< 50% der Zellen sind abgestorben). Die Zellen lagen am Boden der wells verteilt und sind nicht in das Gel eingewachsen.

Die G.I. der Ansätze „Gel pur“, „Gel mit Medium überschichtet“ und „30 % Gel“ lag über der 30 % Marke, somit waren diese Ansätze zytotoxisch. Ab einer Gelverdünnung von 10 % lag keine Zytotoxizität mehr vor.

### 5.2.5 Gele aus Gruppe 6

Auch die Gelproben dieser Gruppe blieben im direct contact Test klar und mischten sich mit Medium. Sie sind nicht am Boden der wells liegen geblieben. Die Zellen waren gleichmäßig auf dem Boden der wells verteilt und wuchsen nicht in die Gelstruktur ein. Bei Beobachtung der Zellen konnte kein Wachstum aber starker Zelltod (> 50% der Zellen sind abgestorben) festgestellt werden. Im lichtmikroskopischen Bild bei 20- bis 40-facher Vergrößerung imponierten Zellen mit multiplen Zelleinschlüssen (Abbildung 15). Außerdem waren Zellmembrandefekte sichtbar, durch welche Zytoplasma auszutreten schien.



**Abbildung 15**

Mausfibroblasten L929 mit Gel aus Gruppe 6; direct contact Test

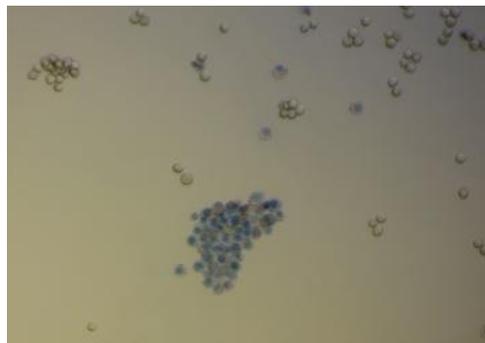
a) Zellen mit Vakuolen

b) Zytoplasma scheint durch defekte Zellmembran auszutreten

Die tests with liquid extracts from the test material zeigten folgende Ergebnisse: Die durchschnittliche G.I. der Ansätze „Gel pur“, „Gel mit Medium überschichtet“ und der 30%igen Gelverdünnung lag über 30 %, diese Ansätze waren also zytotoxisch. Ab einer 10%igen Verdünnung des Gels wirkte das Gel nicht mehr zytotoxisch.

### 5.2.6 Gele aus Gruppe 7

Die von Anfang an gelblich verfärbten Gele, die im Gegensatz zu den bisher untersuchten Substanzen aus aufpolymerisiertem Chondroitinsulfat bestanden, zeigten im direct contact Test keine zusätzliche Trübung. Sie mischten sich mit Medium und hoben sich vom Boden der wells ab. Zellen waren ausschließlich auf dem Boden der wells und nur außerhalb des Gels zu finden. Es konnte kein Zellwachstum verzeichnet werden aber starker Zelltod (> 50% der Zellen sind abgestorben). Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, waren die Zellen abgekugelt und pyknotisch. Sie sind geschrumpft, sodass die Zellkerne im Vergleich zum Zelldurchmesser vergrößert erscheinen.

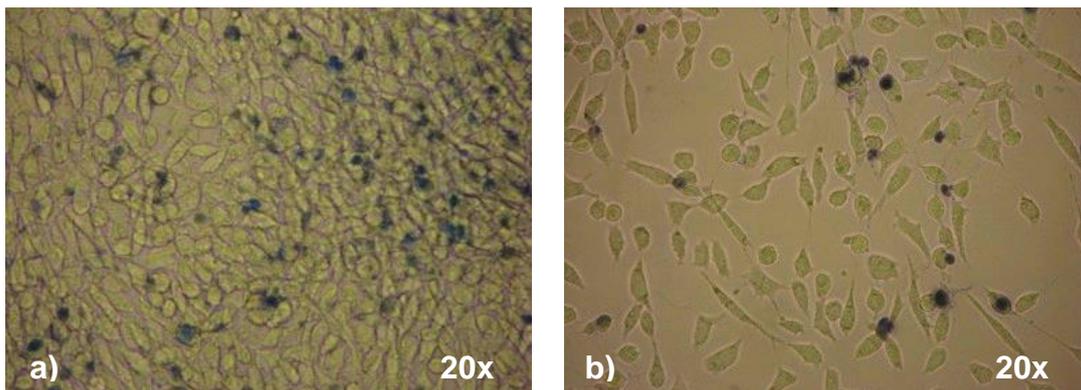


**Abbildung 16** Mausfibroblasten L929 mit Gel aus Gruppe 7 nach Trypanblau-Färbung; abgekugelte, tote Zellen

Die tests with liquid extracts from the test material ergaben: In purer Form, mit Medium überschichtet, sowie als 30%ige Verdünnung sind die Gele zytotoxisch. In stärker verdünnter Form (10 %, 3 %, 1 %) wiesen die Gele keine Zytotoxizität mehr auf.

### 5.2.7 Gele aus Gruppe 8

Diese Gele, welche aus kommerziell erhältlichem Poloxamer bestanden und nicht an Hyaluronsäure gekoppelt waren, zeigten eine relativ geringe Zytotoxizität. Die Substanz verhielt sich im direct contact Test gleich wie bei bisherigen Versuchen getestete Substanzen. Sie mischte sich mit Medium, blieb klar und hob sich vom Boden des wells ab. Zellen befanden sich nur am Boden der wells und sind nicht in das Gel eingewachsen. Das Zellwachstum konnte als mäßig eingestuft werden ( $> 50\%$  der Fläche eines wells ist mit Zellen bedeckt). Am Rand der wells konnte dabei eine höhere Zelldichte beobachtet werden als im Zentrum. Die Zellen bildeten die für vitale Fibroblasten typischen zytoplasmatischen Fortsätze aus und konfluieren im Randbereich der wells. Insgesamt fanden sich wenig tote Zellen,  $< 50\%$  der Zellen sind abgestorben.



**Abbildung 17** Mausfibroblasten L929 mit Gel aus Gruppe 8.; direct contact Test; nach Trypanblau-Färbung; insgesamt viele vitale, wenig tote Zellen  
a) hohe Zelldichte am Rand des wells;  
b) geringere Zelldichte im Zentrum des wells

Die tests with liquid extracts from the test material zeigten folgende Ergebnisse: Das pure Gel war zytotoxisch, ebenso der Ansatz, in dem Gel mit Medium überschichtet wurde. Hingegen lag in keiner der Verdünnungen (30 %, 10 %, 3 %, 1 %) Zytotoxizität des getesteten Gels mehr vor.

### 5.2.8 Gele aus Gruppe 9

Gele dieser Gruppe waren von Anfang an leicht gelblich verfärbt, erfuhren aber bei den Versuchen keine zusätzliche Trübung. Im direct contact Test mischte

sich das Gel mit Medium und hob sich vom Boden des wells ab. Es konnte kein Zellwachstum verzeichnet werden und die vorhandenen Zellen, die auf dem Boden der wells und ausschließlich außerhalb des Gels zu sehen waren, unterlagen starkem Zelltod (> 50 % der Zellen sind abgestorben).

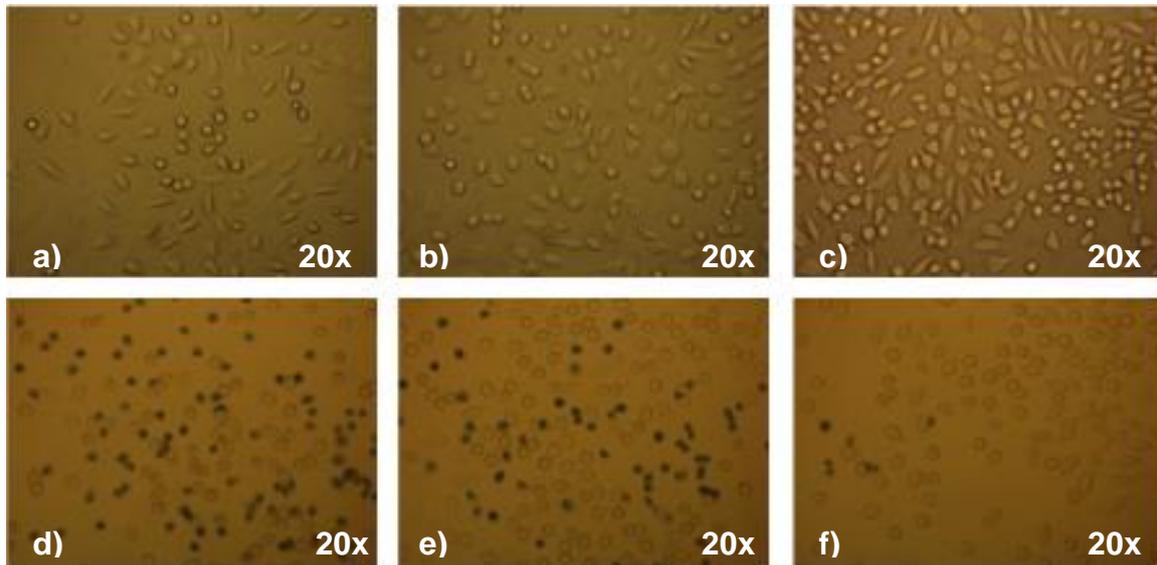
Pur, mit Medium überschichtet und in 30%iger Verdünnung lag die G.I. über 30 %. Somit wirkten auch diese Gele in unverdünnter bzw. leicht verdünnter Form zytotoxisch. Ab 10%iger Verdünnung war keine Zytotoxizität mehr gegeben.

Mit einer Variante des direct contact Tests haben wir eine Probe dieser Gruppe kurzzeitig darauf untersucht, welchen Einfluss der pH-Wert auf Mausfibroblasten der Linie L929 hat. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass das Zellkulturedium saure pH-Werte in gewisser Weise abpuffern vermochte. So konnten in den wells mit Zellen und Medium, welches auf pH 6,5 titriert wurde, nach 1 h pH-Werte von 7,5 gemessen werden. Außerdem sind die Zellen im Vergleich zur Kontrolle gleich gut gewachsen. Daraufhin wurde in diese wells jeweils 50 µl 0,5 molare Salzsäure gegeben, es resultierte ein pH-Wert von 6,7 mit einem Farbumschlag des im Medium enthaltenen Indikators nach gelb. Im Lichtmikroskop wurde auf die pH-Änderung hin eine deutliche Zellreaktion sichtbar, die Zellen kugelten sich ab. Nach einer halben Stunde war der saure pH-Wert wieder ausgeglichen, der im Medium enthaltene Indikator schlug zu rot um.

In den wells, in denen ein Gel aus Gruppe 9 mit unterschiedlich eingestelltem pH-Wert enthalten war, konnte nach 1h geringes (< 50 % der Fläche eines wells ist mit Zellen bedeckt) bis mäßiges (> 50 % der Fläche eines wells ist mit Zellen bedeckt) Zellwachstum beobachtet werden. Die Zellen waren überwiegend am Boden der wells adhärent und begannen die für Fibroblasten typischen Zytoplasmaausläufer zu bilden (Abbildung 18 a-c).

Nach 24 h wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Es zeigte sich starker (> 50 % der Zellen sind abgestorben) bis geringer Zelltod (< 50 % der Zellen sind abgestorben), wobei die meisten vitalen Zellen in dem well zu finden waren,

dessen Ansatz anfangs auf pH 7,4 titriert und 1:1 mit Medium verdünnt worden war.



**Abbildung 18** modifizierter direct contact test mit Gel aus Gruppe 9

- a) Gel pur nach 1 h, anfangs pH 6,8
- b) Gel nach 1 h, anfangs titriert auf pH 7,4
- c) Gel nach 1 h, anfangs titriert auf pH 7,4 und 1:1 verdünnt mit Medium
- d) Gel nach 24 h, anfangs pH 6,8, nach Trypanblau-Färbung
- e) Gel nach 24 h, anfangs titriert auf pH 7,4, nach Trypanblau-Färbung
- f) Gel nach 24 h, anfangs titriert auf pH 7,4 1:1 verdünnt mit Medium nach Trypanblau-Färbung

### 5.2.9 Gele aus Gruppe 10

Diese Gele beinhalteten, anders als bisher getestete Gele, Reinstwasser als Lösungsmittel.

Die Gele mischten sich im direct contact Test mit Medium, blieben klar und lösten sich vom Boden der wells ab. Es hat geringes Zellwachstum stattgefunden (< 50 % der Fläche eines wells ist mit Zellen bedeckt). > 50 % der Zellen sind abgestorben. Die Zellen waren ausschließlich außerhalb des Gels auf dem Boden der wells lokalisiert.

Ergebnisse des tests with liquid extracts from the test material mussten aus der Gesamtwertung entfernt werden, da die photometrische Messung mit einem anderen Filter erfolgte.

#### **5.2.10 Gele aus Gruppe 11**

Die Substanz blieb klar, mischte sich mit Medium und hob sich vom Boden der wells ab.

Es konnte geringes Zellwachstum (<50% der Fläche eines wells ist mit Zellen bedeckt) sowie

starker Zelltod (>50% der Zellen sind abgestorben) beobachtet werden. Zellen waren ausschließlich außerhalb des Gels auf dem Boden der wells lokalisiert.

In purer Form, mit Medium überschichtet und in 30%iger Verdünnung lag die G.I. dieses Gels über 30%, wirkte folglich in unverdünnter bzw. leicht verdünnter Form zytotoxisch. Ab 10%iger Verdünnung war keine Zytotoxizität mehr gegeben.

#### **5.2.11 Gele aus Gruppe 12**

Aufgrund der geringen Menge gelieferten Materials, konnten wir diese Substanzen nicht allen Tests unterziehen. Deshalb haben wir diese Gele nur mit dem test with liquid extracts from the test material auf ihre Zytotoxizität getestet. Die photometrische Testung wurde fälschlicherweise mit einer anderen Filtereinstellung vorgenommen. Deshalb wurden die gemessenen Werte dieses Versuches aus dem Gesamtvergleich ausgeschlossen. Betrachtet man jedoch das Verteilungsmuster der GI auf die verschiedenen Verdünnungen, passt dieses zum allgemeinen Trend. Auch hier lag bei 3%iger und 1%iger Gelverdünnung keine Zytotoxizität mehr vor.

### 5.2.12 Gele aus Gruppe 13

Auch diese Charge umfasste nur ein kleines Volumen an Testsubstanz, weshalb auf den direct contact Test verzichtet wurde und dieses Gel ebenfalls nur mit dem test with liquid extracts from the test material untersucht wurde. Die photometrische Messung wurde hier ebenfalls fälschlicherweise mit einer anderen Filtereinstellung vorgenommen. Deshalb wurden die gemessenen Werte dieses Versuches auch aus der Gesamtwertung ausgeschlossen. Hier gilt Gleiches wie für Gel Gruppe 12: das Verteilungsmuster der GI auf die verschiedenen Verdünnungen passt zum allgemeinen Trend. Auch hier lag bei 3%iger und 1%iger Gelverdünnung keine Zytotoxizität mehr vor.

### 5.2.13 Gele aus Gruppe 14

Bei den Proben dieser Gruppe sind wir auf einen relativ im sauren Bereich liegenden pH-Wert von 6,6 aufmerksam geworden, was uns dazu veranlasste, die Gele im direct contact test engmaschiger zu beobachten. 1,5h nach Versuchsbeginn bildeten die Gele eine Schicht auf dem Boden der wells und Zellen waren auf der Geloberfläche adhärent. Auf den Glasplättchen, welche als herausnehmbare Unterlage jeweils im Zentrum eines wells lagen, waren kleine Luftbläschen sichtbar, um die Glasplättchen herum hingegen nicht. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Zellen in den wells mit Gel noch den gleichen Durchmesser wie die Zellen der Kontrolle.

Nach 2,5h wurden Zelleinschlüsse sichtbar. Die Zelldurchmesser der Zellen, welche in Kontakt mit Gel gebracht worden waren, überstiegen die der Kontrolle. Das Gel löste sich langsam auf und bildete fadige Strukturen aus, welche im Medium trieben. Nach 4h begannen die Zellen abzusterben. Es konnten deutliche Apoptosefiguren beobachtet werden, bei denen die Zellmembran nicht mehr intakt war und Zytoplasma blasenartig auszutreten schien (Abbildung 19). Nach 24h waren überwiegend abgekugelte, apoptotische Zellen zu sehen und bei der letzten Beurteilung nach insgesamt 72h wurde starker Zelltod (>50% der Zellen sind abgestorben) und kein Zellwachstum festgestellt. Das Gel, welches zunächst am Boden der wells eine Schicht bildete, hob sich später ab, bildete

fadige Strukturen aus und trieb im Medium. Zunächst auf der Geloberfläche adhärenente Zellen sind zwischenzeitlich abgesunken und befanden sich zuletzt am Boden der wells.



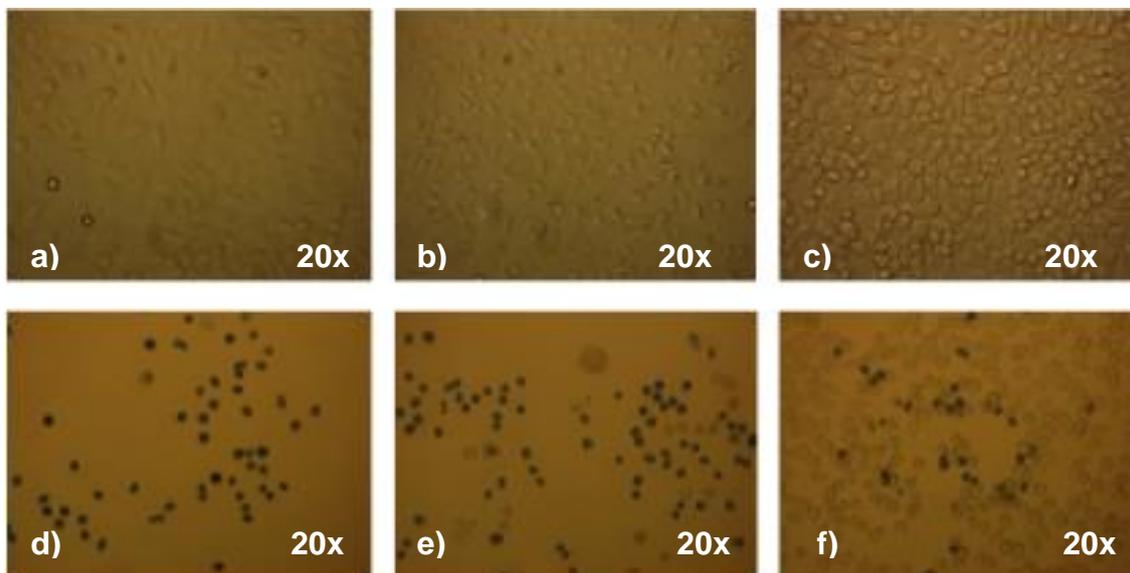
**Abbildung 19** Apoptosefigur; Mausfibroblast L929 im direct contact test mit Gel aus Gruppe 14

Vor Beginn der tests with liquid extracts from the test material wurden die pH-Werte der einzelnen Gelverdünnungen bestimmt. Diese Messungen zeigten, dass das pure Gel zwar einen unphysiologisch sauren pH-Wert von 6,5-6,8 hatte, dass die pH-Werte der Gelverdünnungen mit Medium jedoch wieder im physiologischen Bereich lagen:

| <u>Ansatz</u>             | <u>pH-Wert</u> | <u>Mittelwert G.I. in %</u> |
|---------------------------|----------------|-----------------------------|
| Kontrolle                 |                | 0                           |
| Gel pur                   | 6,5-6,8        | 83,5                        |
| Gel+Medium                | -              | 76,7                        |
| 30-prozentige Verdünnung  | 7,9-8,1        | 70,6                        |
| 10- prozentige Verdünnung | 7,4            | 15,6                        |
| 3-prozentige Verdünnung   | 7,4-7,7        | -1                          |
| 1-prozentige Verdünnung   | 7,4-7,5        | -4,5                        |

Aus oben stehender Auflistung geht hervor, dass pures Gel, mit Medium überschichtetes Gel und eine 30%ige Verdünnung des Gels zytotoxisch waren, stärkere Verdünnungen des Gels jedoch keine Zytotoxizität mehr zeigten.

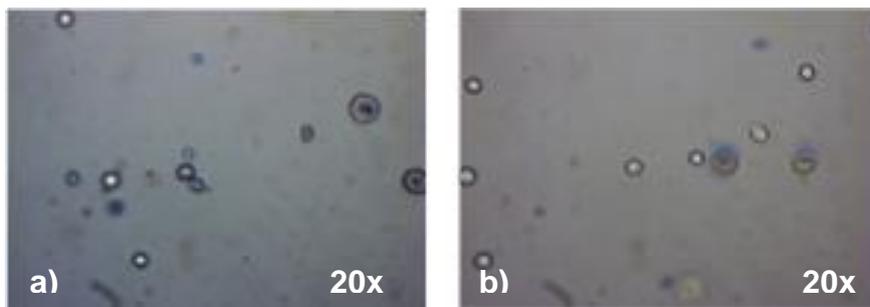
Eine Probe dieser Charge war außerdem Bestandteil des modifizierten direct contact tests (Methode siehe 3.3.2), mit dem der Einfluss des pH-Werts auf die Zytotoxizität untersucht wurde. Hier konnte bezüglich Zellwachstum und Zelltod ein ähnliches Verteilungsmuster beobachtet werden wie oben beschrieben (siehe 5.2.8). In den wells, in denen die Testsubstanz anfangs auf pH 7,4 titriert und 1:1 mit Medium verdünnt worden war, fanden das beste Zellwachstum und der geringste Zelltod statt. In den wells mit untitriertem Gel, welches anfangs einen pH-Wert von 6,6 hatte, waren trotz deutlicher Abpufferung des sauren pH-Werts innerhalb von 24h auf einen pH-Wert von 7,25 ein geringeres Zellwachstum sowie stärkerer Zelltod zu sehen (Abbildung 20).



**Abbildung 20** modifizierter direct contact test mit Gel aus Gruppe 14  
a) Gel pur nach 1h, anfangs pH 6,8; geringes Zellwachstum  
b) Gel nach 1h, anfangs titriert auf pH 7,4; geringes Zellwachstum  
c) Gel nach 1h, anfangs titriert auf pH 7,4 und 1:1 verdünnt mit Medium  
mäßiges Zellwachstum  
d) Gel nach 24h, anfangs pH 6,8, nach Trypanblau-Färbung; starker Zelltod  
e) Gel nach 24h, anfangs titriert auf pH 7,4, nach Trypanblau-Färbung;  
starker Zelltod  
f) Gel nach 24h, anfangs titriert auf pH 7,4 1:1 verdünnt mit Medium nach  
Trypanblau-Färbung; geringer Zelltod

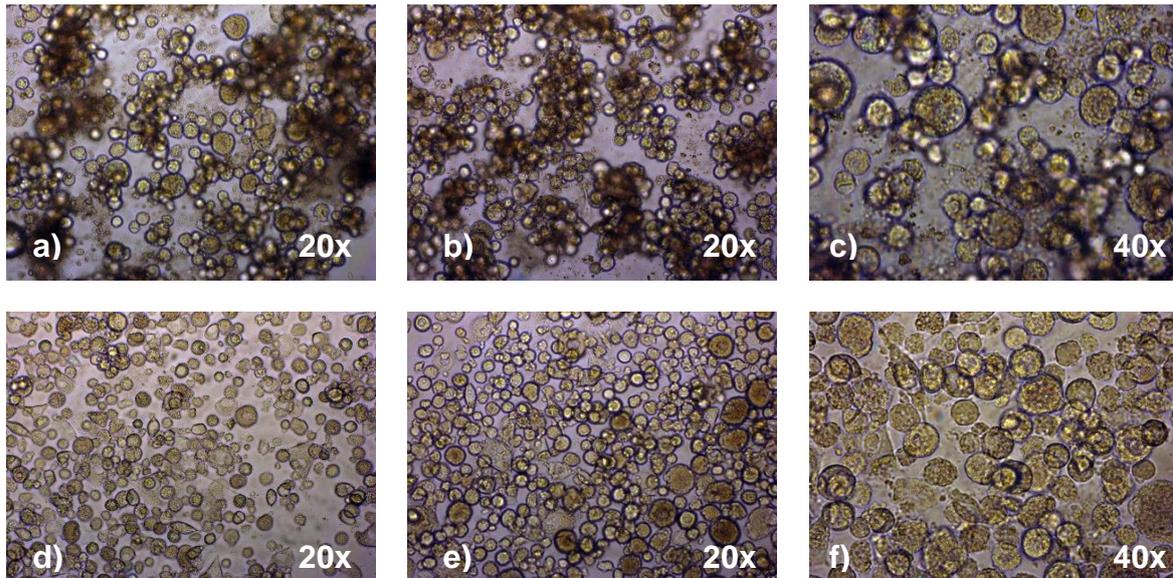
### 5.2.14 Gele aus Gruppe 15

Gele dieser Charge waren bei Raumtemperatur optisch klare Flüssigkeiten. Unsere Projektpartner haben nach Herstellung der Gele einen pH-Wert von 7,6 sowie eine Osmolarität von ca 460 mOsmol/l gemessen. Bei Erhalt wiesen diese Gele unverändert einen pH-Wert von 7,6 auf. Handling und Gelierverhalten zeigten sich wie gewünscht. Aufgrund der vielversprechenden Eigenschaften dieser Gele, wie stabilem physiologischem pH-Wert und Osmolalität, wurden diese Gele im direct contact Test besonders engmaschig beobachtet. Zwei Stunden nach Beginn des direct contact tests konnten im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderungen der Zellmorphologie beobachtet werden (Abbildung 21).



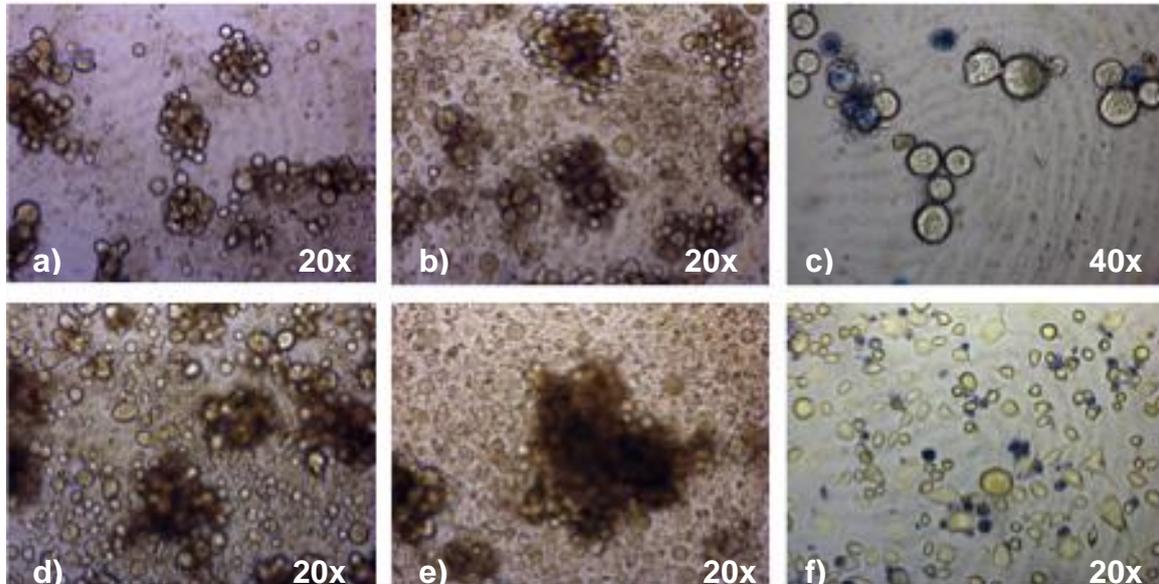
**Abbildung 21** Beobachtungen 2 h nach Beginn des direct contact Tests; nach Trypanblau-Färbung; mikroskopisch keine Veränderung der Zellmorphologie nachweisbar  
a) Gel aus Gruppe 15 mit Mausfibroblasten L929  
b) Kontrolle (nur Medium, kein Gel)

Auch 24h nach Beginn des direct contact Tests zeigten sich keine Veränderungen der Zellmorphologie im Vergleich zur Kontrolle. Des Weiteren konnte eine üppige Zellproliferation beobachtet werden, ohne Unterschied zur Kontrolle (Abbildung 22).



**Abbildung 22** Beobachtungen 24 h nach Beginn des direct contact tests  
a)-c) Gel aus Gruppe 15 mit Mausfibroblasten L929: üppige Zellproliferation schwimmend auf dem Gel  
d)-f) Kontrolle mit Mausfibroblasten L929 ohne Gel: üppige Zellproliferation am Boden des wells

In der Abschlussbeobachtung 4 Tage nach Beginn des direct contact Tests zeigte sich die Zellmorphologie noch immer unverändert. Im Trypanblau-Test sind nur vereinzelt tote Zellen zu sehen, vergleichbar mit der Kontrolle. Insgesamt kann ein starkes Zellwachstum verzeichnet werden, ohne Unterschied zur Kontrolle (Abbildung 23). Die Zellen waren dabei schwimmend auf dem Gel, sowie unter dem Gel am Boden des wells lokalisiert. Ein Einwachsen von Zellen in das Gel konnte nicht beobachtet werden. Das Gel selbst blieb im Versuchsverlauf klar und transparent und mischte sich nach einigen Stunden mit dem Zellkulturmedium.



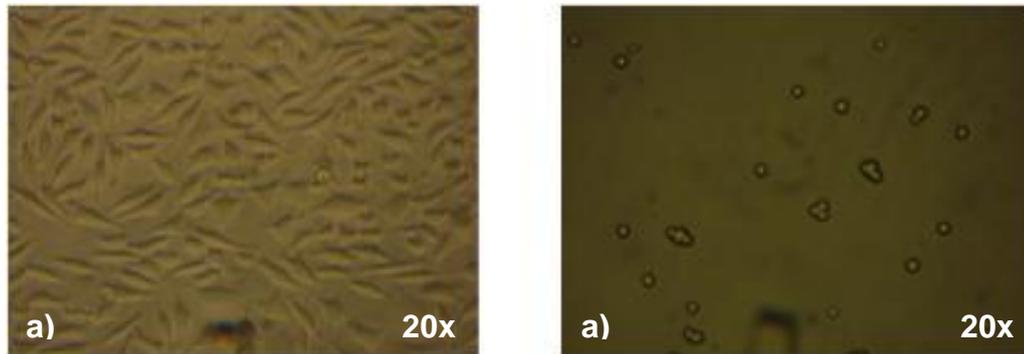
**Abbildung 23:** Beobachtungen 4 Tage nach Beginn des direct contact tests  
 a)-c) Gel aus Gruppe 15 mit Mausfibroblasten L929: üppige Zellproliferation schwimmend auf dem Gel  
 d)-f) Kontrolle mit Mausfibroblasten L929 ohne Gel; üppige Zellproliferation am Boden des wells  
 c)+f) nach Trypanblau-Färbung: vereinzelt abgestorbene Zellen

Technischen Schwierigkeiten zufolge konnte am Auswertungstag des test with liquid extracts from the test material keine korrekte photometrische Auswertung erfolgen, weswegen Ergebnisse dieses Tests an dieser Stelle fehlen.

Aufgrund der geringen Zytotoxizität im direct contact test wurden Gele dieser Charge in erweiterten Biokompatibilitätstests untersucht. Ergebnisse dieser Tests sind Punkt 5.3. zu entnehmen.

### 5.2.15 Gele aus Gruppe 16

Die Proben dieser Gruppe hatten zu Beginn des direct contact Tests einen pH-Wert von 5,1. Nach 4 Tagen hat sich das Gel mit dem Kulturmedium gemischt und behielt seine Transparenz bei. Für den Beobachtungszeitraum von 4 Tagen konnte kein Zellwachstum, sondern starker Zelltod verzeichnet werden. Vorhandene Zellen waren dabei unter dem Gel auf dem Boden der wells und nur außerhalb des Gels lokalisiert. Eine erneute pH-Bestimmung 4 Tage nach Versuchsbeginn ergab pH-Werte von 8,1.



**Abbildung 24** Beobachtungen 4 Tage nach Beginn des direct contact Tests  
a) Kontrolle (nur Medium, kein Gel); üppiges Zellwachstum  
b) Gel aus Gruppe 16 mit Mausfibroblasten L929; kein Zellwachstum

Tests with liquid extracts from the test material zeigten Zytotoxizität der Ansätze „pures Gel“, „Gel mit Medium überschichtet“ und der 30%igen Gelverdünnung. In 10%iger, 3%iger und 1%iger Verdünnung waren die Gele nicht mehr zytotoxisch.

### 5.2.16 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests

#### Direct contact Tests

Beim Ansetzen des Versuchs blieben alle **Substanzen** zunächst am Boden der wells und behielten ihre Struktur bei. Nach wenigen Stunden quollen die Gele und mischten sich mit Medium. Eine Ausnahme zeigten Gele aus Gruppe 3, sie quollen nur leicht, verflüssigten sich kaum und behielt seine Struktur bei. Allerdings gehörten diese Gele zu den ersten Gelproben, die wir unsteril vom Projektpartner erhalten haben und deshalb selbst 20 min bei 121°C und 1 bar. autoklaviert haben. Da das Gefäß, in dem das Gel autoklaviert wurde, nicht vollständig dicht verschlossen war, konnte beim Sterilisieren Feuchtigkeit entweichen und das Gel lag beim Ansetzen der Versuche fester vor als die anderen Testsubstanzen.

Mit Ausnahme der Gele aus Gruppe 3, aus Gruppe 7, aus Gruppe 9 und aus Gruppe 14 blieben alle Gele über einen Beobachtungszeitraum von 4 Tagen klar ohne sich zu trüben oder Verdichtungen auszubilden. Gele aus Gruppe 2 waren bereits beim Ansetzen der Versuche leicht gelblich verfärbt, bildeten

jedoch während der Versuche keine Trübungen aus, ebenso die Gele aus Gruppe 7 und Gruppe 9. Gele aus Gruppe 14 hingegen haben gelblich fadige Strukturen entwickelt.

Die Beobachtungen der Zelllokalisierung zeigten ein relativ einheitliches Bild. In keinem der Versuche war ein dreidimensionales Einwachsen von Zellen in das Gel zu sehen. Zellen befanden sich ausschließlich außerhalb der Gele. In fast allen Fällen konnten Zellen unter dem Gel auf dem Boden des Wells nachgewiesen werden, was dadurch erklärbar ist, dass sich die Gele mit Medium mischten und nicht am Boden des Wells haften blieben. In manchen Fällen konnten wenige Stunden nach Ansetzen des Versuchs Zellen beobachtet werden, die auf der Geloberfläche adhärent waren. Zum Auswertungszeitpunkt am vierten Tag konnte jedoch keine Adhärenz der Zellen auf der Geloberfläche mehr nachgewiesen werden. Gele der Gruppen 14 und 15 stellten hierbei Ausnahmen dar. Zum Auswertungszeitpunkt 4 Tage nach Beginn des direct contact Tests befanden sich auch Zellen schwimmend auf dem Gel.

Im direct contact Test konnte bei 6 von 13 getesteten Gelgruppen kein Zellwachstum beobachtet werden (Gruppe 2, Gruppe 6, Gruppe 7, Gruppe 9, Gruppe 14), bei 5 getesteten Gelgruppen war ein geringes Zellwachstum nachweisbar (Gruppe 3, Gruppe 4, Gruppe 5, Gruppe 10, Gruppe 11), d.h. < 50 % der Fläche des wells sind mit Zellen bedeckt, bei 1 von 13 getesteten Gelgruppen war ein mäßiges Zellwachstum zu sehen (> 50 % der Fläche des wells sind mit Zellen bedeckt) (bei dieser Substanz handelt es sich um kommerziell erhältliches Poloxamer) und bei 1 Gelgruppe (Gruppe 15) konnte starkes Zellwachstum beobachtet werden.

Bei der Mehrzahl der getesteten Gele war ein starker Zelltod zu beobachten (> 50 % der Zellen sind abgestorben). Bei 3 von 13 getesteten Gelen zeigte sich ein geringer Zelltod (< 50 % der Zellen sind abgestorben). Bei diesen drei Substanzen handelte es sich um die Gele der Gruppen 5, 8 und 15.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse aller direct contact Tests zusammengefasst.

**Tabelle 9** Ergebnisse der direct contact tests

| Gel-<br>gruppe | Substanz (=Gel) |             |                        | Zellwachstum |        |       |       | Zelltod |        |       | Zellokalisation |           |               | Bemerkung  |
|----------------|-----------------|-------------|------------------------|--------------|--------|-------|-------|---------|--------|-------|-----------------|-----------|---------------|--|
|                | bleibt unten*   | bleibt klar | mischt sich mit Medium | kein         | gering | mäßig | stark | kein    | gering | stark | auf Gel         | unter Gel | 3-d ins Gel** |  |
| 1              | -               | -           | -                      | -            | -      | -     | -     | -       | -      | -     | -               | -         | -             | kein direct contact test durchgeführt  |
| 2              | nein            | nein        | ja                     | •            | -      | -     | -     | -       | -      | •     | nein            | nein      | nein          | Vorversuch mit RPE-Zellen; Beurteilung nach 24h                                  |
| 3              | ja              | ja          | ja                     | -            | •      | -     | -     | -       | -      | •     | ja              | ja        | nein          | Gel selbst autoklaviert bei 121°C  |
| 4              | nein            | ja          | ja                     | -            | •      | -     | -     | -       | -      | •     | nein            | ja        | nein          |  |
| 5              | nein            | ja          | ja                     | -            | •      | -     | -     | -       | -      | •     | nein            | ja        | nein          |  |
| 6              | nein            | ja          | ja                     | •            | -      | -     | -     | -       | -      | •     | nein            | ja        | nein          |  |
| 7              | nein            | ja          | ja                     | •            | -      | -     | -     | -       | -      | •     | nein            | ja        | nein          | Leicht gelblich verfärbt   |
| 8              | nein            | ja          | ja                     | -            | -      | •     | -     | -       | •      | -     | nein            | ja        | nein          |  |
| 9              | nein            | ja          | ja                     | •            | -      | -     | -     | -       | -      | •     | nein            | ja        | nein          | Gel von Anfang an leicht gelblich  |
| 10             | nein            | ja          | ja                     | -            | •      | -     | -     | -       | -      | •     | nein            | ja        | nein          |  |
| 11             | nein            | ja          | ja                     | -            | •      | -     | -     | -       | -      | •     | nein            | ja        | nein          |  |
| 12             | -               | -           | -                      | -            | -      | -     | -     | -       | -      | -     | -               | -         | -             | kein direct contact test durchgeführt  |
| 13             | -               | -           | -                      | -            | -      | -     | -     | -       | -      | -     | -               | -         | -             | kein direct contact test durchgeführt  |
| 14             | -               | -           | ja                     | •            | -      | -     | -     | -       | -      | •     | ja              | ja        | -             | Gel bildet gelblich fadige Struktur aus  |
| 15             | nein            | ja          | ja                     | -            | -      | -     | •     | -       | •      | -     | ja              | ja        | nein          | Gele bleiben zunächst alle am Boden des wells, quellen erst nach einigen Stunden |
| 16             | nein            | ja          | ja                     | •            | -      | -     | -     | -       | -      | •     | nein            | ja        | nein          |  |

\* Substanz bleibt unten = Substanz bleibt am Boden des wells

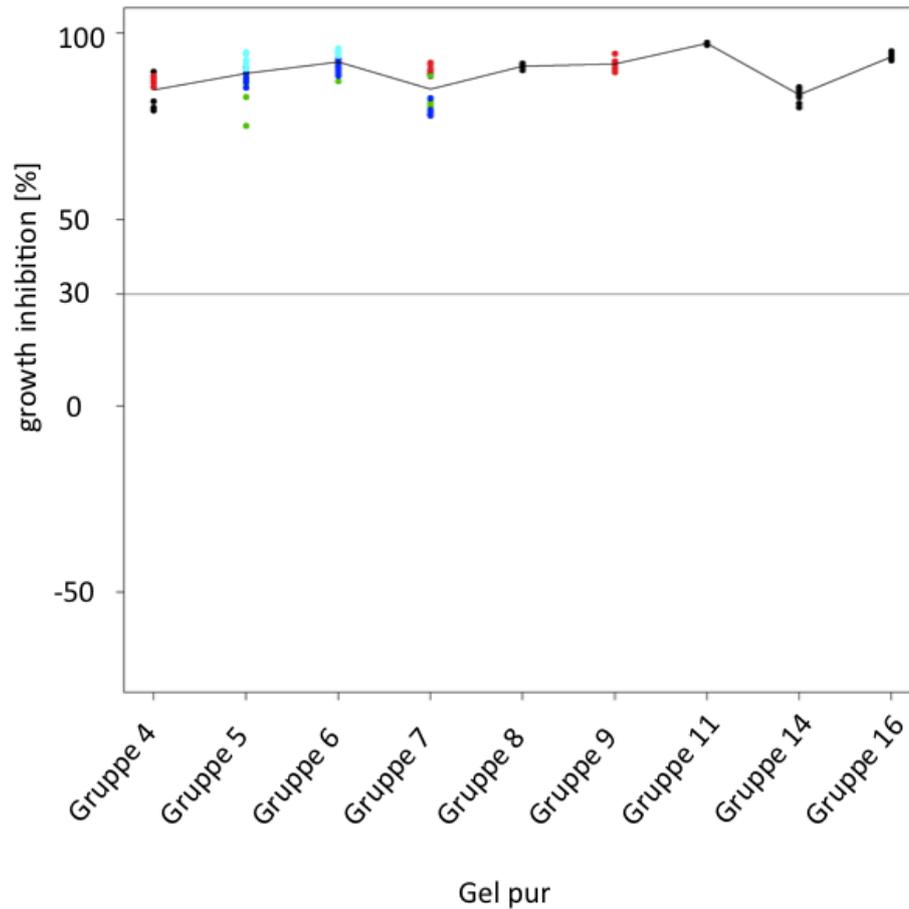
\*\* dreidimensionales Einwachsen von Zellen in das Gel

**Tests with liquid extracts from the test material**

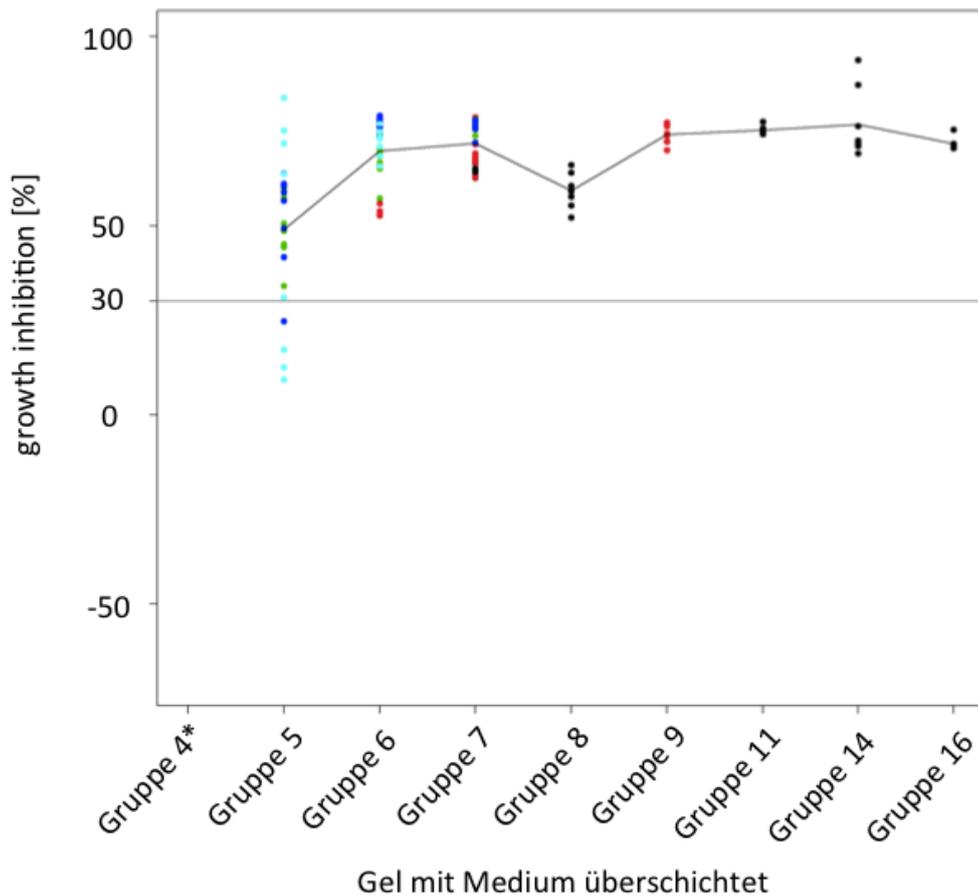
13 der 16 Gelgruppen wurden in Tests with liquid extracts from the test material auf Zytotoxizität getestet. Davon konnten infolge technischer Schwierigkeiten, geringer Probenmenge oder fehlerhafter Messung 4 Gelgruppen nicht in die Gesamtwertung einfließen.

Die Ergebnisse zeigten insgesamt einen klaren Trend. Pures Gel und Gel, welches mit Medium überschichtet wurde, zeigte bei allen Versuchen Zytotoxizität (Abbildungen 25, 26, 27).

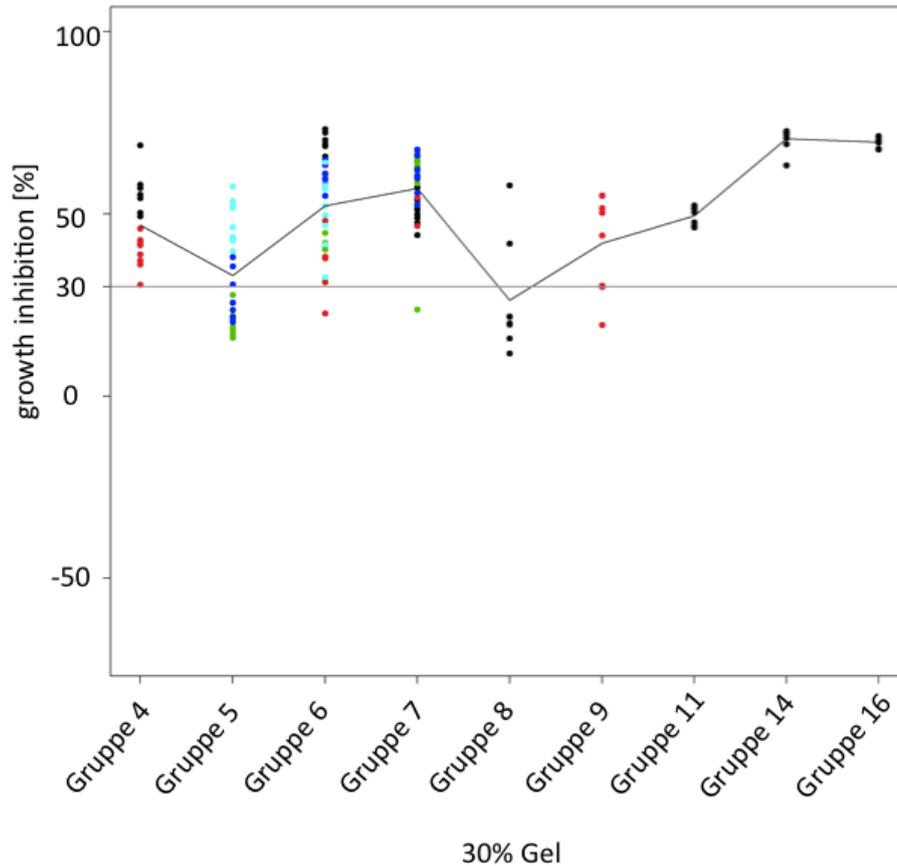
Von allen getesteten Gelen war eines in 30%iger Verdünnung nicht zytotoxisch (Abbildung 27). Hierbei handelt es sich um kommerzielles Poloxamer. Bei stärkeren Verdünnungen der Gele, in denen 10 % Gel, 3 % Gel oder 1 % Gel enthalten waren, lag keine Zytotoxizität mehr vor (Abbildungen 28, 29, 30).



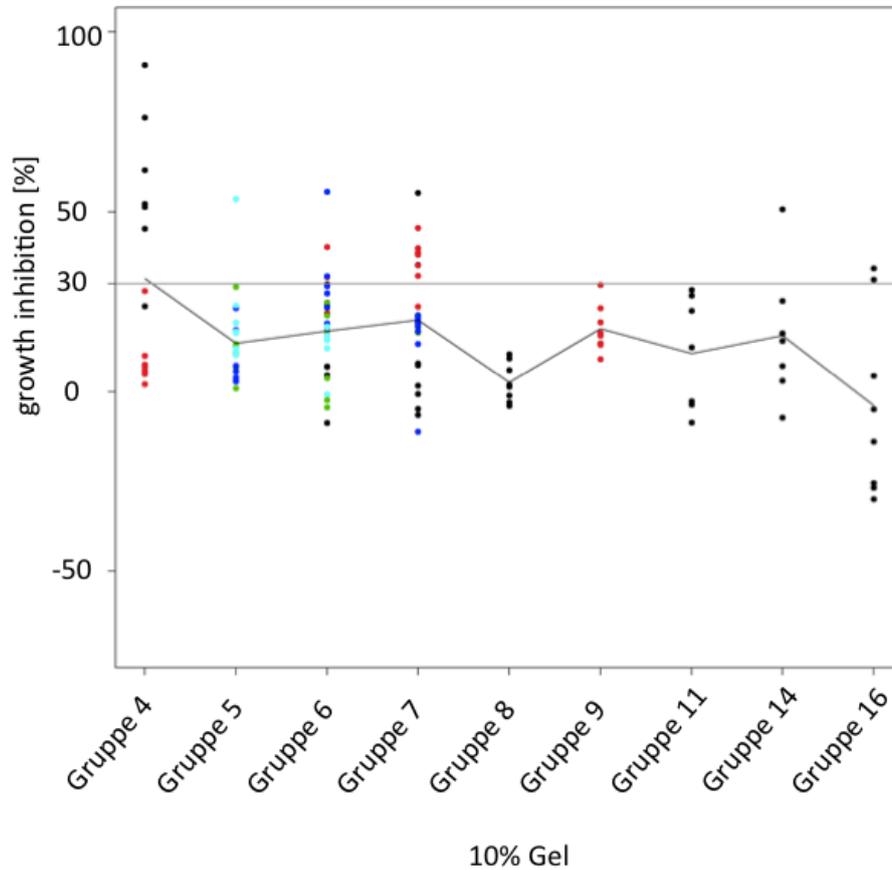
**Abbildung 25** Ansatz: Gel pur; Alle untersuchten Gele sind in purer Form zytotoxisch, da die growth inhibition > 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Mittelwert aus: Gruppe 4 (n=16); Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=34); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8)



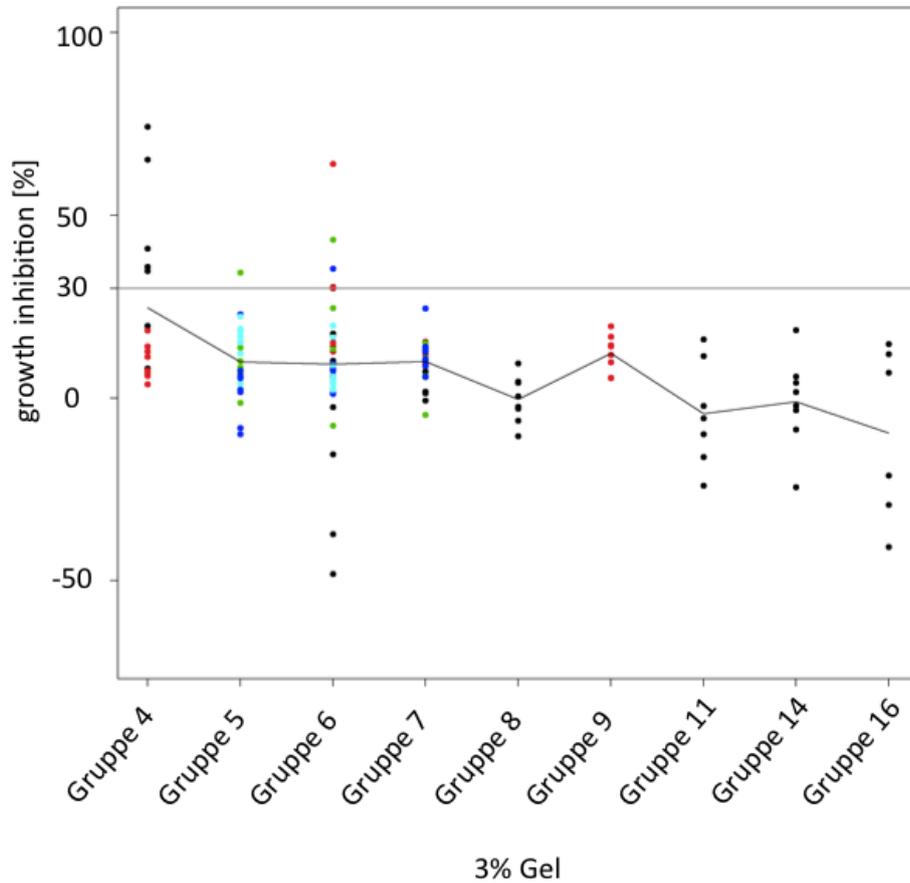
**Abbildung 26** Ansatz: Gel mit Medium überschichtet; Alle untersuchten Gele sind mit Medium überschichtet zytotoxisch, da die growth inhibition > 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Gruppe 4\*: Der Ansatz „Gel mit Medium überschichtet“ wurde mit dieser Gelgruppe nicht durchgeführt ; Mittelwert aus: Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=31); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8)



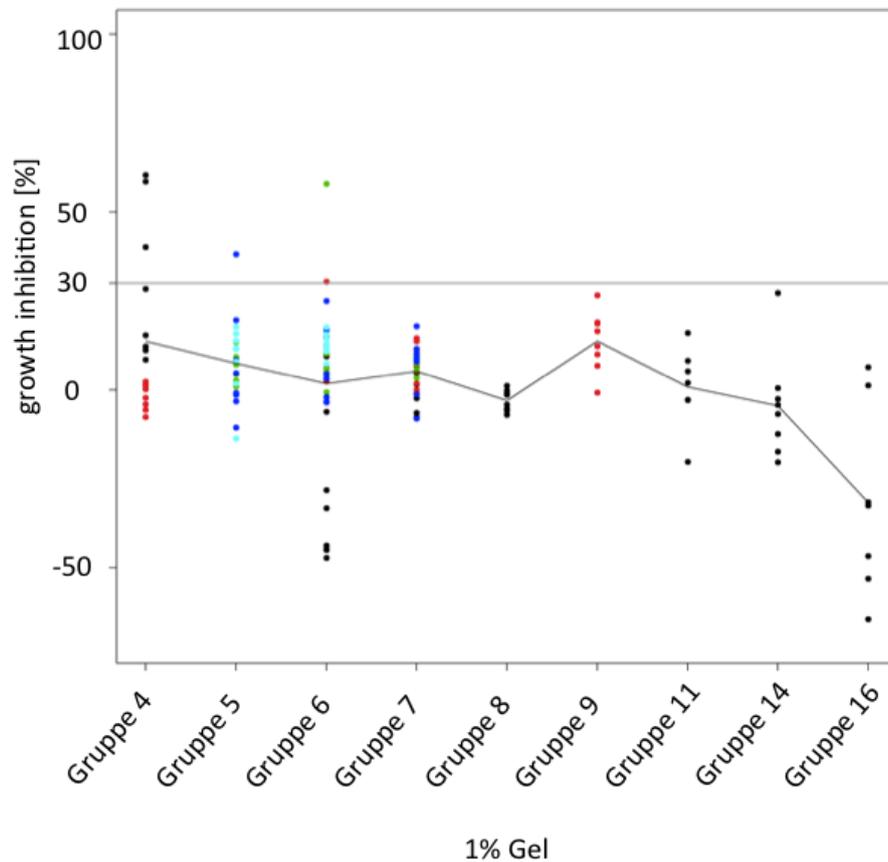
**Abbildung 27** Ansatz: 30% Gel; Alle untersuchten Gele mit Ausnahme von Gruppe 8 sind in 30 %iger Verdünnung zytotoxisch, da die growth inhibition > 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Mittelwert aus: Gruppe 4 (n=16); Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=34); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8)



**Abbildung 28** Ansatz: 10 % Gel; Alle untersuchten Gele mit Ausnahme von Gruppe 4 sind in 10%iger Verdünnung nicht mehr zytotoxisch, da die growth inhibition < 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Mittelwert aus: Gruppe 4 (n=16); Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=34); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8)



**Abbildung 29** Ansatz: 3 % Gel; Alle untersuchten Gele sind in 3%iger Verdünnung nicht mehr zytotoxisch, da die growth inhibition < 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Mittelwert aus: Gruppe 4 (n=16); Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=34); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8)



**Abbildung 30** Ansatz: 1 % Gel; Alle untersuchten Gele sind in 1%iger Verdünnung nicht mehr zytotoxisch, da die growth inhibition < 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Mittelwert aus: Gruppe 4 (n=16); Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=34); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8)

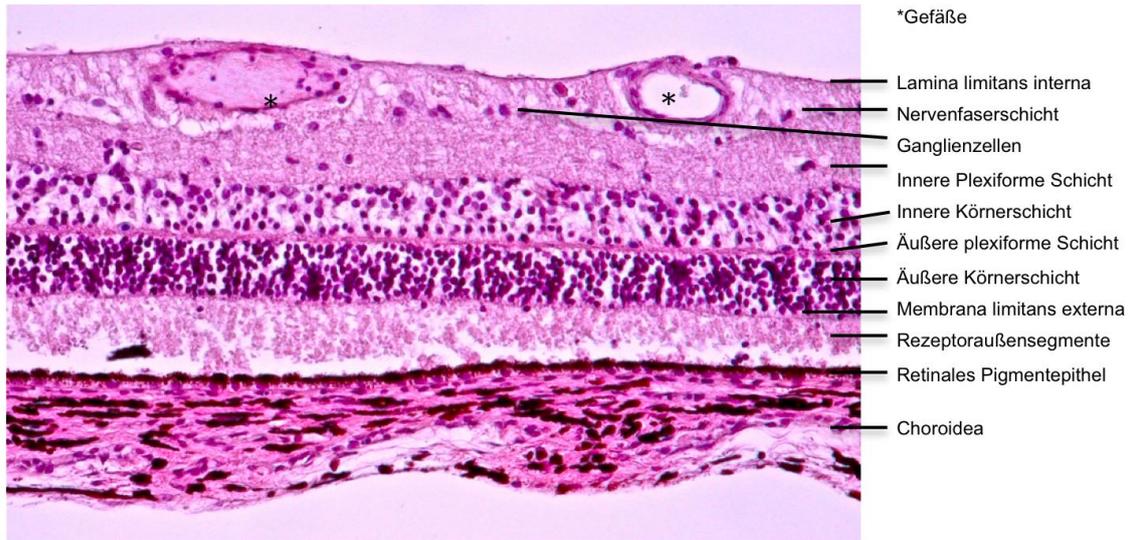
### 5.3 Ergebnisse der erweiterten Biokompatibilitätsversuche

Im Rahmen der erweiterten Biokompatibilitätsversuche soll der allgemeine Erhalt der Netzhautarchitektur einerseits und der morphologische Gewebeerhalt der einzelnen Netzhautschichten andererseits bewertet werden.

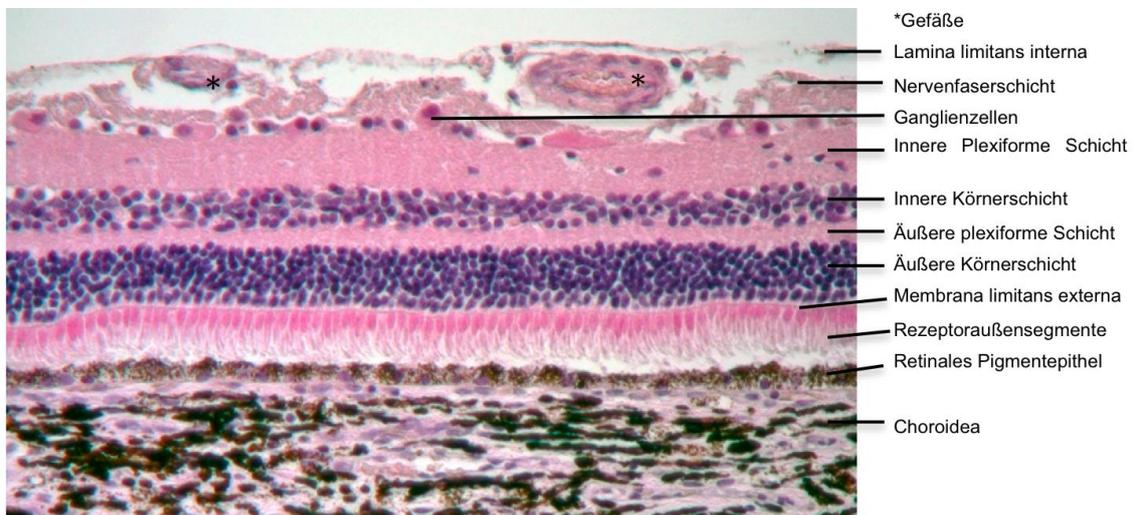
Nach Beenden des Perfusionskultur-Versuchs und histologischer Aufbereitung des Netzhautpräparats kann die Netzhautmorphologie lichtmikroskopisch beurteilt werden. Mit dieser Methode sind aufgrund ihrer relativ geringen Zytotoxizität in den direct contact tests Proben aus Gruppe 4 und 15 untersucht worden. Des Weiteren wurden auch Proben aus Gruppe 6 in diesem Setting untersucht.

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Präparate mit Gelen aus Gruppe 4 und 6 ist ein deutlich toxischer Effekt der Gele auf die Netzhaut nachweisbar, obwohl die Gele am Ende der Perfusion nicht mehr auf der Netzhaut nachweisbar waren. Die einzelnen Netzhautschichten sind zwar noch abgrenzbar, vor allem die inneren Netzhautschichten, wie die innere Körnerschicht, zeigen jedoch starke Auflockerungen und pyknotische Zellen (Abbildung 31).

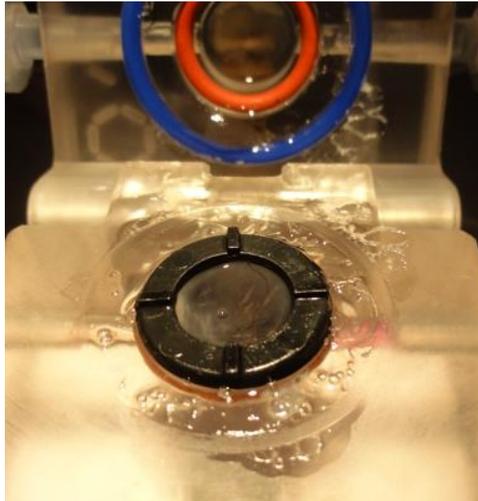
Anders als bei oben genannten Proben zeigen Präparate mit Gelen aus Gruppe 15 keine toxischen Effekte. Sowohl die Netzhautarchitektur, als auch die Gewebemorphologie der einzelnen Netzhautschichten sind sehr gut erhalten (Abbildung 32). Des Weiteren ist das Gel nach Ablauf des Perfusionskulturversuchs immer noch auf der Netzhaut nachweisbar (Abbildung 33).



**Abbildung 31** Gel aus Gruppe 4; 40x; Toxische Reaktion der Netzhaut in Form von Desintegration v.a. der inneren Netzhautschichten



**Abbildung 32** 20x; gut erhaltene Zytoarchitektur und intakte Netzhautmorphologie in Tests mit Gelen, deren pH-Wert und Osmolarität im physiologischen Bereich lagen (Gel aus Gruppe 15); aufgelockerte Nervenfaserschicht als Artefakt durch die Präparation



**Abbildung 33** Präparat in Perfusionskammer.  
Nach Ablauf der Perfusionskultur ist das Gel der Gruppe 15 noch auf der  
Netzhaut nachweisbar (gut sichtbar durch Luftblase im Gel)

## 6 Diskussion

Bisher verwendete Glaskörperersatzstoffe weisen eine Reihe von Limitationen auf, weswegen sie entweder keine vollständige Netzhauttamponade erreichen oder nicht langfristig im Auge belassen werden können. Zu diesen Limitationen gehören Zell- und Gewebetoxizität, Emulsifikation des Glaskörperersatzstoffs, stärkere Schwankungen des intraokularen Drucks oder Bildung von Narbengewebe. Folgen sind die Entstehung von Katarakt, Glaukom, Keratopathien und Wiederablösung der Netzhaut. Deshalb gilt es weiterhin eine Substanz mit günstigen chemischen und physikalischen Eigenschaften zu finden, bei deren Einsatz oben genannte Reaktionen ausbleiben und die langfristig im Auge belassen werden kann, um die Aufrechterhaltung eines gewissen intraokularen Milieus sowie eine dauerhafte Tamponade der Netzhaut zu erreichen.

Polymer-Hydrogele zeigen vielversprechende Eigenschaften in Bezug auf Tamponadeeigenschaften und Biokompatibilität. In dieser Arbeit wurden thermosensitive Hydrogele als Glaskörperersatzstoffe *ex vivo* evaluiert. Wie der natürliche Glaskörper sind diese untersuchten Gele Hydrogele und besitzen damit ähnliche Eigenschaften wie der jugendliche Glaskörper.

Wichtige Fragestellungen auf dem Gebiet der Glaskörperersatzstoffe sind Zytotoxizität, Biokompatibilität, die operative Handhabbarkeit, sowie die physikalischen Eigenschaften einer Substanz. Diese Punkte sollen im Folgenden diskutiert werden.

## 6.1 Operative Handhabbarkeit von thermosensitiven Hydrogelen

Synthese sowie exakte Messungen zur Charakterisierung der Geleigenschaften wurden durch die Projektpartner durchgeführt. Diese Messungen beinhalten die Bestimmung von Lichttransmission, Brechungsindex, Dichte, Osmolarität, Rheologie und Permeabilität (Santan 2013). Demnach haben thermosensitive Hydrogele einen Brechungsindex von 1,358, welcher auch während des Gelierungsvorgangs konstant bleibt und im physiologischen Bereich liegt. Der Brechungsindex des natürlichen Glaskörpers beträgt 1,3349-1,336 (Sebag 1992; Keirl A. 2007). Dies wirkt sich möglicherweise positiv auf die visuelle Rehabilitation aus und macht thermosensitive Hydrogele den Silikonölen überlegen, welche einen Brechungsindex von 1,405 haben und einen sogenannten Hyperopen Shift von 5-7 dpt in phaken Augen verursachen (Stefansson, Anderson et al. 1988). Auch bei Gastamponade kommt es für die Tamponadedauer durch die optischen Wirkungen Brechung und Reflexion zu einer visuellen Beeinträchtigung.

Uns oblag die Testung der Geleigenschaften durch Anwendung im Rahmen von operativen Handlingversuchen. Diese ergaben:

Thermosensitive Hydrogele sind optisch klar und transparent. Auch während der Versuche war diese Transparenz persistent, es bildeten sich keine Verdichtungen aus.

Ausnahmen stellten Gele der Gruppen 3, 7 und 9 dar. In diesen Fällen lagen die Gele von Anfang an trüb oder gelblich verfärbt vor. Gele aus Gruppe 7 wurden anders als alle anderen Gele auf der Basis von Chondroitinsulfat synthetisiert und zeigten ebenfalls von Anfang an eine gelbliche Verfärbung. Dieser Ansatz wurde im weiteren Verlauf verlassen. Hyaluronsäure hingegen kommt aufgrund ihrer guten Biokompatibilität bereits intraokular zum Einsatz und wurde deshalb hier als Biopolymergrundlage für ein Glaskörpersubstitut verwendet.

Thermosensitive Hydrogele können durch Dampfsterilisation bei 121°C für 20 min (durch unsere Projektpartner) sterilisiert werden und im Kühlschrank bei +4°C gelagert werden. Somit erfüllen sie praktische Grundvoraussetzungen für den klinischen Gebrauch.

Eine wesentliche Eigenschaft, die die hier untersuchten Hydrogele auszeichnet ist ihre Thermosensitivität. Thermosensitive Hydrogele liegen bei Raumtemperatur (ca 20°C aber auch bei niedrigeren Temperaturen bis ca 4°C) flüssig vor und gelieren nach 3 min bei Körpertemperatur (ca 37°C). Dieser Vorgang ist mehrfach reversibel. Versuche unserer Projektpartner zeigten in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der thermosensitiven Hydrogele unterschiedliche Gelierungstemperaturen sowie viskoelastische Eigenschaften. Je nach Molekulargewicht des Hyaluronsäuremoleküls, je nach Mengenverhältnis von Hyaluronsäure zu PEPE und je nach Aminierung von PEPE ließ sich die Gelierungstemperatur zwischen 27°C und 39°C einstellen. (Santan 2013)

Des Weiteren weisen die hier vorliegenden thermosensitiven Hydrogele, deren sol-gel-Übergang von der sogenannten kritischen Mizellkonzentration (critical micelle concentration CMC) abhängt, zu vernachlässigende, geringe Volumenänderungen während dieses sol-gel-Übergangs auf (Neffe, Harshal et al. 2014). Eine gewisse Volumenzunahme ist für einen effektiven Tamponadeeffekt erwünscht, allerdings darf die Volumenexpansion nicht so ausgeprägt sein, dass es zu unerwünschten Augendruckanstiegen kommt.

Da im menschlichen Auge, abhängig von der Umgebungstemperatur, keine konstante Temperatur von 37°C vorliegt, gilt es in detaillierteren Untersuchungen zu bestimmen, welche Geliertemperatur tatsächlich ideal für den klinischen Gebrauch wäre.

Des Weiteren sind thermosensitive Hydrogele durch dünne Kanülen bis zu 27G injizierbar und bleiben anschließend unverändert bei 37°C auf der Wärmeplatte gelierfähig. Diese Eigenschaft stellt eine wichtige Voraussetzung für das minimal invasive Einbringen des Hydrogels in das Auge dar. Erstens soll ein

Glaskörperersatzstoff so atraumatisch wie möglich in das Auge implantiert werden können, um postoperative Komplikationen wie z.B. Katarakt oder Netzhautdefekte zu vermeiden. Zweitens kann die bei der Injektion von Polymeren entstehende Schubspannung zu Schäden der Gelstruktur führen und damit möglicherweise zu Änderungen der physikalischen Eigenschaften (Baino 2011). Das beschriebene Problem konnte durch die Entwicklung thermosensitiver Hydrogele überwunden werden. Somit kann nach Injektion nicht nur die unveränderte Gelierfähigkeit des Hydrogels, und damit eine zuverlässige Tamponadefunktion des Glaskörperersatzmaterials, ermöglicht werden, sondern durch die Unversehrtheit der Gelstruktur soll ebenfalls die Entstehung von Gelfragmenten vermieden werden, welche durch vorhandene Netzhautlöcher zwischen die Netzhaut und ihre Unterlage, das retinale Pigmentepithel, gelangen könnten (Refojo and Zauberman 1973) und eine Wiederanlage der Netzhaut beeinträchtigen würden.

Silikonöle, bisher Goldstandard zum langfristigen Glaskörperersatz, bringen nach wie vor das Hauptproblem der Emulsifizierung mit sich. In einem Fallbericht von Maier et al. wurde über eine frühe (2 Tage und 14 Tage postoperativ) Emulsifizierung von 2000 cSt Silikonölen berichtet (Maier, Engelmann et al. 2011). Hochvisköse Silikonöle haben eine geringere Emulsifizierungstendenz, sind jedoch v.a. bei mikroinzisionalen vitreoretinalen Eingriffen schwieriger durch dünne Kanülen zu injizieren, weswegen hier weniger visköse Silikonöle bevorzugt werden. Zu diesem Zweck wurden unter Zugabe von langkettigen Silikonmolekülen neue Silikonöle entwickelt, welche eine geringere Emulsifikationsrate bei guter Injizierbarkeit durch dünne Kanülen haben (Caramoy, Hagedorn et al. 2011).

Versuche zur Visualisierbarkeit und Mischbarkeit der thermosensitiven Hydrogele (siehe 5.1.5) zeigten nach Überschichten der Gele mit einer wässrigen Phase auf der Wärmeplatte bei 37°C zunächst keine Mischbarkeit. Nach 3 Tagen konnte eine Volumenzunahme der Gele beobachtet werden, was für eine gewisse osmotische Schwellung der Gele spricht. Eine solche konnte auch beim Ansetzen der direct contact Versuche beobachtet werden. Zunächst

blieben alle Substanzen am Boden der Wells und behielten ihre Struktur bei. Nach wenigen Stunden quollen die Gele und mischten sich mit dem Kulturmedium. Auf die Bedeutung der Mischbarkeit und der Bewegung von gelösten Stoffen wird später noch eingegangen.

Eine zu starke osmotische Schwellung könnte zu einem unerwünschten Anstieg des Augeninnendrucks führen. Der Effekt einer leichten osmotischen Schwellung ist jedoch erwünscht, denn im Gegensatz zu den meisten anderen Glaskörperersatzstoffen sorgen Hydrogele durch osmotische Schwellung für eine Wiederanlage der Netzhaut und bieten dadurch einen Tamponadeeffekt in alle Richtungen. Die Tamponadefunktion der meisten anderen Glaskörperersatzstoffe beruht auf der Grenzflächenspannung (Foster, Aliyar et al. 2006) zwischen dem wässrigen Flüssigkeitsfilm auf der Retina und der Öl- oder Gasphase des Glaskörperersatzmaterials sowie Auf- bzw. Abtriebskräften. Daher galt bisher: Ein geringes spezifisches Gewicht bietet Vorteile für die Tamponade von superior gelegenen Netzhautlöchern, ein höheres spezifisches Gewicht ist besser geeignet, Netzhautlöcher der unteren Retina zu tamponieren. Jedoch konnte nie eine Tamponade der gesamten Netzhaut erreicht werden. Eine Silikonölblase erreicht den größten Tamponadeeffekt am Apex, nach unten nimmt der Tamponadeeffekt ab (Szurman and Bartz-Schmidt 2000). Deshalb ist für eine effektive Tamponade häufig eine für den Patienten mühsame postoperative Bauch- oder Seitenlage erforderlich. Durch das Vorhandensein eines flüssigkeitsgefüllten Spalts entsteht das Risiko von PVR-Entstehung und Wiederablösung der Netzhaut.

Durch ihr Quellvermögen bieten thermosensitive Hydrogele gegenüber jenen Glaskörperersatzstoffen, deren Tamponadeeffekt auf Grenzflächenspannung beruht, vor allem dort Vorteile, wo bisher eher unbefriedigende Erfolge gelangen: in der Therapie inferior gelegener und komplizierter Netzhautablösungen.

Nach Überschichtung der Gele mit einer wässrigen Phase für 3 Tage und nach osmotischer Schwellung verloren die Gele mit monoaminiertem PEPE allerdings

ihre Gelierbarkeit. Gele mit di-amino-PEPE hingegen zeigten eine höhere Stabilität gegenüber Verdünnung.

Eine Farbstoffaufnahme durch das Hydrogel konnte nicht beobachtet werden. Dies könnte dann Bedeutung erlangen, wenn intraoperativ Vitalfarbstoffe zum Einsatz kommen. Ein Glaskörperersatzstoff soll klar und transparent bleiben und diese Eigenschaften nicht durch Farbstoffaufnahme verlieren.

Dem Glaskörper kommt bei der Regulation des intraokularen Molekültransports eine große Bedeutung zu (Sebag 1992; Stefansson 2009). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse sollte die Struktur eines Glaskörperersatzstoffes gewisse Diffusionseigenschaften erfüllen und die Bewegung von gelösten Stoffen erlauben, um die Voraussetzung für die intravitreale Applikation von Medikamenten zur Behandlung vitreoretinaler Erkrankungen zu erfüllen. In aktuell verwendeten Glaskörperersatzstoffen lassen sich Medikamente wie Bevacizumab oder Triamcinolon, welche im Rahmen von Vitrektomien bei proliferativen Vitreoretinopathien Erkrankungen adjuvant zum Einsatz kommen, schlecht oder nicht lösen (Spitzer, Kaczmarek et al. 2009) (Xu, You et al. 2012). Hydrogele bieten durch ihren hohen Wassergehalt eine gute Umgebung für Biopharmaka wie beispielsweise Peptide, Proteine und Nukleinsäuren (Censi, Di Martino et al. 2012). Zudem bilden Hyaluronsäuremoleküle durch ihre dreidimensionale Anordnung in Lösung unterschiedlich große Räume. Diese erlauben kleinen Molekülen, wie Wasser, Elektrolyten und Nährstoffen eine freie Diffusion, großen Molekülen wie z.B. Proteinen ist dies nur bedingt möglich. Durch eine ständige Dynamik der Anordnung der Hyaluronsäuremoleküle und der daraus resultierenden wechselnden „Porengröße“, können im Grunde alle Moleküle das Hyaluronsäurenetzwerk passieren, eben mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. (Hascall and Laurent 1997) Diese Eigenschaften sind im Hinblick auf die intravitreale Pharmakotherapie bei glaskörpersubstituierten Patienten von Interesse. Darüberhinaus sollten thermosensitive Hydrogele als Langzeitdepot für Medikamente dienen können sowie neuroprotektive Therapien und die Anwendung von Stammzelltherapien ermöglichen.

Gleichzeitig sollte ein Glaskörperersatzstoff auch als Diffusionsbarriere zwischen vorderem und hinterem Augenabschnitt fungieren, damit das intraokuläre Milieu aufrechterhalten werden kann. Hierbei spielt neben der Molekülstruktur auch die Viskosität des Glaskörperersatzstoffs eine zentrale Rolle. Ist der Glaskörperraum mit einer Substanz gefüllt, deren Viskosität geringer ist als die des natürlichen Glaskörpers, z.B. nach Vitrektomie und Glaskörperersatz (mit Gas oder Kammerwasser) aber auch nach pharmakologischer Vitreolyse mit rekombinantem Mikroplasmin, herrscht ein erleichterter Molekültransport zwischen vorderen und hinteren Augenabschnitten: Sauerstoff gelangt vermehrt nach posterior, Zytokine (z.B. VEGF) gelangen vermehrt nach anterior. Ist der Glaskörperersatz hingegen visköser als der natürliche Glaskörper, steht die Barrierefunktion im Vordergrund. Vor dem Hintergrund dieses Wissens stellt sich die Frage, ob je nach Krankheitsbild und Netzhautsituation ein Angebot an unterschiedlich viskösen Glaskörperersatzstoffen sinnvoll wäre.

## 6.2 Zytotoxizität von thermosensitiven Hydrogelen

Ein häufiger Grund für rezidivierende Netzhautablösungen sind Netzhauttraktionen durch das Wachstum von Narbensträngen wie sie oft im Rahmen von PVR oder diabetischen Membranen vorkommen. Ein Glaskörperersatzstoff sollte deshalb nicht als Gerüst für solche Bindegewebestränge fungieren.

In keinem der durchgeführten direct contact Tests konnte ein dreidimensionales Einwachsen von Zellen in das Gel beobachtet werden, die Gele blieben zellfrei. Diese Beobachtung könnte im Hinblick auf PVR-Entstehung klinisch relevant sein, denn sie spricht dagegen, dass thermosensitive Hydrogele eine Art Gerüst für Zellproliferation darstellen.

Hingegen waren Zellen in unmittelbarer Nähe der Gele bzw. auf der Geloberfläche je nach untersuchtem Gel in unterschiedlichem Ausmaß überlebensfähig.

In der Literatur wurden Ansätze beschrieben, die das Problem der PVR-Entstehung adressieren. So wurde beispielsweise das semisynthetische

*Adcon®-L-Hydrogel*, dessen Proteoglycane eine antifibrotische Wirkung haben, als Glaskörperersatz im Kaninchenauge untersucht in der Hoffnung, dass diese Eigenschaft auch eine PVR hemmt. Doch zeigte dieses Gel deutliche toxische und entzündliche Reaktionen der untersuchten Augen, was *Adcon®-L-Hydrogel* als Glaskörperersatzstoff ungeeignet macht. (De Jong, Bali et al. 2000)

Nach Testung der ersten Gele fiel auf, dass pH-Wert-Messungen durch unsere Projektpartner andere Werte zeigten als Messungen in unserem Labor. Diese Beobachtung gab Anlass zu der Annahme, dass der pH-Wert schwankt und nicht stabil bleibt. Daraufhin wurde eine Variante des direct contact tests durchgeführt (siehe 3.3.2), um den Einfluss des pH-Werts auf die Zytotoxizität zu bestimmen. In diesen Versuchen zeigte das Zellkulturmedium eine gewisse Pufferkapazität.

Dennoch waren in den wells mit untitriertem Gel, welches anfangs einen unphysiologisch sauren pH-Wert hatte, trotz deutlicher Abpufferung des sauren pH-Werts innerhalb von 24 h auf einen pH-Wert von 7,25 ein geringeres Zellwachstum sowie stärkerer Zelltod zu sehen als in der Kontrolle. Somit ist der Ausgangs-pH-Wert mitentscheidend für das Zellwachstum bzw. den Zelltod.

Für eine stabile pH-Wert-Einstellung sind Untersuchungen der Wechselwirkung von Struktur der Gele, Syntheseprozess und pH-Wert erforderlich.

Erste in-vitro Zytotoxizitätstests zeigten einen inhibierenden Effekt der untersuchten Gele auf das Zellwachstum. Bei Gelen der Gruppe 6 waren Zellmembrandefekte sichtbar, durch welche Zytoplasma auszutreten schien. Diese Beobachtung kann Folge der unphysiologischen Osmolarität der Gele von 800 mosmol/l sein.

Da Hyaluronsäure Bestandteil des natürlichen Glaskörpers ist, ist sie als Basis für Glaskörperersatzstoffe prädestiniert. Sie findet aufgrund ihrer guten Biokompatibilität bereits in vielen Bereichen der Ophthalmologie Anwendung.

PEPE (Gruppe 8) zeigte in unseren Zytotoxizitätstests kaum Zytotoxizität. Mono-Amino-PEPE (Gruppe 9) war erst in 10%iger Verdünnung nicht mehr

zytotoxisch. Hier stellt sich die Frage inwieweit Agenzien zur Aminierung der PEPE-Moleküle eine Rolle für die Zytotoxizität spielen.

Durch Aufreinigungsschritte in der Gelsynthese und die stabile Einstellung von pH-Wert und Osmolarität auf physiologische Werte konnte die Zytotoxizität reduziert werden. Bei einer Gelgruppe (Gruppe 15) ist es gelungen pH-Wert und Osmolarität so stabil einzustellen, sodass sich keine Zytotoxizität mehr zeigte.

Ergebnisse der tests with liquid extracts from the test material zeigten insgesamt einen klaren Trend. Pure Gele zeigten eine deutliche Zytotoxizität, was vermutlich auch an einem Mangel an Zellkulturmedium lag. Verdünnt waren die Gele nicht mehr zytotoxisch. Es bleibt zu testen welche Bedeutung dies für den klinischen Gebrauch hat, da in vivo durch die Kammerwasserproduktion ebenfalls von einem gewissen Verdünnungseffekt auszugehen ist.

### **6.3 Biokompatibilität von thermosensitiven Hydrogelen**

Das Perfusionskulturmodell mit einem porcinen Retina-RPE-Choroidea-Präparat stellt eine in mehreren Studien erprobte Methode zur Toxizitätstestung von Substanzen für den intraokularen Gebrauch dar. Es ermöglicht eine organspezifische Testung, welche der statischen Zellkultur überlegen ist und die Anzahl der Tierversuche reduzieren kann (Kobuch, Herrmann et al. 2008) (Kloth, Kobuch et al. 2000).

Histologische Ergebnisse der erweiterten Biokompatibilitätstests nach 4 Tagen Perfusionskultur zeigten, dass Gele mit niedrigem pH-Wert und hoher Osmolarität toxische Reaktionen der Netzhaut hervorriefen. Die Gele lagen am Ende der Perfusion nicht mehr auf der Netzhaut, da sie vermutlich zu einem unbestimmten Zeitpunkt weggespült worden sind. Der toxische Effekt betrifft vor allem die inneren Netzhautschichten. Die Auflockerungen in der Schicht der Photorezeptor-Außensegmente kommen am ehesten durch die Fixierung des Präparates zustande und stellen Artefakte dar.

Hingegen blieben Netzhautarchitektur und –morphologie in Tests mit Gelen, deren pH-Wert und Osmolarität stabil an physiologische Werte angepasst waren, vollständig erhalten. Außerdem waren die Gele nach Ablauf von 4 Tagen Perfusionskultur noch auf der Netzhautoberfläche anliegend, sodass evtl. sogar ein Schutzeffekt des Gels auf die Netzhaut angenommen werden kann. Dies müsste jedoch in weiterführenden Tests mit einem längeren Beobachtungszeitraum untersucht werden.

## 6.4 Resümee und Ausblick

Die Entwicklung einer Substanz, die allen Anforderungen eines idealen Glaskörperersatzstoffes gerecht wird, stellt chemisch eine enorme Herausforderung dar. Vielversprechende Neuentwicklungen der letzten Jahre sind bis heute nicht auf dem Markt (Su, Chen et al. 2011; Schramm, Spitzer et al. 2012).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit geben Grund zur Annahme, dass thermosensitive Hydrogele auf der Basis von Hyaluronsäure gute Kandidaten für einen langfristigen Glaskörperersatz sind. Der vorteilhafte Einsatz von thermosensitiven Hydrogelen im Bereich der vitreoretinalen Chirurgie ist zu erwarten. Es ist einmal eine stabile pH-Wert-Einstellung gelungen, was eine gewaltige Herausforderung für die Synthese darstellt. Somit konnte ein Fortschritt in der Kompatibilität erreicht werden. Die reproduzierte Testung steht noch aus, da pH-Wert- und Osmolarität–Stabilisierung bei neuen Proben wieder nicht gelungen war. Es muss weiter untersucht werden, in welchem Syntheseschritt eine Instabilität von pH-Wert & Osmolarität entsteht.

Eine Limitation dieser Arbeit ist, dass die vorliegenden Daten sehr explorativ sind. In Zukunft sind Folgeuntersuchungen mit größeren Fallzahlen und längerer Beobachtungsdauer erforderlich.

Ein Vorteil vorliegender Studie ist die entwicklungsbegleitende Evaluation der thermosensitiven Hydrogele, welche durch eine enge Zusammenarbeit von Biochemikern (Synthese) und Medizinern (Evaluation) ermöglicht wurde.

Das nächste Ziel wäre das Degradationsverhalten und die tatsächliche intraokulare Verweildauer in vivo zu untersuchen. Bezüglich der Anforderungen an das Degradationsverhalten existieren unterschiedliche Ansätze. Während bei dem einen Ansatz Biodegradibilität erwünscht ist um einen erneuten chirurgischen Eingriff zur Entfernung des Glaskörpersubstituts zu vermeiden, verfolgt der andere das Ziel eines dauerhaften nicht biologisch abbaubaren Glaskörperersatzes.

Um das bereits erwähnte Problem der stabilen pH-Wert-Einstellung zu adressieren sind Folgeuntersuchungen erforderlich, die im Syntheseprozess den Punkt der pH-Wert-Änderung identifizieren und Lösungen aufzeigen.

Des Weiteren wäre von Interesse zu untersuchen, welchen Einfluss thermosensitive Hydrogele auf eine PVR-Entstehung haben. Hierfür könnte zusätzlich zu den von uns durchgeführten Experimenten eine methodische Erweiterung mit z.B. immunfluoreszenzbasierten Verfahren weiterführend sein um die Regulation von Zellproliferation zu untersuchen.

Bezüglich des Zusammenhangs von Viskosität eines Glaskörpersubstituts, Barrierefunktion und Molekültransport wäre von Interesse, einen Glaskörperersatz zu entwickeln, der eine variable Einstellung der Viskosität je nach Bedarf zulässt. In weiteren Versuchen könnte also getestet werden in welche Viskositätsbereiche möglich und praktikabel sind und inwiefern sich dies im klinischen Gebrauch auswirkt.

Eine weitere wichtige Frage ist, ob eine Laserkoagulation der Netzhaut bei Geltamponade möglich ist. Es gilt also zu untersuchen ob durch Laserenergie und lokale Temperaturerhöhung Veränderungen der chemischen Struktur von thermosensitiven Hydrogelen stattfinden.

Als nächste Stufe nach in-vitro Testungen sollten Untersuchungen am Tiermodell folgen um mögliche längerfristige Effekte der thermosensitiven Hydrogele auf Kataraktentstehung auf die Elektrophysiologie der Netzhaut zu erforschen.

## 7 Zusammenfassung

Aktuell im klinischen Gebrauch befindliche Glaskörpersubstitute weisen eine Reihe an Limitationen auf, aufgrund derer sie entweder keine vollständige Netzhauttamponade erreichen oder nicht langfristig im Auge belassen werden können. Zukünftige Glaskörperersatzstoffe sollen weitere Funktionen erfüllen und als Medikamenten-Langzeitdepot fungieren, die visuelle Rehabilitation verbessern und beschleunigen sowie die Kombination mit einer Stammzelltherapie ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit war die entwicklungsbegleitende ex-vivo Evaluation thermosensitiver Hydrogele als neuer Ansatz auf dem Gebiet der Glaskörperersatzstoffe. Thermosensitive Hydrogele sind dreidimensionale Polymernetzwerke aus dem Triblock-Copolymer Poly(ethylen glycol)-*b*-Poly(propylen glycol)-*b*-Poly(ethylen glycol) (PEPE) mit seinen thermosensitiven Eigenschaften und einem Biopolymer.

Die Gele wurden 1) hinsichtlich ihrer operativen Handhabbarkeit, 2) mittels qualitativer (direct contact test) und quantitativer (Mitochondrien-Viabilitätstest EZ4U®) Tests nach ISO 10993-5 mit Mausfibroblasten der Linie L929 auf Zytotoxizität und 3) durch in-vitro Biokompatibilitätstests (Perfusionsgewebekultur) untersucht.

Es zeigte sich, dass thermosensitive Hydrogele bei Temperaturen von 4°C - 20°C flüssig vorliegen und nach 3 min bei Körpertemperatur (ca 37°C) gelieren. Dieser Vorgang ist mehrfach reversibel. Die Geliertemperatur hängt von der Zusammensetzung der Gele ab und kann in einem Bereich zwischen 27°C und 39°C eingestellt werden. Die untersuchten Hydrogele sind optisch klar, transparent und problemlos durch dünne Kanülen bis zu 27G injizierbar, ohne ihre Eigenschaften zu verlieren, was eine atraumatische okuläre Im- und Explantation zulässt.

Es konnte ein gewisses Quellvermögen der Gele beobachtet werden, was eine gleichmäßige Netzhauttamponade in alle Richtungen ermöglicht. Dadurch bieten thermosensitive Hydrogele gegenüber jenen Glaskörperersatzstoffen, deren Tamponadeeffekt auf Grenzflächenspannung und Auf- bzw. Abtriebskräften beruht, vor allem dort Vorteile, wo bisher eher unbefriedigende Erfolge gelangen: in der Therapie von komplizierten Netzhautablösungen.

Ein dreidimensionales Einwachsen von Zellen in das Gel konnte nicht festgestellt werden, die Gele blieben zellfrei. Dies ist eine wichtige Voraussetzung um das Wachstum von Narbengewebe und somit rekurrente Netzhautablösungen zu verhindern.

Erste getestete Gele hatten einen inhibierenden Effekt auf das Zellwachstum. Als Schlüsselpunkt konnte eine Instabilität von pH-Wert und Osmolarität der Gele identifiziert werden. Nach Aufreinigungsschritten und stabiler Einstellung von pH-Wert und Osmolarität waren die Gele in Verdünnung mit Zellkulturmedium nicht mehr zytotoxisch.

Histologische Ergebnisse der Biokompatibilitätstests in der Perfusionskultur zeigten, dass die Netzhautarchitektur und –morphologie vollständig erhalten blieben.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit geben Grund zur Annahme, dass thermosensitive Hydrogele auf der Basis von Hyaluronsäure aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften vielversprechende Kandidaten als zukünftiger Glaskörperersatz darstellen. Eine stabile Einstellung von pH-Wert und Osmolarität muss jedoch gewährleistet sein. Weiterführend gilt es, das Degradationsverhalten thermosensitiver Hydrogele zu charakterisieren, den Einfluss von Laserenergie und lokalen Temperaturerhöhungen auf die Gelstruktur zu untersuchen, sowie Versuche im Tiermodell durchzuführen um längerfristige Effekte auf die Netzhaut in vivo zu evaluieren.

## 8 Literaturverzeichnis

- Azzolini C., Docchio F., Brancato R., Trabucchi G. (1992). "Interactions between light and vitreous fluid substitutes." *Arch Ophthalmol* 110(10): 1468-1471.
- Baino F. (2011). "Towards an ideal biomaterial for vitreous replacement: Historical overview and future trends." *Acta Biomaterialia* 7(3): 921-935.
- Balazs E. A. and D. B. Sweeney (1966). "The replacement of the vitreous body in the monkey by reconstituted vitreous and by hyaluronic acid." *Bibl Ophthalmol* 70: 230-232.
- Bishop P. N. (2000). "Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel." *Prog Retin Eye Res* 19(3): 323-344.
- Caramoy A., Hagedorn N., Fauser S., Kugler W., Groß, T., Kirchhof B. (2011). "Development of emulsification-resistant silicone oils: can we go beyond 2000 mPas silicone oil?" *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(8): 5432-5436.
- Censi R., Di Martino P., Vermonden T., Hennink W. E. (2012). "Hydrogels for protein delivery in tissue engineering." *J Control Release* 161(2): 680-692.
- Chan I. M., Tolentino F. I., Refojo M. G., Fournier, G., Albert D. M. (1984). "Vitreous substitute. Experimental studies and review." *Retina* 4(1): 51-59.
- Chang S. (1989). *Intraocular gases*. Retina. R. S.J. St. Louis: 2115-2129.
- Chirila T. V., Tahija S., Hong, Y., Vijayasekaran S., Constable I.J. (1994). "Synthetic polymers as materials for artificial vitreous body: review and recent advances." *J Biomater Appl* 9(2): 121-137.
- Cibis P. A., Becker B., Okun E., Canaan S. (1962). "The use of liquid silicone in retinal detachment surgery." *Arch Ophthalmol* 68: 590-599.
- Colthurst M. J., Williams R. L., Hiscott P. S., Grierson I. (2000). "Biomaterials used in the posterior segment of the eye." *Biomaterials* 21(7): 649-665.
- Cunha-Vaz J. G. (1997). "The blood-ocular barriers: past, present, and future." *Doc Ophthalmol* 93(1-2): 149-157.

- Cutler N. L. (1947). "Vitreous transplantation." *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 51: 253-259.
- Daniele S., Refojo M. F., Schepens C. L., Freeman H. M. (1968). "Glyceryl methacrylate hydrogel as a vitreous implant. An experimental study." *Arch Ophthalmol* 80(1): 120-127.
- Davidorf F. H., Chambers R. B., Kwon O. W., Doyle W., Gresak P., Frank S. G. (1990). "Ocular toxicity of vitreal pluronic polyol F-127." *Retina* 10(4): 297-300.
- De Jong C., Bali E., Libert J., Caspers-Velu L. (2000). "ADCON-L hydrogel as a vitreous substitute: preliminary results." *Bull Soc Belge Ophthalmol*(278): 71-75.
- Diaz-Llopis M. and E. Cervera (2007). "Posterior vitreous detachment and pharmacologic vitreolysis: the new age of enzymatic vitrectomy." *Arch Soc Esp Oftalmol* 82(8): 465-466.
- Drury J. L. and D. J. Mooney (2003). "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications." *Biomaterials* 24(24): 4337-4351.
- Duker J. S., Kaiser P. K., Binder S., De Smet M. D., Gaudric A., Reichel E., Sadda S. R., Sebag J., Spaide R. F., Stalmans P. (2013). "The International Vitreomacular Traction Study Group classification of vitreomacular adhesion, traction, and macular hole." *Ophthalmology* 120(12): 2611-2619.
- Eckardt C., Nicolai U., Winter M., Knop E. (1991). "Experimental intraocular tolerance to liquid perfluorooctane and perfluoropolyether." *Retina* 11(4): 375-384.
- Faude F. and Wiedemann P. (1999). "Intraocular gases in vitreous and retinal surgery. I: Basic principles." *Ophthalmologie* 96(5): W349-358.
- Faude F. and Wiedemann P. (1999). "Intraocular gases in vitreous and retinal surgery. II: Clinical aspects." *Ophthalmologie* 96(6): 413-420.
- Federman J. L. and Schubert H. D. (1988). "Complications associated with the use of silicone oil in 150 eyes after retina-vitreous surgery." *Ophthalmology* 95(7): 870-876.
- Feng S., Chen H., Liu Y., Huang Z., Sun X., Zhou L., Lu, X., Gao Q. (2013). "A novel vitreous substitute of using a foldable capsular vitreous body injected with polyvinylalcohol hydrogel." *Sci Rep* 3: 1838.

- Fernandez-Vigo J., Refojo M. F., Verstraeten T. (1990). "Evaluation of a viscoelastic solution of hydroxypropyl methylcellulose as a potential vitreous substitute." *Retina* 10(2): 148-152.
- Finger R. P., Fimmers R., Holz F. G., Scholl H. P. N. (2011). "Incidence of blindness and severe visual impairment in Germany: projections for 2030." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(7): 4381-4389.
- Foster W. J. (2008). "Vitreous Substitutes." *Expert Rev Ophthalmol* 3(2): 211-218.
- Foster W. J., Aliyar H. A., Hamilton P., Ravi N. (2006). "Internal Osmotic Pressure as a Mechanism of Retinal Attachment in a Vitreous Substitute." *J Bioact Compat Pol* 21: 221-235.
- Gekeler K., Priglinger S., Gekeler F., Priglinger C. (2015). "The role of the vitreous body in diseases of neighboring structures." *Ophthalmologe* 112(7): 564-571.
- Girach A. and M. D. de Smet (2014). *Diseases of the Vitreo-Macular Interface*. Heidelberg, Springer Verlag Berlin.
- Hascall V. C. and T. C. Laurent. (1997). "Hyaluronan: Structure and Physical Properties." *Glycoforum* Retrieved Dec. 15, 1997, from <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.
- Hogen-Esch T. E., Shah K. R., Fitzgerald C. R. (1976). "Development of injectable poly(glyceryl methacrylate) hydrogels for vitreous prosthesis." *J Biomed Mater Res* 10(6): 975-976.
- Hong Y., Chirila T. V., Cuypers M. J. H., Constable I. J. (1996). "Polymers of 1-vinyl-2-pyrrolidinone as potential vitreous substitutes: physical selection." *J Biomater Appl* 11(2): 135-181.
- Hong Y., Chirila T. V., Vijaysekaran S., Shen W., Lou X., Dalton P.D. (1998). "Biodegradation in vitro and retention in the rabbit eye of crosslinked poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone) hydrogel as a vitreous substitute." *J Biomed Mater Res* 39(4): 650-659.
- Jonas J. B., Knorr H. L., Rank R. M., Budde W. M. (2001). "Retinal redetachment after removal of intraocular silicone oil tamponade." *Br J Ophthalmol* 85(10): 1203-1207.
- Keirl A. C. C. (2007). *chematic Eyes, Emmetropia and Ametropia. Clinical Optics and Refraction*, Elsevier: 20-24.
- Kirchhof S., Goepferich A. M., Brandl F. P. (2015). "Hydrogels in ophthalmic applications." *Eur J Pharm Biopharm.* 95(Pt B):227-38

- Kleinberg T. T., Tzekov R. T., Stein R. T., Ravi N., Kaushal S. (2011). "Vitreous substitutes: a comprehensive review." *Surv Ophthalmol* 56(4): 300-323.
- Kloth S., Kobuch K., Domokos J., Wanke C., Monzer J. (2000). "Polar application of test substances in an organotypic environment and under continuous medium flow: a new tissue-based test concept for a broad range of applications in pharmacotoxicology." *Toxicol In Vitro* 14(3): 265-274.
- Kobuch K., Herrmann W. A., Framme C., Sachs H. G., Gabel V. P., Hillenkamp J. (2008). "Maintenance of adult porcine retina and retinal pigment epithelium in perfusion culture: characterisation of an organotypic in vitro model." *Exp Eye Res* 86(4): 661-668.
- Lee B., Litt M., Buchsbaum G. (1992). "Rheology of the vitreous body. Part I: Viscoelasticity of human vitreous." *Biorheology* 29(5-6): 521-533.
- Liang J., Struckhoff J. J., Du H., Hamilton P.D., Ravi N. (2017). "Synthesis and characterization of in situ forming anionic hydrogel as vitreous substitutes." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 105(5):977-988.
- Machemer R. (1995). "The development of pars plana vitrectomy: a personal account." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233(8): 453-468.
- Machemer R., H. Buettner, Norton, E. W., Parel, J. M. (1971). "Vitrectomy: a pars plana approach." *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 75(4): 813-820.
- Maier M., Pfrommer S., Burzer S., Feucht N., Winkler von Mohrenfels C., Lohmann C, P, (2012). "Vitreomacular interface and posterior vitreomacular adhesion in exudative age-related macular degeneration (AMD): an OCT-based comparative study." *Klin Monbl Augenheilkd* 229(10): 1030-1035.
- Maier M. M., Engelmann V., Pfrommer S., Perz C., Lohmann C. P. (2011). "Early emulsification of silicone oil (2000 cs) in minimally invasive transconjunctival vitreoretinal surgery." *Klin Monbl Augenheilkd* 228(5): 477-479.
- Marcus D. M., D'Amico D. J., Mukai S. (1994). "Pneumatic retinopexy versus scleral buckling for repair of primary rhegmatogenous retinal detachment." *Int Ophthalmol Clin* 34(3): 97-108.
- Mitry D., Fleck B. W., Wright A. F., Campbell H., Charteris D. G. (2010). "Pathogenesis of rhegmatogenous retinal detachment: predisposing anatomy and cell biology." *Retina* 30(10): 1561-1572.

- Mojana F., L. Cheng, Bartsch D. U., Silva G. A., Kozak I., Nigam N., Freeman W. R. (2008). "The role of abnormal vitreomacular adhesion in age-related macular degeneration: spectral optical coherence tomography and surgical results." *Am J Ophthalmol* 146(2): 218-227.
- Neffe A. T., Harshal D. S., Kamlage S., Gottschalk B., Lendlein A. (2014). "Micellization of Aminoterminated Poly(ethylene glycol)-block-poly(propylene glycol)-block-poly-(ethylene glycol) in the Presence of Hyaluronic Acid." *Macromolecular Symposia* 354(1): 91-97.
- Ohira A., Wilson C. A., deJuan E. Jr., Murata Y., Soji T., Oshima, K. (1991). "Experimental retinal tolerance to emulsified silicone oil." *Retina* 11(2): 259-265.
- Ohm J. (1911). "Über die Behandlung der Netzhautablösung durch operative Entleerung der subretinalen Flüssigkeit und Einspritzung von Luft in den Glaskörper." *Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol* 79(3): 442-450.
- Orzalesi N., Migliavacca L., Bottoni F., Miglior S. (1998). "Experimental short-term tolerance to perfluorodecalin in the rabbit eye: a histopathological study." *Curr Eye Res* 17(8): 828-835.
- Pastor J. C., Zarco J. M., Del Nozal M. J., Pampliega A., Marinero P. (1998). "Clinical consequences of the use of highly purified silicone oil. Comparative study of highly and less purified silicone oil." *Eur J Ophthalmol* 8(3): 179-183.
- Peyman G. A., Schulman J. A., Sullivan B. (1995). "Perfluorocarbon liquids in ophthalmology." *Surv Ophthalmol* 39(5): 375-395.
- Refojo M. F. (1971). "Polymers in ophthalmic surgery." *J Biomed Mater Res* 5(1): 113-119.
- Refojo M. F. and Zauberman H. (1973). "Optical properties of gels designed for vitreous implantation." *Invest Ophthalmol* 12(6): 465-467.
- Romano M. R., Zenoni S., Arpa P., Mariotti C. (2013). "Mixture of ether and silicone oil for the treatment of inferior complicated retinal detachment." *Eur J Ophthalmol* 23(2): 230-235.
- Saika S., Yamanaka O., Flanders K. C., Okada Y., Miyamoto T., Sumioka, T., Shirai K., Kitano A., Miyazaki K., Tanaka S., Ikeda K. (2008). "Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for prevention of ocular tissue fibrosis." *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8(1): 69-76.
- Santan H. D. (2013). *Synthesis and Characterization of Thermosensitive Hydrogels Derived from Polysaccharides*. Dr. rer. nat., Universität Potsdam.

- Santan H. D., Neffe A. T., Kamlage S., Lendlein A. (2012). "Thermal Gelation and Stability of Pectin Grafted with PEPE." *MRS Proceedings* 1403(1).
- Schmolka I. R. (1972). "Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns." *J Biomed Mater Res* 6(6): 571-582.
- Schramm C., Spitzer M. S., Henke-Fahle S., Steinmetz G., Januschowski K., Heiduschka P., Geis-Gerstorfer J., Biedermann T., Bartz-Schmidt K. U., Szurman P. (2012). "The cross-linked biopolymer hyaluronic acid as an artificial vitreous substitute." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(2): 613-621.
- Schulze S., Hoerle S., Mennel S., Kroll P. (2008). "Vitreomacular traction and exudative age-related macular degeneration." *Acta Ophthalmol* 86(5): 470-481.
- Scuderi G. (1954). "[Experimental vitreous transplantation: attempted partial replacement with homologous vitreous, heterologous liquor and polyvinylpyrrolidone solutions]." *Ann Ottalmol Clin Ocul* 80(4): 213-220.
- Sebag J. (1989). *The vitreous: structure, function, and pathobiology*. New York, Springer-Verlag.
- Sebag J. (1992). *The Vitreous. Adler's physiology of the eye*. W. M. Hart. St. Louis, CV Mosby: 268-334.
- Sebag J. and E. A. Balazs (1989). "Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(8): 1867-1871.
- Slevin M., Krupinski J., Gaffney J., Matou S., West D., Delisser H., Savani R. C., Kumar S. (2007). "Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways." *Matrix Biol* 26(1): 58-68.
- Slomkowski S., Alemán J. V., Gilbert R. G., Hess M., Horie K., Jones R. G., Stepto R. F. (2011). "Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011)." *Pure and Applied Chemistry* 83(12): 2229-2259.
- Spitzer M. S., Kaczmarek R. T., Yoeruek E., Petermeier K., Wong D., Heimann, H., Jaissle G. B., Bartz-Schmidt K. U., Szurman P. (2009). "The distribution, release kinetics, and biocompatibility of triamcinolone injected and dispersed in silicone oil." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(5): 2337-2343.
- Stalmans P., Benz M. S., Gandorfer A., Kampik A., Girach A., Pakola S., and Haller J. (2012). "Enzymatic vitreolysis with ocriplasmin for vitreomacular traction and macular holes." *N Engl J Med* 367(7): 606-615.

- Stefansson E. (2009). "Physiology of vitreous surgery." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247(2): 147-163.
- Stefansson E., Anderson M. M., Jr., Landers M. B. 3rd, Tiedeman J. S., McCuen B. W. 2nd. (1988). "Refractive changes from use of silicone oil in vitreous surgery." *Retina* 8(1): 20-23.
- Su W. Y., Chen K. H., Chen Y. C. (2011). "An injectable oxidated hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide hydrogel as a vitreous substitute." *J Biomater Sci Polym Ed* 22(13): 1777-1797.
- Suri S. and Banerjee R. (2006). "In vitro evaluation of in situ gels as short term vitreous substitutes." *J Biomed Mater Res A* 79(3): 650-664.
- Swindle K. E. and Ravi N. (2007). "Recent advances in polymeric vitreous substitutes." *Expert Rev Ophthalmol* 2(2): 255-265.
- Swindle-Reilly K. E., Shah M., Hamilton P. D., Eskin T. A., Kaushal S., Ravi N. (2009). "Rabbit study of an in situ forming hydrogel vitreous substitute." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(10): 4840-4846.
- Szurman P. and Bartz-Schmidt K. U. (2000). "Silicone oils in retinal surgery ." *Ophthalmologie* 97(7): 514-525.
- Versura P., Cellini, M., Torreggiani A., Bernabini B., Rossi A., Moretti M., Caramazza R. (2001). "The biocompatibility of silicone, fluorosilicone and perfluorocarbon liquids as vitreous tamponades. an ultrastructural and immunohistochemical study." *Ophthalmologica* 215(4): 276-283.
- Xu Y., You Y., Du W., Zhao C., Li J., Mao J., Chen H. and Cheng L. (2012). "Ocular pharmacokinetics of bevacizumab in vitrectomized eyes with silicone oil tamponade." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(9): 5221-5226.

## 9 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 1</b> Humaner Glaskörper nach Entfernung von Sklera, Aderhaut und Netzhaut (Sebag 1989) .....   | 2  |
| <b>Abbildung 2</b> "Schematic diagram of adult human vitreous ultrastructure. Parallel collagen fibrils are packed into bundles that aggregate and ultimately form visible fibers. Hyaluronic acid and water molecules fill the interfibrillar spaces." (Sebag and Balazs 1989) .....  | 3  |
| <b>Abbildung 3</b> Zusammensetzung von thermosensitiven Hydrogelen auf Hyaluronsäurebasis.....   | 27 |
| <b>Abbildung 4</b> Versuchsaufbau "test with liquid extracts from the test material" nach Zugabe des EZ4U® Farbstoffs.....   | 41 |
| <b>Abbildung 5</b> Darstellung des Perfusionskultursystems a) Perfusionskultursystem; von rechts nach links: Kulturmediumzufuhr, Peristaltikpumpe, Wärmeplatte mit Präparatkammer, Kulturmediumauffangbehälter b) Perfusionskammer mit eingesetzten Gewebeträgern c) Präparieren des pRPEC d) Präparat im Gewebeträger ..... | 45 |
| <b>Abbildung 6</b> Zu testende Substanz a) in Pulverform b) Herstellung des Gels bei Raumtemperatur mit Magnetrührer durch Auflösen in intraokulärer Spülflüssigkeit .....   | 48 |
| <b>Abbildung 7</b> flüssiges Gel a) leichtes Schäumen bei der Herstellung des Gels b) unten: Gel erscheint leicht milchig; oben: Zum Vergleich H <sub>2</sub> O c) klares, farbloses Gel nach Einführen eines weiteren Aufreinigungsschrittes .....  | 49 |
| <b>Abbildung 8</b> Gelierfähigkeit a) gelierte Geltropfen auf aufrecht gehaltenem Objektträger b) Verflüssigung der Geltropfen nach Abkühlen .....   | 49 |
| <b>Abbildung 9</b> a) Eyecup mit Gelfilm auf Wärmeplatte b) Präparat nach Schneiden, Gel immer noch adhärent an Retina, zur .....  | 50 |
| <b>Abbildung 10</b> unbeeinträchtigte Gelierbarkeit des Gels nach Injektion durch eine 27 G Kanüle.....  | 51 |
| <b>Abbildung 11</b> a) Gel auf Wärmeplatte mit Brillant Blue gefärbter Intraokularflüssigkeit überschichtet b) Volumenzunahme des Gels nach 3 Tagen ohne Farbstoffaufnahme .....   | 51 |
| <b>Abbildung 12</b> a)+b) RPE-Zellen mit Gel aus Gruppe 2 nach Trypanblau-Färbung, alle Zellen abgestorben, pyknotisch.....  | 52 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Abbildung 13</b> a) Mausfibroblasten L929 auf Gel aus Gruppe 3; tote Zellen mit Vakuolen und Granula b) Zelle mit Vakuolen; 40-fache Vergrößerung c) Kontrolle, dichter Zellrasen.....   | 53 |
| <b>Abbildung 14</b> test with liquid extracts from the test material zeigten eine mit abnehmender Gelkonzentration steigende Zellzahl: a) Gel pur; b) 30 % Gel; c) 10 % Gel; d) 3 % Gel; e) 1 % Gel.....  | 54 |
| <b>Abbildung 15</b> Mausfibroblasten L929 mit Gel aus Gruppe 6; direct contact Test a) Zellen mit Vakuolen b) Zytoplasma scheint durch defekte Zellmembran auszutreten.....   | 55 |
| <b>Abbildung 16</b> Mausfibroblasten L929 mit Gel aus Gruppe 7 nach Trypanblau-Färbung; abgekugelte, tote Zellen.....   | 56 |
| <b>Abbildung 17</b> Mausfibroblasten L929 mit Gel aus Gruppe 8.; direct contact Test; nach Trypanblau-Färbung; insgesamt viele vitale, wenig tote Zellen a) hohe Zelldichte am Rand des wells; b) geringere Zelldichte im Zentrum des wells .....   | 57 |
| <b>Abbildung 18</b> modifizierter direct contact test mit Gel aus Gruppe 9 a) Gel pur nach 1 h, anfangs pH 6,8 b) Gel nach 1 h, anfangs titriert auf pH 7,4 c) Gel nach 1 h, anfangs titriert auf pH 7,4 und 1:1 verdünnt mit Medium d) Gel nach 24 h, anfangs pH 6,8, nach Trypanblau-Färbung e) Gel nach 24 h, anfangs titriert auf pH 7,4, nach Trypanblau-Färbung f) Gel nach 24 h, anfangs titriert auf pH 7,4 1:1 verdünnt mit Medium nach Trypanblau-Färbung.....  | 59 |
| <b>Abbildung 19</b> Apoptosefigur; Mausfibroblast L929 im direct contact test mit Gel aus Gruppe 14.....  | 62 |
| <b>Abbildung 20</b> modifizierter direct contact test mit Gel aus Gruppe 14 a) Gel pur nach 1h, anfangs pH 6,8; geringes Zellwachstum b) Gel nach 1h, anfangs titriert auf pH 7,4; geringes Zellwachstum c) Gel nach 1h, anfangs titriert auf pH 7,4 und 1:1 verdünnt mit Medium mäßiges Zellwachstum d) Gel nach 24h, anfangs pH 6,8, nach Trypanblau-Färbung; starker Zelltod e) Gel nach 24h, anfangs titriert auf pH 7,4, nach Trypanblau-Färbung; starker Zelltod f) Gel nach 24h, anfangs titriert auf pH 7,4 1:1 verdünnt mit Medium nach Trypanblau-Färbung; geringer Zelltod ..... | 63 |
| <b>Abbildung 21</b> Beobachtungen 2 h nach Beginn des direct contact Tests; nach Trypanblau-Färbung; mikroskopisch keine Veränderung der Zellmorphologie nachweisbar a) Gel aus Gruppe 15 mit Mausfibroblasten L929 b) Kontrolle (nur Medium, kein Gel) .....   | 64 |
| <b>Abbildung 22</b> Beobachtungen 24 h nach Beginn des direct contact tests a)-c) Gel aus Gruppe 15 mit Mausfibroblasten L929: üppige Zellproliferation schwimmend auf dem Gel d)-f) Kontrolle mit Mausfibroblasten L929 ohne Gel: üppige Zellproliferation am Boden des wells.....   | 65 |
| <b>Abbildung 23:</b> Beobachtungen 4 Tage nach Beginn des direct contact tests a)-c) Gel aus Gruppe 15 mit Mausfibroblasten L929: üppige Zellproliferation schwimmend auf dem Gel d)-f) Kontrolle mit Mausfibroblasten L929 ohne Gel; üppige Zellproliferation am Boden des wells c)+f) nach Trypanblau-Färbung: vereinzelt abgestorbene Zellen .....   | 66 |

**Abbildung 24** Beobachtungen 4 Tage nach Beginn des direct contact Tests a) Kontrolle (nur Medium, kein Gel); üppiges Zellwachstum b) Gel aus Gruppe 16 mit Mausfibroblasten L929; kein Zellwachstum ..... 67

**Abbildung 25** Ansatz: Gel pur; Alle untersuchten Gele sind in purer Form zytotoxisch, da die growth inhibition > 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Mittelwert aus: Gruppe 4 (n=16); Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=34); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8)..... 71

**Abbildung 26** Ansatz: Gel mit Medium überschichtet; Alle untersuchten Gele sind mit Medium überschichtet zytotoxisch, da die growth inhibition > 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Gruppe 4\*: Der Ansatz „Gel mit Medium überschichtet“ wurde mit dieser Gelgruppe nicht durchgeführt ; Mittelwert aus: Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=31); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8)..... 72

**Abbildung 27** Ansatz: 30% Gel; Alle untersuchten Gele mit Ausnahme von Gruppe 8 sind in 30 %iger Verdünnung zytotoxisch, da die growth inhibition > 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Mittelwert aus: Gruppe 4 (n=16); Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=34); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8) ..... 73

**Abbildung 28** Ansatz: 10 % Gel; Alle untersuchten Gele mit Ausnahme von Gruppe 4 sind in 10%iger Verdünnung nicht mehr zytotoxisch, da die growth inhibition < 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Mittelwert aus: Gruppe 4 (n=16); Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=34); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8) ..... 74

**Abbildung 29** Ansatz: 3 % Gel; Alle untersuchten Gele sind in 3%iger Verdünnung nicht mehr zytotoxisch, da die growth inhibition < 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Mittelwert aus: Gruppe 4 (n=16); Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=34); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8) ..... 75

**Abbildung 30** Ansatz: 1 % Gel; Alle untersuchten Gele sind in 1%iger Verdünnung nicht mehr zytotoxisch, da die growth inhibition < 30 % beträgt; Sind Versuche innerhalb einer Gelgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden, sind die Ergebnisse in einer anderen Farbe kodiert; Mittelwert aus: Gruppe 4 (n=16); Gruppe 5 (n=24); Gruppe 6 (n=34); Gruppe 7 (n=32); Gruppe 8 (n=8); Gruppe 9 (n=8); Gruppe 11 (n=7); Gruppe 14 (n=8); Gruppe 16 (n=8) ..... 76

**Abbildung 31** Gel aus Gruppe 4; 40x; Toxische Reaktion der Netzhaut in Form von Desintegration v.a. der inneren Netzhautschichten ..... 78

- Abbildung 32** 20x; gut erhaltene Zytoarchitektur und intakte Netzhautmorphologie in Tests mit Gelen, deren pH-Wert und Osmolarität im physiologischen Bereich lagen (Gel aus Gruppe 15); aufgelockerte Nervenfaserschicht als Artefakt durch die Präparation..... 78
- Abbildung 33** Präparat in Perfusionskammer. Nach Ablauf der Perfusionskultur ist das Gel der Gruppe 15 noch auf der Netzhaut nachweisbar (gut sichtbar durch Luftblase im Gel) ..... 79

## 10 Tabellenverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabelle 1</b> Overview of the main vitreous tamponade agents and substitutes used in clinical practice (human patients) (modifiziert nach (Baino 2011)).....         | 14  |
| <b>Tabelle 2</b> Experimental polymers for vitreous substitution (modifiziert nach (Baino 2011)).....   | 23  |
| <b>Tabelle 3</b> Beurteilung der Testsubstanz (= Gel) im direct contact test.....   | 36  |
| <b>Tabelle 4</b> Beurteilung des Zellwachstums im direct contact test.....  | 36  |
| <b>Tabelle 5</b> Beurteilung des Zelltods im direct contact test.....   | 37  |
| <b>Tabelle 6</b> Beurteilung der Zelllokalisierung im direct contact test.....  | 37  |
| <b>Tabelle 7</b> Versuchsaufbau der Variante des direct contact tests (schematisch): 12-well-Platte mit Gelen, welche auf unterschiedliche pH-Werte titriert wurden ... | 38  |
| <b>Tabelle 8</b> Übersicht über die durchgeführten Versuche .....   | 47  |
| <b>Tabelle 9</b> Ergebnisse der direct contact tests .....  | 69  |
| <b>Tabelle 10</b> absteigende Alkoholreihe bei HE-Färbung.....  | 113 |
| <b>Tabelle 11</b> Abfolge der Färbung .....   | 114 |

# 11 Anhang

## 11.1 Material

### 11.1.1 Bedarf für Handling-Versuche

| Material   | Hersteller                          | Zusatzinformation                        |
|--|-------------------------------------|--|
| BSS intraokuläre<br>Spülflüssigkeit                    | AriTec                              |  |
| Magnetstäbchen<br>IKAFLON®                             | IKA, Staufen,<br>Germany            |  |
| Elektronische<br>Präzisionswaage Kern<br>EW/EG-(N)/EWB | Kern & Sohn GmbH,<br>Balingen       |  |
| Wärmeplatte<br>Medax Typ 12501                         | Nagel GmbH, Kiehl                   |  |
| Injektionskanülen<br>Sterican®                         | B. Braun Melsungen<br>AG, Melsungen | 20G, 21G, 22G, 27G                       |
| Färbemittel<br>Brilliant Peel                          | FLUORON GmbH,<br>Neu-Ulm            | steril,<br>für intraokuläre<br>Anwendung |

### 11.1.2 Allgemeiner Zellkulturbedarf

| Material  | Hersteller   | Zusatzinformation  |
|---|--|--|
| Pipettierhilfe<br>Eppendorf Easypet®<br>4421                  | Eppendorf AG,<br>Hamburg                               |  |
| Pasteurpipetten<br>Sarstedt Serological<br>Pipette            | Sarstedt<br>Aktiengesellschaft &<br>Co., Nümbrecht     | 5ml, 10ml  |
| Eppendorf Research  | Eppendorf AG,<br>Hamburg                               | 10µl, 100 µl, 1000 µl                                    |
| Zellkulturflaschen<br>Tissue Culture Flask                    | Sarstedt, Inc., Newton                                 | T25, T75, sterile  |
| DMEM Dulbecco's<br>Modified Eagle Medium                      | GIBCO® invitrogen™                                     | +4,5g/L Glucose, +L-<br>Glutamine, -Pyruvate,<br>sterile |
| Fetales Kälberserum   | PAA Laboratories<br>GmbH, Austria                      |  |
| Penicillin/Streptomycin                                       | PAA Laboratories<br>GmbH, Austria                      | 100x   |
| Wasserbad GFL 1003  | GFL Gesellschaft für<br>Labortechnik mbH,<br>Burgwedel |  |
| Sterilbank<br>Hera safe Typ KS18                              | Thermo Electron LED<br>GmbH, Langenselbold             |  |
| CO <sub>2</sub> Inkubator 5% CO <sub>2</sub><br>HERAcell® 150 | Thermo Electron LED<br>GmbH, Langenselbold             |  |
| Trypsin   | PAA Laboratories<br>GmbH, Austria                      |  |
| Zentrifugationsröhrchen<br>cellstar tubes                     | Greiner Bio-One<br>GmbH, Frickenhausen                 | 15ml, sterile  |

|   |  |  |
|---|--|--|
| Centrifuge 5702                         | Eppendorf AG,<br>Hamburg                                 |  |
| Neubauer Zählkammer                     | Superior Marienfeld                                      | Tiefe: 0,100mm;<br>0,0025mm <sup>2</sup> |
| Dulbecco's PBS                          | PAA Laboratories<br>GmbH, Austria                        | without Ca &Mg                           |
| UltraLow Temperature<br>Freezer         | SANYO Electric., Ltd.<br>Moriguchi City, Osaka,<br>Japan | MDF - 192                                |
| Lichtmikroskop<br>Zeiss Axiovert 40 CFL | Carl Zeiss Micro<br>Imaging GmbH,<br>Göttingen           |  |

### 11.1.3 Zusätzlicher Bedarf für direct contact test

| Material                                  | Hersteller   | Zusatzinformation |
|---|--|-------------------|
| 12 well culture plate<br>TC-Plate 12 well | Cellstar®, Greiner bio-<br>one                           | steril            |
| Glasplättchen                             |  | steril            |
| Multipette® plus                          | Eppendorf AG,<br>Hamburg                                 |                   |
| Trypanblau-Lösung                         | Fluka® Analytical<br>Sigma-Aldrich Chemie<br>GmbH, Buchs | 250ml             |
| Einmalpipetten                            |  |                   |
| Digitalkamera Power<br>Shot A650 IS       | Canon Inc., Tokyo  |                   |
| pH Indikatorpapier<br>Neutralit®          | Merck KgaA,<br>Darmstadt                                 |                   |

#### 11.1.4 Zusätzlicher Bedarf für „test with liquid extract from the test material“

| Material  | Hersteller  | Zusatzinformation |
|---|---|-------------------|
| 96 well tissue culture plate<br>Microtest™  | Becton Dickinson<br>Labware, USA  | sterile           |
| Multipette® plus  | Eppendorf AG,<br>Hamburg  |                   |
| NaCl  |   | 0,9%, steril      |
| DMSO  | Sigma   | 5%, 10%, steril   |
| Mitochondrien-Viabilitäts-Test:<br>EZ4U Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay<br>10x96t | BIOMEDICA<br>Medizinprodukte GmbH & Co KG,<br>Divischgasse 4,<br>A-1210 Vienna, Austria |                   |
| Mikrititerplatten-Photometer ASYS CE<br>Modell: Expert plus                                 | ASYS Hightech GmbH,<br>Austria  |                   |

#### 11.1.5 Zusätzlicher Bedarf für erweiterte Biokompatibilitätstests

| Material                                     | Hersteller                               | Zusatzinformation |
|--|--|-------------------|
| Enukleationsschere                           |  |                   |
| Gezahnte Pinzette                            |  |                   |
| Kolibri Pinzette                             |  |                   |
| Einwegskalpell<br>Feather Disposable Scalpel | PFM Produkte für die<br>Medizin AG, Köln | sterile           |
| Mullkompressen                               | Paul Hartmann AG,<br>Heidenheim          | sterile           |

|   |   |                |
|---|---|----------------|
| Tupferstäbchen Proopta  | Lohmann und Rauscher  |                |
| Gewebeträger  |   |                |
| Petrischale   | Greiner bio one   |                |
| Perfusionskammer  | Minucells Bad Abbach  |                |
| Glasflaschen (500ml Schottflaschen)                               |   |                |
| Silikonschläuche  | Novo direct   |                |
| Sterilfilter  | Omnilab   | 0,2 µm         |
| Peristaltikpumpe<br>ISMATEC IPC Typ ISM 932                       | Ismatec SA,<br>LabortechnikAnalytik,<br>Glattbrugg - Zürich |                |
| Wärmeplatte<br>Medax Typ 12501                                    | Nagel GmbH, Kiehl   |                |
| Einbettkassetten  | Roth Rotilabo®  |                |
| Paraformaldehyd   |   | 4%             |
| Zellulose regeneratfaser-<br>gewebe                               |   | Ca 3cm x 1,5cm |
| Rasierklinge  |   |                |
| Paraffinblock   |   |                |
| Paraffinstreckbad<br>Tissue Float Bath Typ 1052                   | GFL Gesellschaft für<br>Labortechnik mbH,<br>Burgwedel      |                |
| Mikrotom<br>pfm slide 4003 E<br>Schlittenmikrotom<br>elektronisch | Pfm Produkte für die<br>Medizin AG, Köln                    |                |
| Objektträger  |   |                |
| Farblösung<br>Mayer's Hämatoxylin                                 | Sigma   |                |

|                              |  |  |
|------------------------------|--|--|
| Farblösung<br>Eosin          | Sigma  |  |
| Xylol Pharm. Helv. VI        | Hedinger Stuttgart                               |  |
| Ethanol absolut 99,8%        |  |  |
| Lichtmikroskop Axiostar plus | Carl Zeiss Micro<br>Imaging GmbH,<br>Göttingen   |  |
| Fußschaltpult                | Carl Zeiss<br>Chirurgische Geräte,<br>Oberkochen |  |
| OP-Mikroskop                 | Carl Zeiss Surgical<br>GmbH, Oberkochen          |  |

## 11.2 Methoden

### 11.2.1 Auftauen von Zellen

Die bei -80°C gelagerten Zellen (1 mio Zellen pro Kryoröhrchen) werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Unter der Sterilbank werden die Zellen zügig mit einer Pipette in eine 75ml Kulturflasche mit 10 ml Kulturmedium gegeben. Die Zellen werden bei 37°C im CO<sub>2</sub> Inkubator gelagert. Ein Mediumwechsel ist nach 24 h erforderlich, um die Zellen von dem Gefriermedium (10 % DMSO, 40 % FCS, 50 % DMEM) zu befreien.

### 11.2.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Mausfibroblasten L929 stammen von der Firma ATCC® (CCL-1 Areolar Fibroblast Mouse, NCTC clone 929). Sie weren nach Standardkulturbedingungen kultiviert.

Das Kulturmedium besteht aus 1 % Penicillin/Streptomycin, 15 % Fetalem Kälberserum (FCS) und 84 % Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Vor jedem Mediumwechsel wird mithilfe des Lichtmikroskops kontrolliert, dass die Zellen am Boden der Kulturflasche adhärent sind. Der Mediumwechsel erfolgt unter der Sterilbank. Dazu wird das Medium aus der Kulturflasche mit einer 10 ml Pasteurpipette abgesaugt und es werden 10 ml frisches Medium in die Kulturflasche gegeben. Anschließend wird die Kulturflasche wieder bei 37°C im CO<sub>2</sub> Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>) gelagert.

### **11.2.3 Passagieren von Zellen**

Haben die Zellen einen dichten Zellrasen gebildet, sind sie konfluent und können passagiert werden, d.h. auf zwei Kulturflaschen aufgesplittet werden. Dazu werden die Zellen zunächst mit sterilem PBS-Puffer (pH 7,4) gespült. Anschließend wird 1ml Trypsin auf den Zellrasen gegeben, welches durch Hin- und Her-kippen gleichmäßig auf dem Boden der Kulturflasche verteilt wird. Dann wird die Flasche in den CO<sub>2</sub> Inkubator gelegt, wo das Trypsin bei 37°C ca 3 min einwirken kann. Der Vorgang der Zellablösung wird unter dem Lichtmikroskop verfolgt. Haben sich alle Zellen vollständig vom Boden der Kulturflasche gelöst, wird der Vorgang mit der Zugabe von Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension mit einer Pipette in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Dieses wird in eine Zentrifuge gegeben und bei 1200 Umdrehungen pro Minute 5 min lang zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert. Die gewonnene Zellsuspension kann nun auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt werden, oder nach Bestimmung der Zellzahl, in 12-well- oder 96-well- Kulturplatten kultiviert werden.

### **11.2.4 Zählen von Zellen**

Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, werden unter der Sterilbank in einer Petrischale 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung gemischt. 10 µl dieser Mischung werden mit einer Pipette in die

Neubauer-Zählkammer gefüllt, anschließend erfolgt die Zellzählung unter dem Lichtmikroskop. Dabei werden nur die vier großen Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Die ermittelte Zellzahl wird sowohl mit dem Faktor  $10^4$  als auch mit dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension multipliziert. Somit erhält man die Zellzahl pro  $\mu\text{l}$ .

### 11.2.5 HE-Färbung

Die 4 - 6  $\mu\text{m}$  dicken paraffinierten Schnitte müssen vor der Färbung zunächst entparaffiniert werden. Dazu durchwandern sie eine absteigende Alkoholreihe. Die genaue Abfolge dieser Reihe ist der Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10** absteigende Alkoholreihe bei HE-Färbung

| <b>Substanz</b> | <b>Verweildauer</b> |
|-----------------|---------------------|
| Xylol I         | 10 min              |
| Xylol II        | 10 min              |
| 100 % Ethanol   | 10 min              |
| 100 % Ethanol   | 10 min              |
| 90 % Ethanol    | 10 min              |
| 80 % Ethanol    | 10 min              |
| 70 % Ethanol    | 10 min              |
| Aqua dest.      | 10 min              |

Im nächsten Schritt erfolgt die eigentliche Färbung mit Mayer`s Hämatoxylin und Eosin und anschließender Fixierung mit Ethanol und Xylol. Die genaue Abfolge der Färbung ist in Tabelle 11 zusammengestellt.

**Tabelle 11** Abfolge der Färbung

| <b>Substanz</b> | <b>Verweildauer</b> |
|-----------------|---------------------|
| Hämalaun        | 15 min              |
| Aqua dest.      | 30 sec spülen       |
| Leitungswasser  | 15 min              |
| Eosin           | 30 sec – 1 min      |
| 96 % Ethanol    | 2 min               |
| 100 % Ethanol   | 5 min               |
| 100 % Ethanol   | 5 min               |
| Xylol           | 10 min              |
| Xylol           | 10 min              |

## 12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. (Lond.) Lohmann, Direktor und ärztlicher Leiter der Augenklinik des Klinikums rechts der Isar, meinem Doktorvater, danke ich für die Möglichkeit in seiner Abteilung zu promovieren und für die Überlassung des spannenden Themas. Ich bedanke mich vielmals für die fachliche Beratung und die Ermöglichung von Kongressteilnahmen, die bereichernd, motivierend und inspirierend waren.

Herrn PD Dr. Maier, leitender Oberarzt und stellvertretender Direktor, danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Forschungsgruppe und für die stets hervorragende wissenschaftliche Betreuung, sowie seinen erfahrenen, prüfenden Blick bei der Korrektur dieser Dissertation. Er hat das Gelingen dieses Projekts mit allzeit kompetenter Hilfestellung gefördert.

Großen Dank möchte ich Frau Dr. Kobuch aussprechen, die als Leiterin des Forschungslabors der Augenklinik den experimentellen Teil dieser Arbeit betreut hat. Mit ihrem reichen Erfahrungsschatz und ihrem positiven, konstruktiven Geist hat sie stets für eine fruchtbare Arbeitsatmosphäre gesorgt und Kraft ihrer kommunikativen und diplomatischen Fähigkeiten nahm sie souverän die unumgänglichen Hürden eines bundesweiten Kooperationsprojektes, in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist.

Besonders danken möchte ich auch Frau Eberl, medizinisch technische Assistentin, die mich in die Techniken der Zell- und Gewebekultur einwies, und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich fühlte mich an meinem Arbeitsplatz im Labor sehr wohl.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. rer nat Haller und Frau Kühnel für die statistische Beratung.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern für die liebevolle Begleitung während meines Studiums und während der Durchführung dieser Arbeit.

Meinen Geschwistern, meinem Partner und meinen Freunden danke ich für ihre motivierende Unterstützung und Hilfe bei computertechnischen Fragen.