

**Verwendung eines Glaskörperäquivalentes auf  
Hydrogelbasis als Medikamentenrelease für  
Dexamethason und Bevacizumab**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Müller, Karolin, geb. Adler

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Spitzer

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Der Glaskörper – Gestalt und Funktion	7
1.2 Die Vitrektomie und ihre Indikationen	8
1.3 Der Glaskörperersatz – Erwartungen und Ansprüche	9
1.4 Der Medikamentenrelease	11
1.5 Hyaluronsäure und Hydrogele	14
1.6 Dexamethason	16
1.6.1 Dexamethason im Vergleich mit Triamcinolonacetonid	17
1.6.2 Dexamethason in der Augenheilkunde	18
1.7 Bevacizumab	22
1.7.1 Bevacizumab in der Augenheilkunde	24
1.8 Ziel der Dissertation	26
<b>2. Material und Methode</b>	<b>27</b>
2.1 Material	27
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	27
2.1.2 Geräte und Gefäße	28
2.1.3 Lösungen und Verdünnungsreihen	29
2.1.4 Nährmedien	34
2.2 Methode	35
2.2.1 Herstellung von Hyaluronsäuregelen mit unterschiedlichen Dexamethasonmengen	35
2.2.2 Photometrische Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge	36
2.2.3 Erstellen von Extinktionsspektren	38
2.2.4 HPLC zur Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge	39
2.2.5 Kultivierung von ARPE 19 Zellen	40
2.2.6 Testung der biologischen Wirksamkeit des abgegebenen Dexamethason mit Hilfe des MTT – Tests	41

2.2.7 Probengewinnung und Messung	42
2.2.8 Herstellung von Hyaluronsäuregelen mit unterschiedlichen Bevacizumabmengen	43
2.2.9 Bevacizumab – ELISA zur Bestimmung der abgegebenen Menge	45
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>49</b>
3.1 Herstellung von Hyaluronsäuregelen mit unterschiedlichen Dexamethasonmengen	49
3.2 Photometrische Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge	52
3.3 Extinktionsspektren	56
3.3.1 Komponenten zur Herstellung der Gele	56
3.3.2 Umgebendes PBS	59
3.4 Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge mittels HPLC	60
3.5 Testung der biologischen Wirksamkeit des abgegebenen Dexamethason	64
3.5.1 Eichreihen	64
3.5.2 Proben	67
3.6 Herstellung von Hyaluronsäuregelen mit unterschiedlichen Bevacizumabmengen	70
3.7 Bevacizumab – ELISA zur Bestimmung der abgegebenen Menge	70
3.7.1 Proben	71
<b>4. Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1 Der Glaskörper als Medikamententräger	74
4.2 Diskussion der Ergebnisse mit Dexamethason	76
4.3 Diskussion der Ergebnisse mit Bevacizumab	81
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>84</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2HBC	2-Hydroxypropyl- $\beta$ –Cyclodextrin
5-FU	5 – Fluoruracil
ARPE-19-Zellen	Adulte retinale Pigmentepithel-19-Zellen
BSA	Bovine serum albumin
BSS	Balanced salt saline
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
d	Tag
kD	Kilodalton
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
GMHA-Konjugate	Glycidymethacrylaten-Hyaluronsäure-Konjugate
g	Gramm
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
IgG	Immunglobulin G
IU	International Unit
L	Liter
$\mu$ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
$\mu$ l	Mikroliter
ml	Milliliter
$\mu$ M	Mikromol
$\mu$ m	Mikrometer
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Queckilbersäule
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid
mW	Milliwatt
nm	Nanometer

OCT	Optische Kohärenztomografie
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PVR	proliferative Vitreoretinopathie
SDS	Sodium dodecyl sulphate
RPE	Retinale Pigmentepithel Zellen
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Glaskörper – Gestalt und Funktion

Der Glaskörper (Corpus vitreum) gehört zu den mengenmäßig dominierenden Strukturen des menschlichen Auges. Seine etwa 4 ml Volumen stellen 2 /3 des Gesamtvolumens dar [Lang GK, Amann J et al. 2000]. Vereinzelt finden sich sogenannte Hyalozyten, aber insgesamt gilt der physiologische Glaskörper als weitgehend zellfrei [Eisner G. 1975, Yasukawa T et al. 2004]. Bei den Hyalozyten handelt es sich um mononukleäre Phagozyten, welche in der Glaskörperrinde einen einschichtigen Zellverband bilden. Die höchste Zelldichte findet sich im Bereich der Glaskörperbasis, gefolgt vom hinteren Pol, die geringste in der Äquatorebene [Sebag J et al. 2015].

Den Großteil macht jedoch die gelartige Extrazellulärsubstanz aus. Diese besteht zu 98% aus Wasser. 15 – 20% hiervon ist an Glucosaminoglykanen, v.a. Hyaluronsäure (HA) und Proteinen gebunden. Die Zusammensetzung der Proteine variiert. Lösliche Proteine sind vor allem Albumin und Eisen –bindende Proteine. Das vorherrschende unlösliche Protein ist Kollagen. Hierbei handelt es sich in 60 – 75% um Kollagen Typ II. [Eisner G. 1975; Sebag J. 2014]. Es ergibt sich ein Gewicht von etwa 4 g.

Der gelartige Charakter des Glaskörpers entsteht durch die dreidimensionale netzwerkartige Struktur der Kollagenfibrillen, welche von den Hyaluronsäuremolekülen verbunden werden [Sebag J. 2014]. Diese stabilisieren seine Form durch ihr hohes negatives elektrostatisches Potential [Lang GK, Amann J et al. 2000]. Die Glaskörperrinde, eine 100 – 110 µm dicke transparente Grenzschicht aus dichten lamellären Kollagenfibrillen, unterstützt die Glaskörperstruktur zusätzlich [Sebag J. 2015]. Aufgrund des Fehlens von Nerven und Gefäßen und die damit verbundene schlechte Immunabwehr ist der Glaskörper besonders anfällig für Infektionen [Lang GK, Amann J et al. 2000]. Andererseits hat dies den Vorteil, dass er durchgehend transparent ist. Um ein sekundäres Einsprossen von Gefäßen zu verhindern, besitzt der Glaskörper einen antiangiogenen Faktor [Hockwin O. 1985; Sebag J. 2014].

Zu seinen wichtigsten Funktionen gehört, besonders in der Entwicklung, die Bulbusstabilisierung und somit Formgebung des Auges. Später dient er vor allem der Stoßdämpfung sowie als Filter für Zellen [Hockwin O. 1985; Sebag J. 2014]. Da der Glaskörper mit seiner ganzen Rückfläche der Netzhaut anliegt, wirkt er außerdem einer Netzhautablösung entgegen [Eisner G. 1989].

Für diese und andere umgebende Gewebe wirkt er als extrazelluläres Medium und sorgt für die Aufrechterhaltung des retinalen Milieus [Hockwin O. 1985].

## 1.2 Die Vitrektomie und ihre Indikationen

Als Vitrektomie bezeichnet man die operative Entfernung des Glaskörpers. Oft wird im Anschluss eine Ersatzsubstanz injiziert, um die Stabilität des Bulbus aufrechtzuerhalten. Eine Vitrektomie wird durchgeführt, wenn entweder der Glaskörper selbst oder die dahinter liegende Netzhaut operativ versorgt werden muss. Zu den Erkrankungen des Glaskörpers, die eine chirurgische Intervention notwendig machen, gehören die persistierende Glaskörperblutung oder schwere Entzündungen [Eisner G. 1989]. Mögliche Erkrankungen der Netzhaut welche nach einer Vitrektomie versorgt werden sind zum Beispiel die Netzhautablösung oder Netzhautforamen. Diese entstehen zum Beispiel wenn sich die vitreoretinalen Adhäsionen bei einer Glaskörperabhebung nicht ausreichend lösen oder bei der proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) [Eisner G. 1989; Cheema RA et al. 2007; Zhang X et al. 2015; Arroyo JG et al. 2015; Sebag J. 2015]. Hier kommt es zum Beispiel nach einer Verletzung der Retina zu einer Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Zellen wie Retinale Pigmentepithelzellen (RPE), Astrozyten, Fibroblasten und Makrophagen, Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und Produktion von Matrixproteinen. In der zweiten proliferativen Phase bilden sich fibrotische Membranen auf, unter oder innerhalb der Netzhaut. So kann es bei Augenbewegungen zu einem Zug auf die Netzhaut und somit zu Faltenbildung bis hin zur Ablösung oder Rissen bzw. Löchern, sogenannten Netzhautforamen, kommen [Eisner G. 1989; Xi L et al. 2014; Zhang X et al. 2015; Sebag J. 2015].

Die PVR tritt auch häufiger postoperativ auf und verhindert dann eine chirurgische Wiederanlage der Retina. Literaturangaben zur Häufigkeit schwanken zwischen 7 und 55%. Neueste Studien sprechen von etwa 8 – 10% postoperativer PVR [Cheema RA et al. 2007; Sadaka A, Giuliari GP. 2012; Feltgen N, Walter P. 2014; Xi L et al. 2014; Zhang X et al. 2015].

Am häufigsten wird die Pars – Plana – Vitrektomie durchgeführt, da hierbei die Gefahr einer artifiziellen Netzhautablösung am geringsten ist [Lang GK, Amann J et al. 2000]. Dabei werden über drei Zugänge das Saugschneidegerät, das sogenannte Vitrektom zur stückweisen Entfernung des Glaskörpers, die Infusion zur Aufrechterhaltung des intraokulären Drucks und die Lichtquelle in das Auge geführt. Nachdem der Glaskörper entfernt worden ist kann die Netzhaut behandelt werden [Lang GK, Amann J et al. 2000; Arroyo JG et al. 2015]. Nach der therapeutischen Intervention wird ein Glaskörperersatz ins Auge gegeben [Joussen AM, Kirchhof B et al. 2007]. Die unerwünschten Folgen des Eingriffs sind vor allem die Linsentrübung. Diese tritt innerhalb eines Jahres in 77% der Fälle auf. Seltener kann es in bis zu 17% zur Bildung von Netzhautforamen, bei etwa 1% zu Blutung, Druckveränderungen oder einer Endophthalmitis kommen [Lang GK, Amann J et al. 2000; Feltgen N, Walter P. 2014; Arroyo JG et al. 2015].

### 1.3 Der Glaskörperersatz – Erwartungen und Ansprüche

Grundsätzlich ist der Glaskörper nicht lebensnotwendig und das Auge erfüllt auch ohne ihn seine Funktion. Nach einer Vitrektomie ohne Glaskörperersatz wird der Bulbus im Laufe einiger Wochen vom Körper mit Kammerwasser gefüllt. Um die Zeit dazwischen zu überbrücken und die Heilung sowie das Sehen zu verbessern, werden am Ende der Operation stabilisierende Materialien eingesetzt [Lang GK, Amann J et al. 2000].

Die Vielfältigkeit des Glaskörpers wird durch die Ansprüche, die an einen Glaskörperersatz gestellt werden, deutlich. Sehr wichtig ist eine gute Endotamponade mit starker Andruckkraft der Netzhaut und Reduktion des

Blutungsrisikos durch Kompression. Wichtige Eigenschaften hierfür sind neben der Materialviskosität die Oberflächen – bzw. Grenzflächenspannung sowie der Auftriebsvektor. Zusätzlich soll der Glaskörperersatz günstige rheologische Eigenschaften in Bezug auf Viskosität und Plastizität haben [Szurman P, Frank C et al. 2009].

Um eine erneute Operation zur Entfernung zu umgehen, wäre ein inertes, bioverträgliches, abbaubares Material, welches eine lange Verweildauer ermöglicht, erstrebenswert. Eine gute Kohäsivität, natürlich die Transparenz, Refraktionsstabilität und eine metabolische Zirkulation mit Kompartimentierung sind Voraussetzungen [Szurman P, Frank C et al. 2009]. Praktische Aspekte wie eine leichte Verfügbarkeit, Sterilität und die Möglichkeit der Lagerung sollen nicht vernachlässigt werden [Hockwin O. 1985]. Aus chirurgischer Sicht perfekt wäre ein Glaskörperersatz anzusehen, der zusätzlich als Medikamententräger für neuroprotektive und antiproliferative Substanzen fungiert.

Diese Eigenschaft ist besonders erstrebenswert, da in 75% der Fälle, bei welchen die Therapie durch primäre Vitrektomie nicht gelingt, traktive Proliferationen, welche wie in 1.2 beschrieben zu PVR führen, Probleme machen [Wu WC, Kao YH, Hu DN. 2002; Szurman P, Frank C et al. 2009; Sadaka A, Giuliari GP 2012].

Die ideale Substanz wurde noch nicht gefunden. Bei unkomplizierten Indikationen wie einer Glaskörperblutung genügt es, das Auge nach der Vitrektomie mit Ringerlösung zu füllen. Bei schwerwiegenderen Erkrankungen, insbesondere bei Netzhautablösungen, benötigt man jedoch Materialien mit besserer Endotamponade. Hierzu gehören synthetische expansive Gasgemische bestehend aus Luft und Schwefelhexafluorid, Perfluorkarbone und Silikonöl, das am häufigsten verwendete Material [Lang GK, Amann J et al. 2000; Spitzer MS et al. 2009].

## 1.4 Der Medikamentenrelease

Besonders zur Behandlung der PVR erscheint eine Kombination aus chirurgischer Vitrektomie und adjuvanter antiproliferativer Therapie z.B. mit Kortison erstrebenswert [Szurman P, Frank C et al. 2009].

Hierbei besitzt die orale Therapie einen geringen Stellenwert, da durch die Blut – Retina – Schranke nur geringe Mengen an Wirksubstanz zur Retina gelangen und daneben systemische Nebenwirkungen der antiproliferativen Medikamente wie Cushing – Symptome, Knochenmarksuppression, Infektionen, avaskuläre Nekrosen, peptische Ulzera, Psychosen, arterielle Hypertonie, Hyperglykämie und Osteopenie auftreten können [Cheng CK et al. 1995; Brumm MV, Nguyen QD. 2007].

Bei der lokalen Behandlung, beispielsweise durch Augentropfen gibt es ebenfalls Barrieren wie die Kornea oder die Sklera. Zusätzlich wird hier das Medikament durch den andauernden Tränenfilm teilweise ohne oder mit nur geringem Effekt abtransportiert [Yasukawa T et al. 2005].

Eine direkte Platzierung im Bereich der Retina, zum Beispiel im Glaskörper, wäre deshalb von Vorteil. Für Erkrankungen wie die Cytomegalovirusretinitis oder die posteriore Uveitis wird eine Therapie mit Hilfe von intraokularen Injektionen eingesetzt [Yasukawa T et al. 2005]. Die Halbwertszeit der meisten Medikamente im Auge ist jedoch mit einigen Stunden viel zu kurz, sodass keine ausreichende Wirkung erzielt werden kann. Vor allem bei einer direkten Injektion stellt diese geringe Halbwertszeit ein Problem dar [Guidetti B et al. 2008]. Zusätzlich kann es bei wiederholter Injektion zu Nebenwirkungen wie Linsenverletzungen, Glaskörperblutung, Netzhautablösung oder Endophthalmitis kommen [Wang C et al. 2014].

Dies ist ein erhoffter Vorteil des Release – Ansatzes. Hierbei geben Medikamententräger über einen längeren Zeitraum kleinere Medikamentenmengen in einer annähernd konstanten Konzentration an die Umgebung ab, auf welche sie wirken sollen. Diese Medikamententräger werden im Auge subretinal, intraskleral, im Glaskörperraum, peribulbär oder an der Pars Plana deponiert [Yasukawa T et al. 2005].

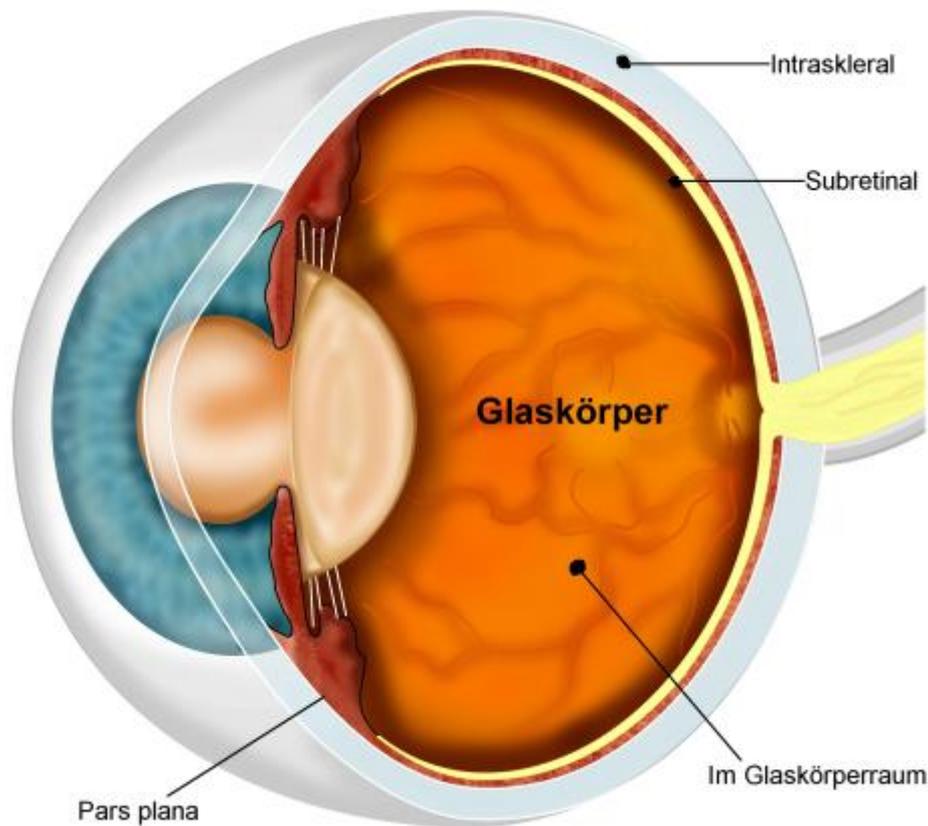


Abb. 1: *Mögliche Positionen zur Platzierung von Medikamententrägern.*  
*[Bildgrundlage Schematischer Glaskörper Hofer R. UKT Tübingen]*

Recht neu ist die Nutzung des Glaskörperersatzes als Depotmedium. Vorteile sind, dass nach einer Vitrektomie keine zusätzliche Operation bzw. Intervention notwendig ist, eine gleichmäßige Verteilung stattfindet, eventuell toxische Wirkungen wie beispielsweise von 5 – Fluoruracil (5-FU) durch die geringen abgegebenen Mengen stark reduziert werden und diese Mengen relativ gut steuerbar sind [Szurman P, Frank C et al. 2009]. Auch kann nach der Vitrektomie von einer sehr zeitnahen Wirkung ausgegangen werden [Berger AS, Cheng CK et al. 1996]. Möglich und sinnvoll ist der Einsatz als Medikamententräger bei allen Ersatzsubstanzen. Die Fähigkeit zur langsamen Abgabe ist jedoch unterschiedlich ausgeprägt [Szurman P, Frank C et al. 2009].

Zwischen Silikonöl und den meisten Medikamenten besteht eine schlechte Affinität [Araiz JJ et al. 1993].

Es findet eine Kumulation unter der Ölblase statt, wodurch an dieser Stelle die Konzentration und somit auch die Toxizität erhöht werden, da die meisten antiproliferativen Medikamente intraokular eine geringe therapeutische Breite haben [Araiz JJ et al. 1993; Szurman P, Frank C et al. 2009]. Als Beispiel wird eine Triamcinolon – Suspension beim Einbringen in Silikonöl durch Kumulation über die Löslichkeitsgrenze aufkonzentriert. Hierdurch bilden sich Kristalle, welche bei Kontakt mit der Netzhaut die apikalen Mikrovilli und die Zellmembran der retinalen Ganglienzellen zerstören [Spitzer MS et al. 2009]. Eine Ausnahme bilden dabei lipophile Medikamente wie Retinolsäure. Diese löst sich sehr gut in Silikonöl und verliert dadurch ihre toxische Wirkung [Araiz JJ et al. 1993].

Da viele Medikamente, die in der Augenheilkunde zum Einsatz kommen, wasserlöslich sind, wäre ein hydrophiler Glaskörperersatz als Medikamentenreleasesystem besser geeignet. Hier gibt es Versuche mit sogenannten Hydrogelen. Von Vorteil ist vor allem, dass sie sich sehr erfolgreich mit Medikamenten wie Gentamycinsulfat oder Dexamethason beladen lassen [Kelly RM et al. 1999; Spitzer MS et al. 2008].

Zu möglichen Ansätzen der Medikamentenwirkung zählen Modulation der Blut – Retina – Schrankenstörung, der Zellaktivierung, der Zellproliferation, der Fibrinbildung, der Bildung der Extrazellulärmatrix und der Membrankontraktion [Szurman P, Frank C et al. 2009]. Zu den Medikamenten, die bei der Behandlung der diabetischen Retinopathie eingesetzt werden, zählen unter anderem Kortikosteroide und Antagonisten des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) [Schwartz SG, Flynn HW Jr. 2007].

## 1.5 Hyaluronsäure und Hydrogele

Zur Herstellung der in 1.4 erwähnten Hydrogele eignet sich als natürliches Material Hyaluronsäure (HA), da sie wie in 1.1 beschrieben ein wichtiger Bestandteil des physiologischen Glaskörpers ist [Lang GK, Amann J et al. 2000; Sebag J. 2014]. Zu den Vorteilen zählen ihre Wasserlöslichkeit sowie die Möglichkeit des biologischen Abbaus [Miyazaki T et al. 2001; Hahn SK et al. 2004].

Aufgrund ihres verbreiteten natürlichen Vorkommens ist die extern zugegebene HA gut biokompatibel und wird sehr wenig von Zellen besiedelt [Hahn SK et al. 2004]. HA ist ein natürliches lineares Polysaccharid aus der Gruppe der Glycosaminoglycane, bestehend aus abwechselnd D – glucuronsäure und N – acetyl – D – glucosamin mit einer  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) Bindung [Hockwin O. 1985; Fraser JR et al. 1997].

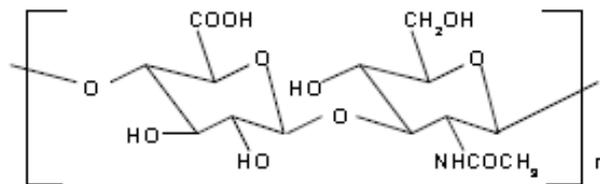


Abb. 2: Strukturformel des Polysaccharids Hyaluronsäure

Das Hyaluronsäuremolekül besitzt drei physiologisch bedeutsame Bindungsstellen. Die Erste ist eine Verbindung mit der Zelloberfläche, wodurch es zu Zellveränderungen wie Zelldifferenzierung, Proliferation, Aggregation und Verbesserung der Zellbeweglichkeit kommen kann [Fraser JR et al. 1997; Miyazaki T et al. 2001; Hahn SK et al. 2004]. Des Weiteren besitzt es eine Bindungsstelle zu anderen Matrixkomponenten, vor allem zu Proteoglykanen. Dies trägt zur Stabilisation der Gewebe bei und dient der Verteilung der Plasmaproteine. Die Dritte ist eine variable Bindungsstelle [Fraser JR et al. 1997]. Trotz der Bindungsmöglichkeiten bleibt die HA in Gewebsflüssigkeiten frei. In der Haut und im Glaskörper ist sie an Matrixfäden gebunden. Dort hilft sie beispielsweise bei der Wundheilung und durch ihre Filtereigenschaften

[Fraser JR et al. 1997]. Im Glaskörper hat HA durch die hohe Viskosität und Viskoelastizität zusätzlich eine schützende, stoßdämpfende und strukturstabilisierende Wirkung [Hockwin O. 1985; Sebag J. 2014]. Diese ist auch für einen Glaskörperersatz wichtig. Hierzu werden aus Hyaluronsäuren und Hyaluronsäurederivaten Gellösungen mit unterschiedlicher Viskosität und Schwere hergestellt. Enzymreaktionen führen zur Verflüssigung und somit zu einem schnellen biologischen Abbau innerhalb von 7 – 14 Tagen [Spitzer MS, Yoeruek E et al. 2008].

Dadurch wird dem Patienten ein zweiter Eingriff zur Entfernung des verabreichten Glaskörperersatzes erspart [Kiernan DF, Mieler WF. 2009].

Die Tamponade wird bei diesen Hydrogelen durch das Zusammenwirken von Viskosität, Kohäsivität und osmotischem Quelldruck erzielt. Da es sich um einen hydrophilen Glaskörperersatz handelt, ist eine homogene Andruckkraft im oberen und unteren Bereich der Netzhaut gewährleistet [Szurman P, Frank C et al. 2009]. Auch bietet der hydrophile Charakter eine gute Voraussetzung zum Einsatz als Medikamententräger. Hydrophile Substanzen wie Dexamethason können diesem Glaskörperersatz zugegeben werden. Hydrogel besitzt einen wasserähnlichen refraktiven Index sowie eine gute optische Transparenz. Den erforderlichen Quelldruck gewährleistet die starke Wasserbindung der polyanionischen Makromoleküle, ähnlich den natürlichen Verhältnissen im Glaskörper [Szurman P, Frank C et al. 2009].

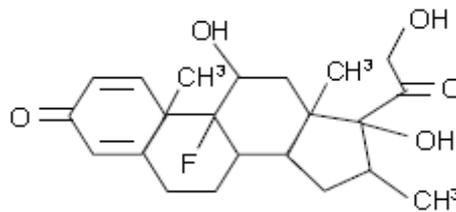
Zwei Gele, das Healon aus 1% und das Healon 5 aus 2,3% Natriumhyaluronat werden bereits kommerziell hergestellt. Das Auftreten von Nebenwirkungen durch Hydrogele beschränkt sich bis jetzt auf Druckspitzen. Sonst konnten noch keine nennenswerten unerwünschten Wirkungen beobachtet werden [Spitzer MS, Yoeruek E et al. 2008].

Im Gegenteil, es besteht eine gute Toleranz und im Regelfall keinerlei Entzündungsreaktion [Spitzer MS, Yoeruek E et al. 2008]. Es konnte sogar eine Reduktion der sterilen Endophthalmitis beobachtet werden [Lee SS, Robinson MR. 2009]. Durch Bestrahlung mit UV – Licht lässt sich HA quervernetzen. Dadurch kann ein stabiles quervernetztes klares Gel hergestellt werden [Frank C. 2010].

## 1.6 Dexamethason

Dexamethason ist ein hydrophiles Glukokortikoid, welches eine 75-mal höhere antiproliferative Wirkung besitzt als Kortikosteron [Machemer R et al. 1979].

Sie wird als höchste bekannte relative Wirkung betrachtet [Kiernan DF, Mieler WF. 2009].



**Abb. 3:** Strukturformel des Glukokortikoids Dexamethason. Man erkennt an den doppelt gebundenen Sauerstoffatomen und den OH – Gruppen den hydrophilen Charakter.

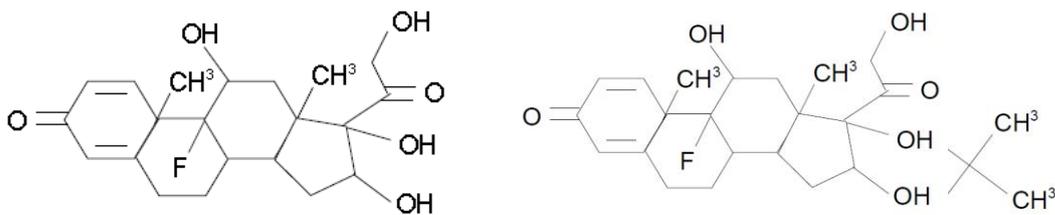
Häufig wird Dexamethason in Verbindungen als Dexamethasonphosphat oder Dexamethasonalkohol verwendet. Die Verträglichkeit für das Auge scheint sehr gut zu sein. Nebenwirkungen wie Glaukom und Katarakt treten seltener auf als bei anderen Kortikosteroiden [Kiernan DF, Mieler WF. 2009]. Die biologische Halbwertszeit im Auge ist mit 3,48- 5,5 Stunden sehr kurz [Cheng Ck et al. 1995; Wang C et al. 2014].

Neben der antiproliferativen Wirkung hat Dexamethason auch über die Beeinflussung von VEGF und des Gefäßwachstumsfaktor (Angiogenic Growth Factor) eine entzündungshemmende Wirkung [Kiernan DF, Mieler WF. 2009; Medeiros MD, Postorino M et al. 2014]. Dies ist eine Eigenschaft, die es mit allen Kortikosteroiden teilt, genau wie die Fähigkeit, die Blut – Retina – Schranke zu stabilisieren. [Cheng Ck et al. 1995].

### 1.6.1 Dexamethason im Vergleich mit Triamcinolonacetonid

Wegen seines geringen Löslichkeitsgleichgewichts von  $82 \mu\text{M}$  ( $36 \mu\text{g/ml}$ ) wurde Triamcinolonacetonid in den 1990ern gern als sogenanntes Kenalog 40<sup>TM</sup> im off-label Gebrauch nach einer Operation der PVR als Depotpräparat injiziert. Dadurch wurden postoperative Komplikationen, vor allem das Makulaödem, reduziert [Szurman P, Frank C et al. 2009]. Triamcinolonacetonid ist ein weiteres wichtiges Glukokortikoid und gleichzeitig Mineralkortikoid.

Hierbei handelt es sich um ein lipophiles Derivat von Triamcinolon, welches meist in Form von Kristallen vorliegt. Im Auge zeigt die kristalline Form eine verlängerte Halbwertszeit [Kiernan DF, Mieler WF. 2009].



**Abb. 4:** *Triamcinolon (li) und sein lipophiles Derivat Triamcinolonacetonid (re). Durch den Verlust der freien OH – Gruppen ist es so gut wie nicht wasserlöslich. In wässrigem Milieu bildet es Kristalle.*

Nach einer Injektion von  $0,3 \text{ mg}/0,1 \text{ ml}$  Triamcinolonacetonid im Versuch mit Kaninchenaugen betrug die Halbwertszeit nach Vitrektomie 1,57 Tage und ohne Vitrektomie 2,89 Tage, was ein Vielfaches der Verweildauer von Dexamethason bedeutet [Guidetti B et al. 2008]. Triamcinolon wirkt ebenfalls antiproliferativ, wenn auch etwa fünfmal geringer als Dexamethason [Szurman P, Frank C et al. 2009; Kiernan DF, Mieler WF. 2009; Wang C et al. 2014]. Triamcinolonacetonid ist nicht zytotoxisch, solange die Kristalle keinen direkten Kontakt mit den Zellen haben. Besteht jedoch ein direkter Kontakt, kommt es bereits ab einer Konzentration von  $57,9 \mu\text{g/ml}$  zu einem schnell voranschreitenden, dosisabhängigen Zelltod der Gliazellen [Szurman P et al.

2006]. Da die Toxizität in vivo weniger zu beobachten ist als in vitro, wurde geschlossen, dass es einen Schutzmechanismus geben muss. Eine Bestätigung hierfür zeigte der Versuch mit einer Bedeckung der Zellen mit Glaskörper, bei dem keine Zellen abstarben [Szurman P et al. 2007]. Dieser Schutz des Glaskörpers fehlt jedoch nach einer Vitrektomie, weshalb man hierbei zurückhaltend mit Triamcinolon und seinen Derivaten sein sollte.

Insgesamt ist Dexamethason vor allem auf längere Sicht deutlich besser biokompatibel, was auch mit seiner besseren Wasserlöslichkeit zusammen hängt [Szurman P et al. 2006]. Bei der Behandlung mit Triamcinolonacetamid treten Nebenwirkungen wie Hypertonie mit sekundärem Offenwinkelglaukom, Netzhautablösungen, Linsenverletzungen und Glaskörperblutungen auf [Schwartz SG, Flynn HW Jr. 2007].

Durch Zugabe von Dexamethason zu Healon, einem Hydrogel, konnten Spitzer et. al. keine Änderung der Klarheit und Viskosität feststellen, während Triamcinolon darin Kristalle bildete, welche zu einer Trübung führten. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit lag die maximale Konzentration des Triamcinolon im Steady State nur bei 30 µg/ml. Vom wasserlöslichen Dexamethason konnten dagegen höhere Konzentrationen von 4 – 20 mg/ml in BSS (balanced salt saline) und phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) eingesetzt werden. Die antiproliferative Wirkung war bei dem Gel mit Dexamethason signifikant, während Triamcinolon nur schwach die Proliferation der Fibroblasten unterdrückte [Spitzer MS et al. 2008].

### 1.6.2 Dexamethason in der Augenheilkunde

Schon früh wurden Kortikosteroide am Auge angewandt [Machemer R, Sugita G, Tano Y. 1979]. Sie werden eingesetzt, um Entzündungen zu unterdrücken, Makulaödeme zu reduzieren und Gefäßneubildungen zu verhindern. Des Weiteren kommt es durch ihre Anwendung zur Verbesserung der Sehschärfe und Verringerung der Makuladicke in der OCT – Messung bei Patienten mit diabetischem Makulaödem [Kiernan DF, Mieler WF. 2009]. Durch Machemers

Publikation wurde 1979 zum ersten Mal der Glaskörper als Reservoir für intravitreale Kortikosteroide beschrieben [Machemer R, Sugita G, Tano Y. 1979]. Daraufhin begann man, Medikamente direkt in den Glaskörperraum zu injizieren und erreichte so eine hohe lokale Konzentration bei niedrigen bis fehlenden systemischen Nebenwirkungen [Szurman P, Frank C et al. 2009]. Dafür traten lokale Nebenwirkungen wie Ptosis, Lidödem, Konjunktivablutung, Hornhautödem, Glaskörperblutung, Makulaödem, Retinablutung, Hypotonie, Chemosis oder Glaskörpertrübung auf [Kiernan DF, Mieler WF. 2009].

In späteren Versuchen mit Kaninchen konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Dexamethason die Zahl der Membranen, die Zug auf die Retina ausüben, reduziert und so die traktionsbedingten Netzhautablösungen seltener wurden [Joussen AM et al. 2007]. Durch den Einsatz einer Spüllösung bestehend aus 500 ml BSS, 500 Einheiten Heparin und 2 mg Dexamethason, die während der Vitrektomie eingesetzt wurde, konnte in einer kontrollierten randomisierten Pilotstudie eine Reduktion der Proliferationsrate und eine Verringerung der Hypotonie erreicht werden. Die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Ablösung der Netzhaut wurde, verglichen mit der Referenzgruppe, um etwa 30% gesenkt [Williams RG et al. 1996]. Glaskörperblutungen traten dabei vermehrt auf, was jedoch keinen Einfluss auf das Endergebnis in Bezug auf Netzhautanlage und Visus hatte [Williams RG et al. 1996].

Auch in einem weiteren Versuch führte die Injektion einer Lösung mit 1 mg Dexamethasonalkohol in Kaninchenaugen mit provozierte Proliferation durch injizierte Fibroblasten zu einer deutlich geringeren Zahl an Netzhautablösungen (24% vs. 57% bei nur mit Fibroblasten infizierten Augen) [Machemer R, Sugita G, Tano Y. 1979]. Ein weiterer Vorteil in der Nutzung von Kortikoiden während einer Pars – Plana – Vitrektomie ist ihre Fähigkeit, die Glaskörperbasis sichtbar zu machen und so bei der Entfernung von epiretinalen Membranen hilfreich zu sein [Kiernan DF, Mieler WF. 2009].

Erprobte Formen für postoperativ eingesetzte Medikamententräger sind Stäbchen, Kugeln, Scheiben oder aufgesetzte Pfropfen [Yasukawa T et al. 2004; Guidetti B, et al. 2008]. Auch ist eine Verbindung mit Komedikamenten (= konjugierte Medikamente), bei der die festen Kristalle des einen Medikaments

als Reservoir für das lösliche Medikament dienen möglich [Guidetti B et al. 2008]. Es werden stets beide Medikamente in konstanten Konzentrationen abgegeben, was den toxischen Effekt der einzelnen Medikamente bei einer additiven Wirkung reduziert [Berger AS et al. 1996]. Es gibt bereits Ansätze mit einer Kombination von Triamcinolonsäure und 5-FU, bei der beide unabhängig voneinander über einen Monat abgegeben werden. Im Tiermodell konnte dadurch das Voranschreiten einer proliferativen Retinopathie verhindert, sowie die Inzidenz der Netzhautablösung von 89% auf 30% an Tag 14 nach der Injektion reduziert werden [Mansoor S et al. 2009]. Auch Dexamethason wurde mit 5-FU kombiniert, was eine Inhibition der traktiven Netzhautablösung von 70% auf 20% an Tag 13 nach der Injektion bewirkte [Berger AS et al. 1996].

Kuppermann et al. versuchten bereits 2007 ein intravitreales Release-System mit Dexamethason herzustellen. In einer randomisierten Studie mit Patienten mit persistierenden Makulaödemen unterschiedlicher Genese und daraus resultierendem Visusverlust zeigten sie nach 90 Tagen eine Besserung der Sehschärfe um 10 Buchstaben bei 35% der Patienten mit einem Release von 700 µg Dexamethason, bei 24% der Patienten mit 350 µg und nur 13% bei der Kontrollgruppe, die mit Laser Photokoagulation, dem Standard, behandelt wurden. Signifikant war leider auch der vermehrte Anstieg des intraokularen Drucks in der Medikamentengruppe (11% hatten einen Anstieg von mind. 10 mmHg gegen 2% der Kontrollen). Meist handelte es sich aber um vorübergehende Prozesse ohne Langzeitwirkung [Kuppermann BD et al. 2007]. Ein Vorteil beim Einsatz des Implantats besteht darin, dass es hierbei nicht, wie bei der Standardbehandlung mit Laser, zur Retinazerstörung ohne Verbesserung der Sehschärfe kommen kann [Lee SS, Robinson MR. 2009].

Ein implantierbares Präparat mit 0,59 mg Fluocinolonacetonid, genannt Retisert<sup>TM</sup> (Bausch & Lomb, Rochester, NY), hat in den USA bereits eine Zulassung für die Therapie der nicht infektiösen posterioren Uveitis [Kuno N, Fujii S 2012; Zhang X et al. 2014]. Es handelt sich um ein Implantat welches als Trägersubstanz ein nicht abbaubares Silikonelastomer besitzt, das in der Pars – Plana – Region festgenäht wird. Das Medikament wird über ungefähr 30 Monate abgegeben, wobei die zugegebene Menge für die Kinetik der Abgabe

nicht von Bedeutung ist, sondern nur die jeweils abgegebene Gesamtmenge beeinflusst. In der momentanen Konzentration beträgt die Abgabe 0,5 µg pro Tag [Brumm MV, Nguyen QD. 2007; Lee SS, Robinson MR.2009; Kiernan DF, Mieler WF. 2009; Zhang X et al. 2014]. Ebenso wie bei Iluvien™ (Alimera Sciences, Alpharetta, GA), ein ebenfalls nicht abbaubares Stäbchen haben die Patienten mit Uveitis weniger Rezidive und eine verbesserte Sehschärfe, jedoch kam es bei höheren Dosen zu einer Erhöhung des intraokularen Drucks [Kiernan DF, Mieler WF. 2009; Zhang X et al. 2014]. Insgesamt war die Wirksamkeit im Vergleich zu den Kosten und dem Nebenwirkungsprofil zu gering.

Das Präparat Ozurdex™ (Allergan Inc, Irvine, CA) enthält 700 µg Dexamethason, welches über einen Zeitraum von 1 – 6 Monaten abgegeben wird, mit einem Peak nach etwa 2 Wochen [Kuppermann BD et al. 2007; Banerjee PJ et al. 2013; Medeiros MD et al. 2014]. Der Träger ist ein stabförmiges Kopolymer aus Milchsäure und Glycolsäure, welches vom Körper vollständig abbaubar ist Kuppermann BD et al. 2007; Kiernan DF, Mieler WF. 2009]. Es besitzt eine Zulassung zur Therapie des diabetischen Makulaödems, wobei es den überzeugendsten Effekt aufweist und in den USA zur Therapie des Maculaödem nach Retinalvenenthrombose und nicht infektiöser posteriorer Uveitis [Jonas JB, Sofker A. 2001; Banerjee PJ et al. 2013; Medeiros MD et al. 2014]. Lokale und systemische Nebenwirkungen sind selten und gut beherrschbar [Banerjee PJ et al. 2013]. Es kann zu erhöhtem Augeninnendruck sowie zu subkonjunktivalen Blutungen kommen [Kiernan DF, Mieler WF. 2009]. In bis zu 50% bildet sich eine Katarakt [Wang c et al. 2014]. Aktuell findet die Auswertung einer Phase III Studie zur Zulassung von Ozurdex™ (Allergan Inc, Irvine, CA) zur Therapie der PVR statt [Banerjee PJ et al. 2013].

Auch Triamcinolonacetonid wird eingesetzt. I-vation™ (SurModics, Inc., Eden Prairie, MN) besteht aus einer nicht abbaubaren Helix aus Titan, welche mit 925 µg Triamcinolonacetonid sowie einem speziellen Gemisch aus Polybutylmethacrylat und Polyethylvinylacetat Polymeren, welche die Menge und Dauer der Medikamentenabgabe beeinflussen, überzogen ist [Lee SS, Robinson MR. 2009; Kuno N, Fujii S 2012].

So ist durch Variation der Zusammensetzung eine Anpassung der Abgabedauer zwischen 6 Monaten und 2 Jahren möglich [Lee SS, Robinson MR. 2009; Kuno N, Fujii S 2012]. Hier zeigten sich ebenfalls früh eine Reduktion der Retinalverdickung und eine Verbesserung der Sehschärfe. Diese verlor sich jedoch über längere Zeit wieder, vermutlich aufgrund einer sekundären Katarakt. Eine weitere Komplikation ist die Konjunktivalblutung [Kiernan DF, Mieler WF. 2009]. Dies könnte ein Grund für eine fehlende Fortsetzung der klinischen Studien sein [Kuno N, Fujii S 2012].

Insgesamt kommt es noch recht häufig zu Nebenwirkungen beim Einsatz der Implantate. Bei den neueren Dexamethasonimplantaten konnte die Entzündung besser kontrolliert werden und es kam weniger zu Katarakt, Hypotonie und Neovaskularisation der Hornhaut als früher. In einem Versuch von Cheng et al. wurde ein Auge mit diesem Implantat und das andere Auge zur Kontrolle konventionell behandelt. In dem mit Dexamethason behandelten Auge kam es seltener als am Kontrollauge zu Nebenwirkungen [Cheng CK et al. 1995].

## 1.7 Bevacizumab

Zunehmend werden zur Therapie von Krebserkrankungen Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) verwendet [Mason JO 3<sup>rd</sup> et al. 2010]. VEGF ist ein Cytokin, welches der wichtigste Induktor der Angiogenese ist [Mansoor S et al. 2009]. Diese ist besonders wichtig in der embryonalen Entwicklung, aber auch für das Knochenwachstum und die Fortpflanzung [Ferrara N et al. 2003]. VEGF wird unter anderem von Pigmentepithelzellen, Gefäßendothelzellen, Neuronen, Müllerzellen und ausgewachsener Retina produziert [Sari A et al. 2009]. Problematisch wird die Wirkung bei der pathologischen Angiogenese z.B. durch den Einfluss von Tumoren. Diese neuen Gefäße haben eine höhere Durchlässigkeit, und auch die schon bestehenden Gefäße werden durch eine lokal hohe VEGF – Wirkung durchlässiger [Spitzer MS et al. 2006; Weiss K et al. 2009].

Während das Isomer VEGF – A besonders die Angiogenese induziert, stimulieren VEGF – C und VEGF – D zusätzlich die Lymphangiogenese [Ferrara N et al. 2003; Yang H et al. 2010]. Rosenfeld hatte als erster die Idee, durch Anti – VEGF – Antikörper die Neovaskularisation zu verhindern, ursprünglich zur Unterdrückung von Tumorwachstum [Rosenfeld PJ et al. 2005]. In vielen Tumoren besteht eine Überexpression von VEGF, das vom Tumor selbst, als Reaktion des Immunsystems, oder von der durch den Tumor auftretenden Hypoxie herrührt. Wenn man es blockiert, führt dies zu einem geringeren Tumorwachstum und zu einer besseren Wirkung von Chemotherapeutika [Jubb AM, Harris AL. 2010]. In Studien konnten eine Tumorverkleinerung von bis zu 95% beobachtet werden [Nowosielski M et al. 2010]. Die Blutgefäße normalisierten sich und waren nun nicht mehr durchlässig [de Groot JF et al. 2010].

Vertreter der Anti – VEGF – Medikamente sind das Aptamer Pegaptanib (Macugen, Eyetech/Pfizer) und die rekombinierten, humanisierten Antikörperfragmente bzw. Antikörper Ranibizumab (Lucentis, Genentech/Novartis) und Bevacizumab (Avastin, Roche) [Ferrara N et al. 2004]. Bevacizumab ist ein rekombinanter, humanisierter monoklonaler IgG1 – Antikörper, der alle fünf bekannten VEGF – Subtypen bindet und sie so unterdrückt [Sari A et al. 2009]. Er blockiert das Aktivitätszentrum und verhindert so eine Reaktion mit anderen Antikörpern [Yang H et al. 2010].

Aufgebaut ist der Antikörper aus 93% menschlichen und 7% Proteinsequenzen der Maus [Yang H et al. 2010]. Im Körper hat er eine Halbwertszeit von 17 bis 21 Tagen [Ferrara N et al. 2004]. Zu möglichen systemischen Nebenwirkungen von Bevacizumab zählen vor allem thrombembolische Ereignisse oder Infarkte [Jaissle GB et al. 2009; Arevalo JF et al. 2010]. Bei der üblichen systemischen Gabe von 5 – 15 mg/kg kann es zusätzlich zu Perforationen im Gastrointestinaltrakt, verminderter Wundheilung, Hämorrhagien in vielen Organen, Proteinurie, Fistelbildung auch außerhalb des Gastrointestinaltrakts, arteriellen thrombembolischen Ereignissen und Hypertonie kommen [Ferrara N et al. 2004; Yasukawa T et al. 2004; Tarantola RM et al. 2010].

Wie die anderen VEGF – Antikörper ist Bevacizumab hydrophil und so in einer klaren Lösung erhältlich [Joussen AM et al.2007]. Er ist im Vergleich zu anderen Therapeutika recht preiswert [Kiernan DF, Mieler WF. 2009].

### 1.7.1 Bevacizumab in der Augenheilkunde

Seit 2005 wird Bevacizumab als sogenanntes Off – Label – Medikament zur Therapie unterschiedlicher Augenerkrankungen mit einer Überexpression von VEGF eingesetzt [Rosenfeld PJ et al. 2005]. Diese pathologisch hohe Konzentration führt zu einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit, erniedrigter Blut – Retina – Schranke, Gefäßproliferationen in das subretinale Pigmentepithel oder in den subretinalen Raum, Retinaödem und Wachstum von Neuronen im Sehzentrum. Zu den Erkrankungen gehören unter anderen die neovaskulär altersbedingte Makuladegeneration, die proliferative diabetische Retinopathie und das zystisches Makulaödem nach retinalen Verschlüssen [Spitzer MS et al. 2006; Schwartz SG, Flynn HW Jr. 2007; Sari A et al. 2009; Tarantola RM et al. 2010; Mason JO 3<sup>rd</sup> et al. 2010].

Erfolge der Therapie mit Bevacizumab sind ein stabiler oder verbesserter Visus, geringere Makuladicke in der OCT, Reduktion der zystischen Makulopathie und weniger Lecks im Angiogramm [Weiss K et al. 2009; Mansour AM et al. 2009; Lee SS, Robinson MR.2009]. Jüngere Patienten ohne große Entzündungsaktivität konnten sogar eine vollständige Regression erreichen [Mansour AM et al. 2009]. Diese Ergebnisse waren nach zwei Jahren stabil [Arevalo JF et al. 2010]. Desweiteren konnte ein geringeres Glaukom – und Kataraktrisiko beobachtet werden [Lobo AM et al. 2010]. Jaissle et al. verfolgten die Entwicklung der Therapiefolgen bei zentralem Retinalvenenverschluss für ein Jahr und fanden eine signifikante Verbesserung von Sehschärfe und zentraler Retinadicke [Jaissle GB et al. 2009].

Im Vergleich der VEGF- Antikörpern erreichten Bevacizumab und Ranibizumab bei der intravitrealen Anwendung in der Therapie bei altersbedingter Makuladegeneration eine bessere Wirkung als Pegaptanib [Solomon SD, Lindsley K et al. 2014]. Zwischen den beiden humanisierten Antikörpern konnte im direkten Vergleich kein wesentlicher Unterschied in der Wirkung festgestellt werden [Solomon SD, Lindsley K et al. 2014]. Es bedarf nun der Abwägung der Zulassung von Ranibizumab gegen den preislichen Vorteil von Avastin [Solomon SD, Lindsley K et al. 2014]. Auch für die Therapie des Makulaödem auf dem Boden einer Zentralvenenthrombose konnte ein Vorteil der intravitrealen Injektion von VEGF – Antikörpern beobachtet werden [Braithwaite T, Nanji AA et al. 2014].

Platziert werden die Injektionen z.B. in den unteren temporalen Quadranten, 3,5 – 4 mm vom kornealen Rand entfernt mit einer 30er Nadel, oder 3 mm hinter dem Limbus in die mittlere Glaskörperhöhle in den oberen nasalen Quadranten, oder durch die Pars Plana [Sari A et al. 2009; Jaisle GB et al. 2009; Mason JO 3rd et al. 2010; Tarantola RM et al. 2010]. Dadurch zeigt diese Therapie alle Probleme einer intravitrealen Injektion wie intraokulare Druckerhöhung und Blutung [Arevalo JF et al. 2010]. Weitere Nebenwirkungen sind, Katarakt und Pseudoendophthalmitis [Mansour AM et al. 2009; Schwartz SG, Flynn HW Jr. 2007].

Die Vorteile der lokalen Therapie sind z. B. weniger thrombembolische Ereignisse, Bluthochdruck und andere systemische Nebenwirkungen. Nach einem Tag waren nur 4% der intravitreal injizierten Dosis im Blut nachweisbar, was damit zusammen hängen könnte, dass Bevacizumab ein recht großes Molekül ist und so weniger in den Blutkreislauf übertritt [Sari A et al. 2009]. Insgesamt kommt es bei der Therapie zu sehr wenigen Komplikationen [Mason JO 3<sup>rd</sup> et al. 2010; Solomon SD, Lindsley K et al. 2014].

## 1.8 Ziel der Dissertation

Das Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob sich ein von Frank et al. neu entwickeltes Gel auf der Basis quervernetzter HA als Medikamententräger eignet und dessen Eigenschaften in der Abgabe zu beurteilen [Frank C. 2010].

In früheren Versuchen testeten Spitzer et. al., ob sich Healon, ein Hydrogel, als Medikamententräger eignet. Nach Zugabe von Dexamethason konnten sie keine Änderung der Klarheit und Viskosität feststellen. Die Abgabe des Dexamethason wurde photometrisch über 2 – 6 Tage gemessen. Nach einem leichten initialen Flush folgte eine hohe Abgabe über fast 2 Tage und nach 44 Stunden ein Steady State mit kontinuierlicher diffusionskontrollierter Abgabe, proportional zur Zeit im Quadrat. Nach sechs Tagen blieben 10% des Medikamentes im Healon zurück. Die antiproliferative Wirkung war erhalten [Spitzer MS et al. 2008]. Eine Abgabe innerhalb von sechs Tagen erschien zu kurz, vor allem zur Therapie der PVR. Wünschenswert wäre eine verlangsamte und verlängerte Abgabe. Die Idee, auf welcher diese Arbeit beruht, bestand darin diese langsamere und längere Abgabe durch Einbinden von Dexamethason in das Gel aus quervernetzter HA zu erreichen.

Um weitere Möglichkeiten zum Medikamentenrelease zu testen, wurde zusätzlich die Dauer und Menge der Abgabe aus diesem Gel aus quervernetzter Hyaluronsäure nach Zugabe von Bevacizumab untersucht.

Durch dessen antiproliferative Wirkung mit positiver Auswirkung auf Sehschärfe und Makuladicke werden ebenfalls große Hoffnungen in diese Therapie gesetzt. Sollte sich das quervernetzte Gel als geeigneter Medikamententräger erweisen, würde dies einen großen Schritt in der antiproliferativen Therapie, besonders der PVR, bedeuten.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

- 100% Essigsäure Merck
- 1-vinyl-2-pyrrolidinone Sigma-Aldrich Chemie GmbH V-3409
- 12 – Töpfchenplatten (well – Platten) Costar
- 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Sigma-Aldrich Chemie GmbH H-107
- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT)  
Sigma Nr. 5655
- 96 – Töpfchenplatten (well – Platten) Costar
- Aceton Sigma-Aldrich Chemie GmbH 24201
- ARPE – 19 – Zellen ATCC, Manassas, VA, USA
- Avastin Roche
- BSA (Albumin from bovine serum) SIGMA A 3803-10G
- Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) R&D Systems Part No 895000
- Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)  
R&D Systems Part No 895001
- D – PBS GIBCO REF: 14190-094
- Dexamethason soluble water Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-2915
- DMSO Merck
- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (D-MEM)  
GIBCO REF: 31885-023
- Eppendorfcups 2 ml Eppendorf
- Foetales Kälberserum GIBCO REF: 10270-106
- Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml) Eppendorf
- Humanes VEGF<sub>165</sub> ReliaTech Cat. No. 300-036
- Hyaluronsäure (from Rooster comb) Sigma-Aldrich Chemie GmbH H-5388
- Irgacure 2959 Bodo Müller Chemie GmbH Batch-Nr.  
09907010

- Insulinspritze Braun U-40 Ref 9161309V
- Methacrylsäure-glycidylester Fluka Nr. 64161
- Paraffinstreifen Excel Scientific Cat No 100SEAL PLT
- Penicilin – Streptomycin – Lösung GIBCO Cat. No. 15070-063
- Pipettenspitzen (20; 100; 1.000 µl) Greiner bio – one
- Rabbit anti-Human IgG Advanced Targeting Systems  
Cat. No. AB-326
- SDS Roth Nr. 2326.2
- Spritzen (10; 20 ml) Greiner bio – one
- Sterilfilter (0,22; 0,45 µm) Millipore Corporation USA
- Stop Solution (Schwefelsäure) R&D Systems Cat No DY994
- Tetrabutylammoniumbromid Sigma-Aldrich Chemie GmbH 19,3119
- Triethylamin Fluka Nr. 90335
- Trypsin/EDTA (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA)  
GIBCO, L3224
- Wägepapier Macherey – Nagel
- Waschpuffer R&D Systems Part No 895003
- Zellkulturflaschen Cellstar Greiner bio – one
- Zellkulturplatten Greiner bio – one Cat. No 655101
- Zentrifugenröhrchen (15; 50 ml) Greiner bio – one

### 2.1.2 Geräte und Gefäße

- Abzug Schuster
- Becherglas (50; 150; 600 ml) Schott
- ELISA – Reader SLT 400 ATX u.
- Erlenmeyerkolben 1.000 ml Sinox
- Feinwaage Sartorius LA 120 S
- HPLC Säule GROM SIL ODS 5ST
- HPLC-System P4000, Finnigan MAT, San Jose, CA
- Kühlschrank Liebherr

- Magnetrührer	Heidolph; Reax 1R
- Messküvette	Hellma 101 QS
- Multikanalpipette 20 µl	Eppendorf
- Neubauer – Zählkammer	Neubauer - Assistent
- Photometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 1000
- Pipette (20; 100; 1.000 µl)	Eppendorf
- Pipettierhilfe	BRAND, accu jet
- Rad	neoLab 2-1175
- Schüttelmaschine	CAT SH 26
- Spatel	Bodem 18/8
- Sterilbank	Kendro
- Ultraschall – Bad	Bandelin Sonorex TK52
- UV – Lampe	Sellas 1200/220 Sellasol 1 Nr. 100498
- Vakuumpumpe	Sartorius Midisort 2000
- Vortex	Heidolph
- Wasserbad	GFL
- Zellkulturschrank/CO <sub>2</sub> – Inkubator	Heraeus
- Zentrifuge	Heraeus Biofuge fresco

### 2.1.3 Lösungen und Verdünnungsreihen

#### Verdünnungsreihe 1 von Dexamethason soluble water

Mit Hilfe des Vortex wurde eine Verdünnungsreihe von Dexamethason soluble water nach Tabelle 1 hergestellt. Dabei wurden die Verdünnungen jeweils aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml gemischt.

Table 1: Herstellung einer Konzentrationsreihe aus Dexamethason soluble water zur Erstellung der Eichreihe in 2.2.1.

Konzentration	Dexamethason soluble water	PBS	Probe
Stammlösung 1 mg/ml	10 mg	10 ml	
	<b>Stammlösung 1 mg/ml</b>		
500 µg/ml	1 ml	1 ml	<b>DEX 1</b>
300 µg/ml	0,6 ml	1,4 ml	<b>DEX 2</b>
200 µg/ml	0,4 ml	1,6 ml	<b>DEX 3</b>
150 µg/ml	0,3 ml	1,7 ml	<b>DEX 4</b>
Stammlösung 100 µg/ml	1 ml	9 ml	<b>DEX 5</b>
	<b>Stammlösung 100 µg/ml</b>		
40 µg/ml	0,8 ml	1,2 ml	<b>DEX 6</b>
30 µg/ml	0,6 ml	1,4 ml	<b>DEX 7</b>
20 µg/ml	0,4 ml	1,6 ml	<b>DEX 8</b>
15 µg/ml	0,3 ml	1,7 ml	<b>DEX 9</b>
Stammlösung 50 µg/ml	5 ml	5 ml	<b>DEX 10</b>
	<b>Stammlösung 50 µg/ml</b>		
10 µg/ml	0,4 ml	1,6 ml	<b>DEX 11</b>
5 µg/ml	0,2ml	1,8 ml	<b>DEX 12</b>
Stammlösung 25 µg/ml	1 ml	1 ml	<b>DEX 13</b>
	<b>Stammlösung 50 µg/ml</b>		
2,5 µg/ml	0,2 ml	1,8 ml	<b>DEX 14</b>

Da in „Dexamethason soluble water“ nur eine Konzentration von 65 mg Dexamethason/g enthalten war, musste die Konzentration der Proben umgerechnet werden.

Tabelle 2: Umrechnung der Konzentrationen von Dexamethason soluble water der Konzentrationsreihe aus Tabelle 1 auf die tatsächlich enthaltene Dexamethasonkonzentration.

Probe	Konzentration	
	Dexamethason soluble water	Dexamethasonkonzentration
DEX 1	500 µg/ml	32,5 µg Dexamethason/ml
DEX 2	300 µg/ml	19,5 µg Dexamethason/ml
DEX 3	200 µg/ml	13 µg Dexamethason/ml
DEX 4	150 µg/ml	9,75 µg Dexamethason/ml
DEX 5	100 µg/ml	6,5 µg Dexamethason/ml
DEX 6	40 µg/ml	2,6 µg Dexamethason/ml
DEX 7	30 µg/ml	1,95 µg Dexamethason/ml
DEX 8	20 µg/ml	1,3 µg Dexamethason/ml
DEX 9	15 µg/ml	0,975 µg Dexamethason/ml
DEX 10	50 µg/ml	3,25 µg Dexamethason/ml
DEX 11	10 µg/ml	0,65 µg Dexamethason/ml
DEX 12	5 µg/ml	0,325 µg Dexamethason/ml
DEX 13	25 µg/ml	1,625 µg Dexamethason/ml
DEX 14	2,5 µg/ml	0,16 µg Dexamethason/ml

Jeweils 2 ml Lösung wurden gut auf dem Vortex gemischt und anschließend in das Ultraschall – Bad gestellt. Die Extinktion wurde wie in 2.2.2 beschrieben gemessen. Daraus entstand die Eichreihe für die Dexamethasonkonzentration.

Verdünnungsreihe 2 von Dexamethason soluble water

In 8 ml PBS wurden 1,23 g Dexamethason soluble water durch schütteln auf dem Vortex gelöst und anschließend mit einem 0,45 µm Filter unter der Sterilbank sterilfiltriert. Da Dexamethason soluble water eine Konzentration von 65 mg Dexamethason/g enthielt, entsprach dies einer Dexamethasonkonzentration von 10 mg/ml. Aus dieser Stammlösung wurde

entsprechend Tabelle 3 eine Konzentrationsreihe zur Erstellung der Eichreihe in 2.2.6. durch Verdünnung mit sterilem PBS unter der Sterilbank hergestellt.

Je 3 ml der Konzentrationen wurden gut gemischt und pro Versuchstag wurden pro Konzentration 100 µl in jeweils 12 Vertiefungen gegeben. Zusätzlich wurden auf jeder Platte 12 Vertiefungen mit 100 µl sterilem PBS gefüllt, um die Proliferation ohne Zugabe von Dexamethason beurteilen zu können.

***Tabelle 3:** Herstellung einer Dexamethasonkonzentrationsreihe zur Erstellung der Eichreihe in 2.2.6.*

<b>Dexamethasonkonzentration</b>	<b>Dexamethason soluble water</b>	<b>PBS</b>
Stammlösung 10 mg/ml	1,23 g	8 ml
	<b>Stammlösung 10 mg/ml</b>	
5 mg/ml	1,5 ml	1,5 ml
4 mg/ml	1,2 ml	1,8 ml
3 mg/ml	0,9 ml	2,1 ml
2 mg/ml	0,6 ml	2,4 ml
Stammlösung 1 mg/ml	0,6 ml	5,4 ml
	<b>Stammlösung 1 mg/ml</b>	
0,5 mg/ml	1,5 ml	1,5 ml
0,3 mg/ml	0,9 ml	2,1 ml
0,1 mg/ml	0,3 ml	2,7 ml

#### MTT – Lösung 1

MTT wurde mit einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS gelöst und anschließend auf dem Rad suspendiert. Da MTT sehr lichtempfindlich ist, wurde das Zentrifugenröhrchen mit der Suspension dauerhaft mit Alufolie umschlossen.

Nach einer Stunde wurde die Lösung mit einer 10 ml Spritze durch einen 0,22 µm Filter unter dem Abzug sterilfiltriert. Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

## MTT – Lösung 2

In einem Erlenmeyerkolben wurde mit Hilfe eines Magnetrührers 10 g SDS in 99,4 ml DMSO und 0,6 ml 100%-iger Essigsäure gelöst und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

## Bicarbonat/ Carbonat Puffer

1,59 g Bicarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) und 2,93 g Carbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) wurden in 900 ml destilliertem Wasser gemischt. Wichtig war anschließend die Einstellung des pH Wertes auf 9,6 durch Zugabe von Salzsäure (HCl). Danach wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

## 1% BSA – Lösung

200 mg BSA wurden in 20 ml PBS gelöst und mit einem Sterilfilter mit 0,2  $\mu\text{m}$  Poren sterilfiltriert.

## 0,1% BSA – Lösung

Von der 1% BSA – Lösung wurden 2 ml mit 18 ml PBS gemischt. So entstand die 0,1% BSA – Lösung.

## VEGF – Verdünnung

20  $\mu\text{g}$  VEGF wurden in 400  $\mu\text{l}$  0,1% BSA – Lösung gelöst. Dadurch entstand eine Verdünnung der Konzentration 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Von dieser wurden je ca. 50  $\mu\text{l}$  in kleinen Eppendorfkappen aliquottiert und tiefgefroren.

## Bevacizumabverdünnung für die Eichreihe

Bevacizumab lag bereits in einer Ausgangskonzentration von 25 mg/ml vor. Hiervon wurden 100 µl in 900 µl 0,1% BSA – Lösung 1: 10 verdünnt.

Dies wurde weitere fünfmal wiederholt. Dazwischen wurde gut auf dem Vortex gemischt. Von der entstandenen Verdünnung mit einer Konzentration von 25 ng/ml wurden 200 µl mit 1800 µl der 0,1% BSA – Lösung und hiervon 1 ml mit 1,5 ml 0,1% BSA – Lösung immer auf dem Vortex gemischt. Ausgehend von der entstandenen Stammlösung mit einer Konzentration von 1.000 pg/ml wurde eine Konzentrationsreihe hergestellt.

***Tabelle 4:** Herstellung einer Konzentrationsreihe aus Bevacizumab zur Erstellung der Eichreihe in 2.2.8.*

<b>Konzentration</b>	<b>Stammlösung 1.000pg/ml</b>	<b>0,1% BSA – Lösung</b>	<b>Probe</b>
0 pg/ml	0 µl	500 µl	<b>AV 1</b>
50 pg/ml	25 µl	475 µl	<b>AV 2</b>
100 pg/ml	50 µl	450 µl	<b>AV 3</b>
150 pg/ml	75 µl	425 µl	<b>AV 4</b>
200 pg/ml	100 µl	400 µl	<b>AV 5</b>
300 pg/ml	150 µl	350 µl	<b>AV 6</b>
400 pg/ml	200 µl	300 µl	<b>AV 7</b>
500 pg/ml	250 µl	250 µl	<b>AV 8</b>

### 2.1.4 ARPE 19 Nährmedium

Zu einer Flasche mit 500 ml D-MEM Medium wurden 50 ml Fötale Kälberserum und 5 ml einer 1:1 Penicillin-Streptomycin-Mischung beigefügt.

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Herstellung von Hyaluronsäuregelen mit unterschiedlichen Dexamethasonmengen

Nach der neu modifizierten Methode von Frank et al. wurden mittels UV – Strahlung und 1-vinyl-2-pyrrolidinone Gele auf der Basis quervernetzter Hyaluronsäure (HA) hergestellt [Frank C. 2010].

Ihnen wurden unterschiedliche Mengen Dexamethason zugegeben. Aufgrund seiner besseren Eigenschaften bezüglich der Löslichkeit wurde Dexamethason soluble water verwendet. Als Referenz wurde jeweils ein zweites Gel mit der entsprechenden Menge der Trägersubstanz 2 – Hydroxypropyl –  $\beta$  – Cyclodextrin (2HBC) hergestellt. Um möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen wurden die entsprechenden Vergleichsgele jeweils simultan bearbeitet.

Nach der Methode von Frank et al. wurden zunächst Konjugate aus HA und Methacrylsäure-glycidylester durch lösen von je 0,05 g HA in 5 ml PBS hergestellt. Anschließend erfolgte jeweils die Zugabe von 110  $\mu$ l Triethylamin, 110  $\mu$ l Methacrylsäureglycidylester und 110 mg Tetrabutylammoniumbromid unter einem Abzug. Zwischen den Zugaben wurden die Proben mit Hilfe eines Magnetrührers gut durchmischt.

Danach erfolgte die Inkubation für 24 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur unter dem Abzug. Die fertigen Konjugate für die Gele wurden für eine Stunde bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden sie jeweils in 100 ml Aceton zur Ausfällung gebracht und danach durch Rühren mit dem Magnetrührer erneut in 5 ml PBS gelöst. Die Aufbewahrung für 12 bis 24 Stunden erfolgte im Kühlschrank.

Zu den so entstandenen Vorläufern der Gele wurden 250  $\mu$ l 1-vinyl-2-pyrrolidinone als Quervernetzer, 0,05 g Irgacure 2959 als Photoinitiator und die unterschiedlichen Mengen von Dexamethason soluble water bzw. die entsprechenden Mengen 2HBC gegeben. Es wurden Gele mit 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg und 80 mg zugegebenem Dexamethason hergestellt.

Das verwendete Dexamethason soluble water besaß eine Konzentration von 65 mg Dexamethason/g. In das Gel für 30 mg Dexamethason wurden deshalb 461,5 mg Dexamethason soluble water und in das Vergleichsgel entsprechend 461,5 mg 2HBC eingerührt. Entsprechend wurden zu den Gelen für 40 mg Dexamethason je 615,4 mg, für 50 mg Dexamethason je 769,2 mg, für 60 mg je 923 mg und für das Gel mit 80 mg Dexamethason je 1230,8 mg Dexamethason soluble water bzw. 2HBC gegeben. Zwischen den Zugaben und am Ende wurden die Gele mit dem Magnetrührer verrührt. Die so entstandenen viskosen Flüssigkeiten wurden in die Vertiefungen von 12 – Töpfchenplatten (well – Platten) als Formgeber gefüllt. Anschließend fand die Quervernetzung der HA durch 10 – minütige Exposition mit UVA – Strahlung ( $\lambda = 356 \text{ nm}$ , ca.  $20 \text{ mW/cm}^2$ ) statt. Es entstanden feste runde Gele mit einem Durchmesser von ca. 22,5 mm und einer Höhe von ca. 17,0 mm. Diese wurden anschließend in Urinbechern in 10 ml PBS eingelegt. Um eine höhere Aussagekraft zu haben, wurden je zwei weitere Gele mit 40 mg bzw. 50 mg hergestellt, da dies ungefähr der Menge entsprach, die für den klinischen Einsatz interessant ist.

### 2.2.2 Photometrische Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge

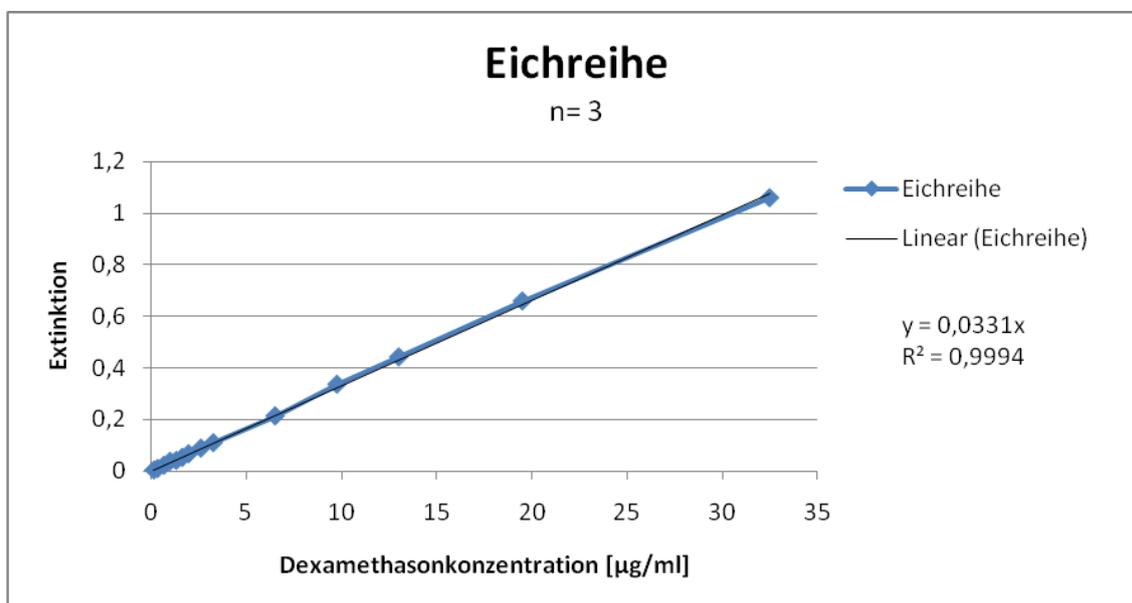
Zur Ermittlung der abgegebenen Dexamethasonmengen wurden Proben des PBS, in welchem die Gele eingelegt waren, mit dem Photometer getestet. Dieses Verfahren war nicht spezifisch, da auch weitere Substanzen, welche aus dem Gel in das umgebende PBS gelangten, gemessen wurden.

Um die Messung von Störfaktoren möglichst gering zu halten wurde das Vergleichsgel jeweils entsprechend gemessen und die Ergebnisse wurden jeweils subtrahiert.

Erstmals wurden die 10 ml Proben nach 30 Minuten und anschließend sechsmal im Abstand von einer Stunde mit Hilfe einer Pipette ausgewechselt. Das entnommene PBS wurde in drei Schritten, zweimal je 1 ml in 9 ml PBS und einmal 200  $\mu\text{l}$  in 1800  $\mu\text{l}$  PBS, im Verhältnis 1: 1.000 verdünnt.

Zwischendurch wurden die Verdünnungen gut auf dem Vortex und am Ende für etwa fünf Minuten im Ultraschall-Bad gemischt. Daraufhin erfolgte die Messung der Extinktionen je dreier Proben mit dem Photometer. Hierzu wurde eine Wellenlänge von  $\lambda = 239$  nm verwendet, da im Extinktionsspektrum von Dexamethason an dieser Stelle ein Maximum erkennbar war und in der Literatur bereits Versuche mit Dexamethason bzw. Triamcinolon bei dieser Wellenlänge beschrieben waren [Cheng CK et al. 1995; Spitzer MS et al. 2008; Szurman P et al. 2007]. Auf „Null“ kalibriert wurde mit reinem PBS. Anschließend wurde die Testküvette mit 500  $\mu$ l der Testlösung gespült und daraufhin wurden 1.000  $\mu$ l derselben gemessen. Weitere Medienwechsel und Messungen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden, sowie nach einer, zwei und drei Wochen durchgeführt.

Auf der Basis der Verdünnungsreihe 1 aus 2.1.3 wurde eine Eichreihe erstellt. Sie zeigte einen annähernd linearen Verlauf, welcher durch eine lineare Regression durch den Schnittpunkt der Achsen präzisiert und daraus eine Formel zur Errechnung der Dexamethasonmenge der Proben erstellt wurde.



**Abb. 5:** *Eichreihe von Dexamethason mit linearer Regression und Bestimmtheitsmaß für die Berechnung der Proben des PBS in welchem die Gele eingelegt waren.*

Die Extinktionswerte der Gele mit 2HBC wurden jeweils von den Werten der Gele mit Dexamethason subtrahiert, um Störfaktoren, durch Stoffe welche ebenfalls aus dem Gel abgegeben werden könnten, heraus zu rechnen. Hierdurch entstanden neun Werte. Von diesen wurde jeweils mit Hilfe der Eichreihe die abgegebene Menge an Dexamethason in der Probe bestimmt. Um darauf zurückzuschließen, wurde der Wert mit 10000 entsprechend der Verdünnung multipliziert. Anschließend wurde der Mittelwert dieser neun Werte errechnet und von der vorhandenen Dexamethasonmenge im Gel vor dem Wechsel des PBS abgezogen. Ein entsprechendes Schaubild wurde erstellt.

### 2.2.3 Erstellen von Extinktionsspektren

Mit Hilfe von Extinktionsspektren sollte bestimmt werden, welche Substanzen zusätzlich aus den Gelen abgegeben werden könnten. Durch die Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 239$  nm sollte die Substanz identifiziert werden, durch welche die Messung gestört wurde.

Die in den Gelen enthaltenen Chemikalien wurden jeweils in entsprechender Menge in 5 ml PBS gelöst, siehe Kapitel 2.2.1. Dieses Gemisch wurde jeweils weiter 1: 1.000 verdünnt. Ebenso wurde mit den zusätzlichen Stoffen Dexamethason soluble water und 2HBC verfahren. Hier wurden 461,5 mg entsprechend einer Menge von 30 mg Dexamethason eingesetzt. Von den Verdünnungen wurde jeweils ein Extinktionsspektrum erstellt. Zusätzlich wurden Extinktionsspektren des PBS, in welchem die Gele eingelegt waren, erstellt. Hierzu wurden wie in 2.2.1 drei Vorläufergele hergestellt.

In den nächsten Schritten wurden zu einem dieser Gele nur 250  $\mu$ l 1-vinyl-2-pyrrolidinone und 0,05 g Irgacure 2959 gegeben. Dieses wurde als Leergel bezeichnet. Zu den beiden anderen Gelen wurden zusätzlich 461,5 mg 2HBC beziehungsweise 461,5 mg Dexamethason soluble water, entsprechend einer Menge von 30 mg Dexamethason, zugegeben. Eine halbe Stunde nach der Quervernetzung wurden die 10 ml PBS, in welchem die Gele eingelegt waren, ausgetauscht, im Verhältnis 1: 100 verdünnt und davon ein Extinktionsspektrum

erstellt. Dabei wurden die Abstände bei jedem Durchgang verringert. Erst wurde in Abständen von 50 nm (von  $\lambda = 200$  bis  $\lambda = 400$  nm), später in Abständen von 10 nm (von  $\lambda = 210$  bis  $\lambda = 290$  nm), dann mit 5 nm ( $\lambda = 205$  bis  $\lambda = 235$  nm) und am Schluss, bei den Proben, die besonders hohe Extinktionen aufwiesen (zwischen  $\lambda = 225$  und  $\lambda = 245$  nm) in Abständen von 1 nm gemessen.

#### 2.2.4 HPLC zur Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) handelte es sich um ein Verfahren, das es ermöglichte, Substanzen zu trennen und anschließend selektiv Stoffmengen zu bestimmen. Dabei wurde eine Flüssigkeit zusammen mit der Probe als mobile Phase durch eine Trennsäule, die feste Phase, gepumpt. Je nach Wechselwirkung der einzelnen Substanzen mit der Trennsäule änderte sich die Aufenthaltsdauer derselben in der Säule.

Dies führte zu unterschiedlichen Austrittszeiten der einzelnen Substanzen.

Verglich man diese mit einem Referenzwert, konnte man die Substanz identifizieren und mit Hilfe einer Konzentrationsreihe wie in 2.1.3 beschrieben auch ihre Menge bestimmen.

Um dieses Verfahren durchzuführen, wurden erneut Gele wie in 2.2.1 beschrieben hergestellt. Ihnen wurden 15 mg, 30 mg und 50 mg Dexamethason zugegeben. Laut Charge betrug der Dexamethasongehalt des hierbei verwendeten Dexamethason soluble water 70 mg/g. Entsprechend wurden für das Gel mit 15 mg Dexamethason 212,04 mg Dexamethason soluble water bzw. 2HBC, für das mit 30 mg Dexamethason entsprechend je 424,32 mg und für das Gel mit 50 mg Dexamethason wurden 700 mg Dexamethason soluble water und 700 mg 2HBC hinzugegeben. Wie in 2.2.2 wurden nach 30 Minuten, und anschließend stündlich bis zur 6. Stunde die 10 ml PBS, in welchem die Gele eingelegt waren, gewechselt. Diese PBS – Proben wurden mit Hilfe der HPLC auf ihre Menge an enthaltenem Dexamethason untersucht. Hierzu wurde das HPLC-System P4000 verwendet [Finnigan MAT, San Jose, CA, USA].

Als stationäre Phase diente das unpolare C18- Kieselgel und für mobile Phase wurde ein Alkoholgemisch auf der Basis des polaren Ethylacetat verwendet.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1000 mit PBS verdünnt und in Eppendorfcups in die HPLC gestellt. Anschließend wurden sie mit einer Säule von GROM SIL ODS 5ST (3 µm; 150x2 mm) getrennt und die Menge an Dexamethason gemessen. Dieser Vorgang wurde pro Probe dreimalig durchgeführt und der Durchschnitt errechnet. Weitere Wechsel und Tests fanden nach 1, 2, 3 und 5 Tagen, sowie nach einer Woche statt.

Es wurde die Abgabe in Prozent der zugegebenen Menge berechnet und ein Schaubild erstellt.

#### 2.2.5 Kultivierung von ARPE 19 Zellen

Bei ARPE 19 Zellen handelte es sich um eine spontan entstandene Zelllinie aus menschlichem retinalen Pigmentepithel mit normalen Zellkernen, die polarisierte einschichtige Epithelverbände bildeten. Sie wuchsen sehr schnell und benötigten recht wenig Serum. Für in vitro Versuche waren sie sehr gut geeignet, da sie den Zellen in vivo in Struktur und Funktionseigenschaften sehr ähneln [Dunn KC et al. 1996].

Sie sind außerdem die vorherrschende Zellgruppe in traktiven Membranen bei der proliferativen Vitreoretinopathie [Wu WC, Kao YH, Hu DN. 2002].

Sämtliche Arbeiten mit den Zellen erfolgten steril unter einem Abzug. Aufbewahrt wurden sie in Zellkulturflaschen im CO<sub>2</sub> Inkubator bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte. Um eine neue Kultur herzustellen, wurden mit Hilfe von 5 ml Trypsin die ARPE – Zellen vom Boden einer Zellkulturflasche gelöst. Dieser Vorgang ließ sich lichtmikroskopisch verfolgen. Nach einer Einwirkzeit von etwa 10 Minuten wurde mit 20 ml Nährmedium (siehe 2.1.4) neutralisiert und die Lösung in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt.

Durch Zentrifugieren für 5 Minuten bei 1.000 Umdrehungen lagerten sich die Zellen am Boden ab. Vorsichtig wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen in wenigen Millilitern Nährmedium resuspendiert. Einige Tropfen dieser

Suspension wurden mit ca. 25 ml Nährmedium in eine neue Zellkulturflasche gefüllt. Der Rest wurde verworfen. Die Zellkulturflasche wurde im CO<sub>2</sub> Inkubator bei 37 °C aufbewahrt.

Nach 3 bis 5 Tagen erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. Das alte Medium wurde vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, zweimalig wurde mit 10 ml PBS gespült und anschließend 25 ml neues Nährmedium zugegeben.

#### 2.2.6 Testung der biologischen Wirksamkeit des abgegebenen Dexamethason mit Hilfe des MTT – Tests

Um die biologische Wirksamkeit des Dexamethason nach Abgabe zu ermitteln, wurde der MTT – Test nach T. Lindl durchgeführt [Lindl T. 2002]. Für die Nutzung des quervernetzten Hyaluronsäuregels als Medikamententräger mit Release Funktion war es wichtig, dass das zugegebene Dexamethason durch die Quervernetzung mittels UV – Licht nicht unwirksam wurde. Der MTT – Test diente der Bestimmung von Lebensfähigkeit und Wachstum von Zellen und sollte so Rückschlüsse auf die Wirksamkeit des abgegebenen Dexamethason geben. Gemessen wurde dabei die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase, welche nur in lebenden Zellen nachweisbar war.

Wie bereits in 2.2.5 beschrieben wurden die ARPE 19 Zellen vom Boden der Zellkulturplatte gelöst und mit der Zentrifuge separiert. Anschließend wurden sie in wenigen Millilitern Nährmedium resuspendiert und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurde ihre Konzentration ermittelt. Danach wurde so verdünnt, dass eine Zellkonzentration von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml entstand. Hiervon wurden je 200 µl in die inneren 60 Vertiefungen von vier 96 – well – Platten gegeben.

Die äußeren Vertiefungen wurden ringsherum mit 200 µl PBS gefüllt.

Die Platten wurden für mindestens 24 Stunden im CO<sub>2</sub> Inkubator bei 37 °C aufbewahrt, damit sich die Zellen an den Boden anheften konnten. Danach wurde das Medium mit Hilfe der Vakuumpumpe abgesaugt und durch eine Mischung von 100 µl Nährmedium und 100 µl der Testlösung ersetzt.

Zwei der Platten wurden nach einem, die anderen beiden nach drei Tagen mit dem MTT – Test getestet. Hierzu wurden jeweils 20 µl der in 2.1.3 beschriebenen MTT – Lösung 1 zugegeben.

Das enthaltene 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) drang in die Zellen ein. Durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien wurde der Tetrazoliumring aufgebrochen, wodurch Formazan entstand.

Dieses war alkohollöslich und dunkelblau, während MTT eine schwach gelbe Farbe besaß. Unter dem Mikroskop ließ sich dieser Farbumschlag beobachten. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Schrank wurde die gesamte Flüssigkeit ausgeschüttet und stattdessen 200 µl MTT – Lösung 2 (siehe 2.1.3) zugegeben. Das enthaltene SDS löste die Zellen auf. Photometrisch ließ sich nun das Formazan bzw. die Intensität der Blaufärbung ermitteln, welche die Anzahl lebender Zellen repräsentierte. Nach ca. 5 Minuten Inkubation in Ruhe und anschließenden 5 Minuten auf der Schüttelmaschine wurden die Platten mit dem ELISA – Reader bei 570 und 620 nm gemessen und die Delta OD (optical density) berechnet. Es wurden je zwei Eichreihen nach einem und nach drei Tagen erstellt. Als Testlösung diente hierbei die sterile Verdünnungsreihe 2 wie in 2.1.3 beschrieben.

### 2.2.7 Probengewinnung und Messung

Wie in 2.2.6 wurden die Platten vorbereitet und der MTT – Test nach einem bzw. drei Tagen durchgeführt. Als Testlösung wurden ausgewählte PBS – Proben unterschiedlicher Gele verwendet, welche zuvor steril filtriert wurden.

Es handelte sich um Proben der Gele mit 40 mg und 50 mg zugebenem Dexamethason. Mit den Proben wurden pro Platte jeweils 12 Vertiefungen gefüllt und zusätzlich wurden pro Tag 24 Vertiefungen zur Kontrolle mit PBS gefüllt. Die enthaltene Menge an Dexamethason wurde mit Hilfe der Eichreihe berechnet.

Tabelle 5: Zuordnung der Proben für den MTT – Test zur Feststellung der biologischen Wirksamkeit des abgegebenen Dexamethason.

Probe	Gel	Zeit [h]	Anhand der Extinktion bestimmte Menge [mg] n = 9	Nach HPLC bestimmte Menge [mg] n = 3
P1	40/3	0,5	3,73	1,36
P2	40/2	2	4,03	1,60
P3	40/3	48	6,65	4,80
P4	40/2	24	9,87	6,76
P5	50/3	24	15,21	8,45
P6	50/2	0,5	15,31	1,70
P7	50/3	72	23,46	3,55
P8	50/2	48	24,07	6,0
P9	40/2	4	1,75	1,25
P10	40/2	72	5,24	2,84
P11	50/2	2	8,56	1,65
P12	40/2	48	8,86	4,80
P13	50/3	48	12,29	6,0
P14	50/2	72	12,29	3,55
P15	50/2	24	21,35	8,45

Die nach HPLC bestimmte Menge wurde anhand der Ergebnisse aus 2.2.4 errechnet. Hierzu wurde der Mittelwert aus den Ergebnissen der drei Gele ermittelt und der entsprechend abgegebene Anteil berechnet.

#### 2.2.8 Herstellung von Hyaluronsäuregelen mit unterschiedlichen Bevacizumabmengen

Wie in 2.2.1 beschrieben, wurden mehrere Konjugate aus Hyaluronsäure und Methacrylsäure – glycidylester hergestellt, für eine Stunde bei 60 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend jeweils in 100 ml Aceton ausgefällt.

Nach der Resuspension durch Rühren mit dem Magnetrührer in 5 ml PBS folgte die Aufbewahrung für 12 – 24 Stunden im Kühlschrank.

Zu diesen Vorläufern der Gele wurden 250 µl 1-vinyl-2-pyrrolidinone, 0,05 g Irgacure 2959 und die unterschiedlichen Bevacizumabmengen gegeben.

Die Zugabe erfolgte mit Hilfe einer Insulinspritze mit 40 IU. Die Konzentration des kommerziell erhältlichen Bevacizumab betrug 25 mg/ml.

Es wurden jeweils zwei Gele mit 10 mg (entspricht 400 µl bzw. 16 IU), 12,5 mg (entspricht 500 µl bzw. 20 IU) und 15 mg (entspricht 600 µl bzw. 24 IU) Bevacizumab hergestellt. Wie bereits zuvor wurden während der unterschiedlichen Herstellungsschritte die Lösungen gut mit dem Magnetrührer verrührt. Anschließend fand die Quervernetzung in 12 – well – Platten Vertiefungen durch 15 – bis 20 – minütige Exposition mit UVA – Strahlung ( $\lambda = 356 \text{ nm}$ , ca.  $20 \text{ mW/cm}^2$ ) statt.

Zum Schluss wurden die Gele in sterile Urinbecher gegeben und in 10 ml PBS eingelegt. Die Becher wurden auf der Schüttelmaschine bei sehr geringer Schüttelzahl (ca. 50 Umdrehungen pro Minute) und einer Plattentemperatur von  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Nach 6 und 12 Stunden wurden die 10 ml PBS, in welchem die Gele eingelegt waren, als Proben abgenommen und durch frische 10 ml ersetzt. Die Proben wurden bis zur Messung im Kühlschrank konserviert. Weitere Wechsel fanden nach 1, 2, 3, 4, 5, 10 und 14 Tagen statt.

Um die optimale Verdünnung zu finden, bei welcher die Ergebnisse durch den ELISA Test (vgl. 2.2.9) in einem Bereich lagen, der angezeigt werden kann, aber noch nicht der Sättigung entsprach, wurden einmalig Proben eines zusätzlichen Gels mit 12,5 mg Bevacizumab nach 1, 6 und 24 Stunden mehrfach 1: 10 und anschließend wiederholt 1: 2 verdünnt.

Je Verdünnung wurden zwei wells gefüllt und wie in 2.2.9 beschrieben bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Referenz bei 570 nm getestet. Es wurde der Mittelwert errechnet.

Die Werte der weniger starken Verdünnungen hatten bis zu einer Verdünnung von 1: 100 eine Extinktion von etwa 2, so dass hier eine Sättigung angenommen werden konnte. Die Leerprobe lag bei einem Wert von etwa 0,02.

Als guter Messbereich wurde aufgrund dieser Ergebnisse der Wert 1 angesehen. Da die 10 ml PBS – Proben erstmals nach sechs Stunden entnommen wurden und die Probe nach 6 Stunden bei einer Verdünnung zwischen 1: 4.000 und 1: 8.000 den Wert 1 erreichte und unter Berücksichtigung der längeren Abstände im Verlauf, wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1: 5.000 festgelegt. Dies geschah durch dreimaliges Mischen von 100 µl mit 900 µl 0,1% BSA – Lösung aus 2.1.3 und anschließender Zugabe von 100 µl der entstandenen Verdünnung zu 400 µl der 0,1% BSA – Lösung.

#### 2.2.9 Bevacizumab – ELISA zur Bestimmung der abgegebenen Menge

Mit dem ELISA Test war es möglich, durch eine Antikörperreaktion spezifisch die gesuchte Substanz nachzuweisen. Es wurde der Bevacizumab – ELISA nach Zhu et al. verwendet [Zhu Q et al. 2008].

Im ersten Schritt wurde VEGF auf dem Boden der Vertiefungen einer 96-well Platte fixiert. Die Zwischenräume wurden mit BSA aufgefüllt, um ein Anhaften des darauffolgenden Bevacizumab an die Wände zu verhindern und dafür zu sorgen, dass es nur an VEGF gebunden wurde. Um dieses sichtbar zu machen wurde ein Zweitantikörper, welcher an Bevacizumab bindet zugegeben. Mit Hilfe von Streptavidin war es möglich mit diesem Zweitantikörper eine Farbreaktion auszulösen, welche photometrisch gemessen wurde. Anhand der Farbintensität war ein Rückschluss auf die Menge an Bevacizumab möglich. Zur Kontrolle wurden zusätzlich jeweils 10 ml PBS in welchen ein Leergel eingelegt war, als Probe ausgewählt.

Um eine Konzentration von 1 µg/ml zu erreichen, wurde die aufgetaute VEGF – Verdünnung aus 2.1.3 durch Zugabe des in 2.1.3 beschriebenen Bicarbonat/ Carbonat Puffer im Verhältnis 1: 50 verdünnt. Hiervon wurden je 100 µl in wells der 96 – well – Platte gegeben, wobei die zwei äußeren Reihen auf jeder Seite frei gelassen wurden. Nach etwa 15 Minuten leichtem Schütteln auf der Schüttelmaschine wurden die abgedeckten Platten über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Am Folgetag wurde dreifach mit je 250 µl pro well und einer Dauer von fünf Minuten mit Waschpuffer, welcher mit destilliertem Wasser 1: 25 verdünnt wurde, gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl der 1% BSA – Lösung (siehe 2.1.3) pro well. Danach wurden die Platten für zwei Stunden auf der Wärmeplatte bei 25 °C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit erfolgte erneutes dreimaliges Waschen mit je 250 µl der Waschpufferverdünnung für je 5 Minuten. Dann wurden je Konzentration der Bevacizumabverdünnung aus 2.1.3 100 µl zugegeben. Anschließend wurden pro PBS – Probe (vergleiche 2.2.8) in einer Verdünnung von 1: 5.000 je drei wells mit 100 µl gefüllt und die Platten abgedeckt für drei Stunden bei 25 °C auf der Schüttelmaschine inkubiert. Auf jeder Platte wurde zusätzlich eine Eichreihe mit der Bevacizumabverdünnungsreihe aus 2.1.3 hergestellt.

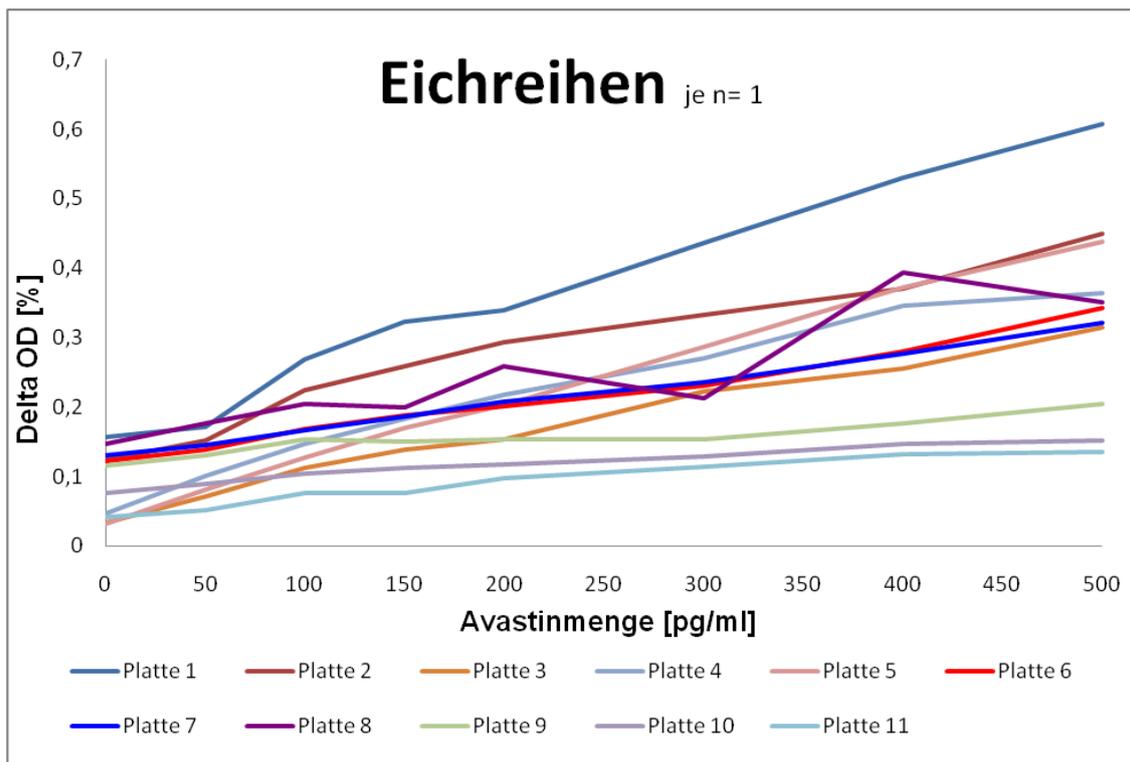
Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit 250 µl Waschpuffer mit einer Einwirkzeit von 5 Minuten wurden in jedes well 100 µl des IgG Antikörpers in einer Konzentration von 1 µg/ml gegeben und wieder abgedeckt bei 25 °C für zwei Stunden auf der Schüttelmaschine inkubiert. Es folgte erneut dreimaliges Waschen wie oben beschrieben und die Zugabe von 100 µl Streptavidin HRP (nach Vorgabe 1: 200 durch Zugabe von 1% BSA – Lösung aus 2.1.3 verdünnt) mit anschließender 20 – minütiger Dunkelinkubation bei 25 °C. Nachdem auch das verdünnte Streptavidin HRP sorgfältig durch dreimaliges Waschen entfernt worden war, wurden je 100 µl einer 1: 1 Lösung Color Reagent A und B zugegeben und die Platten erneut auf 25 °C erwärmt und vor Licht geschützt. Fünf Minuten später wurde die Farbreaktion durch die Zugabe von 50 µl Stop Solution (Schwefelsäure) gestoppt und im ELISA – reader bei 450 nm und 570 nm gemessen und die Delta OD berechnet. Mit den Werten der Verdünnungsreihe pro Platte und Wellenlänge wurde eine Eichreihe erstellt.

Zur Ermittlung der Ergebnisse der Proben wurden die jeweils zugehörigen Eichreihen verwendet.

Dies zeigte sich als sinnvoll, da eine gewisse Abweichung zwischen den einzelnen Eichreihen bestand (siehe Abb. 6).

Die Umgebungsbedingungen schienen eine Rolle zu spielen. Dies wurde darin deutlich, dass die Eichreihen der Platten, die gleichzeitig bearbeitet wurden, eine deutlich geringere Abweichung besaßen.

Die zum Zeitpunkt der Messung vorhandenen Proben eines Gels wurden jeweils zusammen auf einer Platte getestet.



**Abb. 6:** Schaubild aller Eichreihen der unterschiedlichen Platten Delta OD der Messwerte mit 450 nm und 570 nm. Man erkennt den beinahe linearen Verlauf, sowie den Einfluss des Versuchsablaufs.

Dies wird deutlich durch die geringere Abweichung der Eichreihen, welche gleichzeitig hergestellt wurden. Dazu zählen die Platten 1 und 2, 3 und 4, 6 – 8 sowie 9 – 11. Die Eichreihe Platte 5 wurde einzeln gemessen.

Um Fehlerquellen zu reduzieren, wurde zusätzlich eine Eichreihe aus den Mittelwerten der Eichreihen eines Versuchstages erstellt.

Zu dieser wurde eine lineare Regression errechnet und mit Hilfe der Formel die Konzentration der jeweiligen Proben in pg/ml bestimmt. Zur Errechnung der Bevacizumabmenge wurde das Ergebnis entsprechend der Verdünnung mit 50 multipliziert und anschließend durch 1.000 dividiert.

Dies entspricht der abgegebenen Menge in  $\mu\text{g}$ . Ein Schaubild wurde erstellt, wobei die abgegebene Menge in Prozent der Ausgangsmenge, entsprechend 100%, subtrahiert wurde.

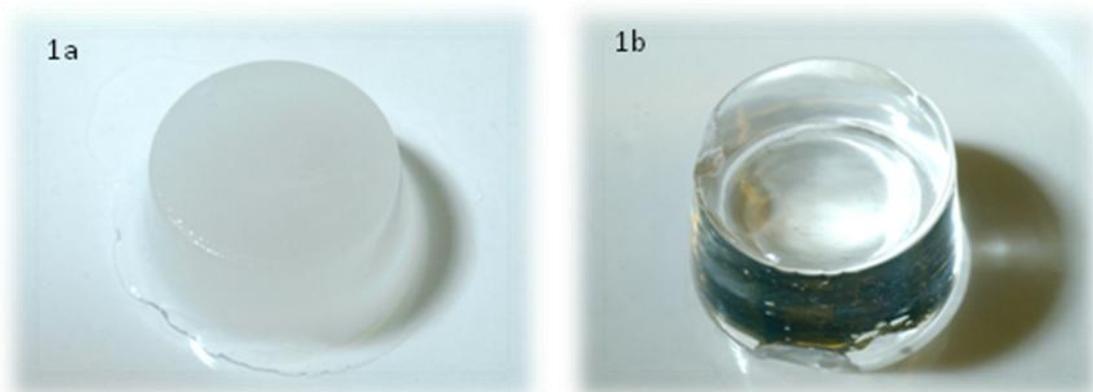
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung von Hyaluronsäuregelen mit unterschiedlichen Dexamethasonmengen

Auf der Basis der Versuche von Frank et al. wurden, wie in 2.2.1 beschrieben, formstabile Gele aus quervernetzter Hyaluronsäure hergestellt [Frank C. 2010]. Diesen wurde vor der Quervernetzung mittels UV – Licht unterschiedliche Mengen Dexamethason soluble water zugegeben. Hierbei handelte es sich um Dexamethasonmengen von 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg und 80 mg. Dies führte zu einer milchig trüben Erscheinung der sonst durchsichtigen Gele.

Im Gegensatz hierzu blieb das Vergleichsgel mit der Trägersubstanz 2 – Hydroxypropyl –  $\beta$  – Cyclodextrin (2HBC) klar. Die Form war bei beiden Gelen stabil. Ab einer Menge von 60 mg zugesetztem Dexamethason war die Stabilität zunehmend eingeschränkt.

Diese Forminstabilität war bei dem Gel mit 80 mg Dexamethason noch deutlich ausgeprägter. Daraus resultierte im weiteren Verlauf ein schnellerer Zerfall dieser Gele.



**Abb. 7:** Aufsichtfotographien quervernetzter Hyaluronsäuregele  
1a: Testgel mit 461,5 mg Dexamethason soluble water  
entsprechend 30 mg Dexamethason  
1b: Vergleichsgel mit 461,5 mg der Trägersubstanz 2HBC.

*Zu sehen ist deutlich die Trübung durch Dexamethason im Gegensatz zum Vergleichsgel, sowie die Formstabilität beider Gele.*

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde das PBS, in welchem die Gele eingelegt waren, als Probe entnommen und durch neues PBS ersetzt.

In den Proben sollte die Extinktion der abgegebenen Substanzen gemessen werden und durch Subtraktion der Extinktion der Proben des Vergleichsgels die Menge an abgegebenem Dexamethason abzüglich von Störfaktoren, welche aus beiden Gelen abgegeben wurden, berechnet werden. Die langsame Abgabe des Dexamethason führte zu einer zunehmenden Entfärbung der Gele von außen nach innen.



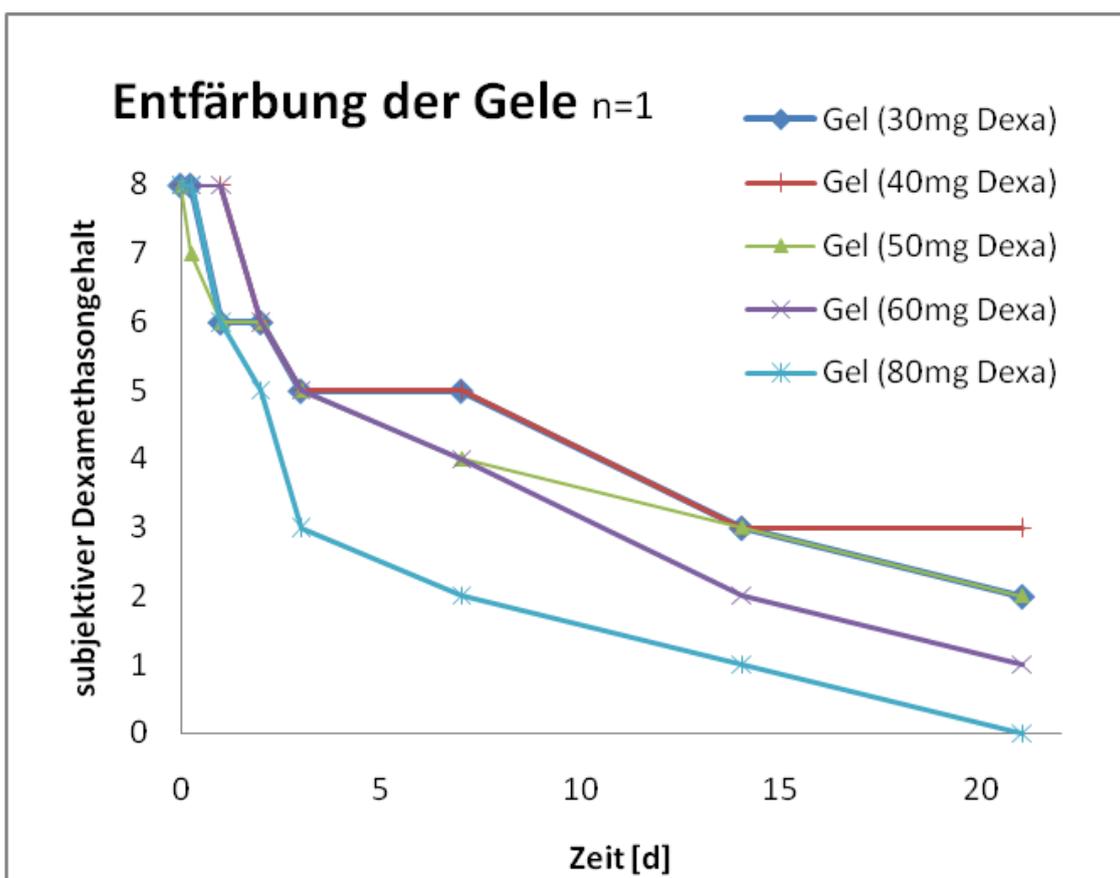
**Abb. 8:** *Entfärbung des Gels mit 461,5 mg Dexamethason soluble water entsprechend 30 mg Dexamethason aus Abb. 7 über einen Zeitraum von zweieinhalb Wochen.*

*Es kann beobachtet werden, dass die Entfärbung von außen nach innen geschieht.*

Die Geschwindigkeit der Aufklärung war dabei abhängig von der initial zugegebenen Menge an Dexamethason. Je höher die Zugabe zu Beginn, desto schneller entfärbte sich das Gel. Dies hing vermutlich mit der geringeren Formstabilität zusammen. Eine vollständige Entfärbung war nach drei bis vier Wochen eingetreten.

**Tabelle 6:** Tabelle zur Einteilung der Entfärbung der Gele. Je höher die Zahl, desto trüber war das Gel.

Zahl	Erscheinung der Gele
0	klar
1	Zentral leicht trüb
2	2/3 entfärbt
3	1/2 entfärbt
4	1/3 entfärbt
5	Rand komplett entfärbt
6	Rand teilweise entfärbt
7	Rand sehr leicht entfärbt
8	weiß, trüb



**Abb. 9:** Geschätzte Trübung der Gele (vgl. Tabelle 6).

*Je höher die Zugabe zu Beginn, desto schneller entfärbte sich das Gel. Dies war besonders deutlich ab einem Dexamethasongehalt von 60 mg und 80 mg, weshalb vermutlich ein Zusammenhang mit der schlechteren Formstabilität vorliegt.*

### 3.2 Photometrische Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge

Die Fragestellung dieses Versuchs war, die Menge an aus dem Gel abgegebenem Dexamethason pro Zeit. In Anlehnung an die Versuche von Spitzer et. al 2008 wurde eine photometrische Messung bei  $\lambda = 239$  nm durchgeführt um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Hierfür wurden die Proben wie in 2.2.2 beschrieben verdünnt und ihre Extinktion gemessen.

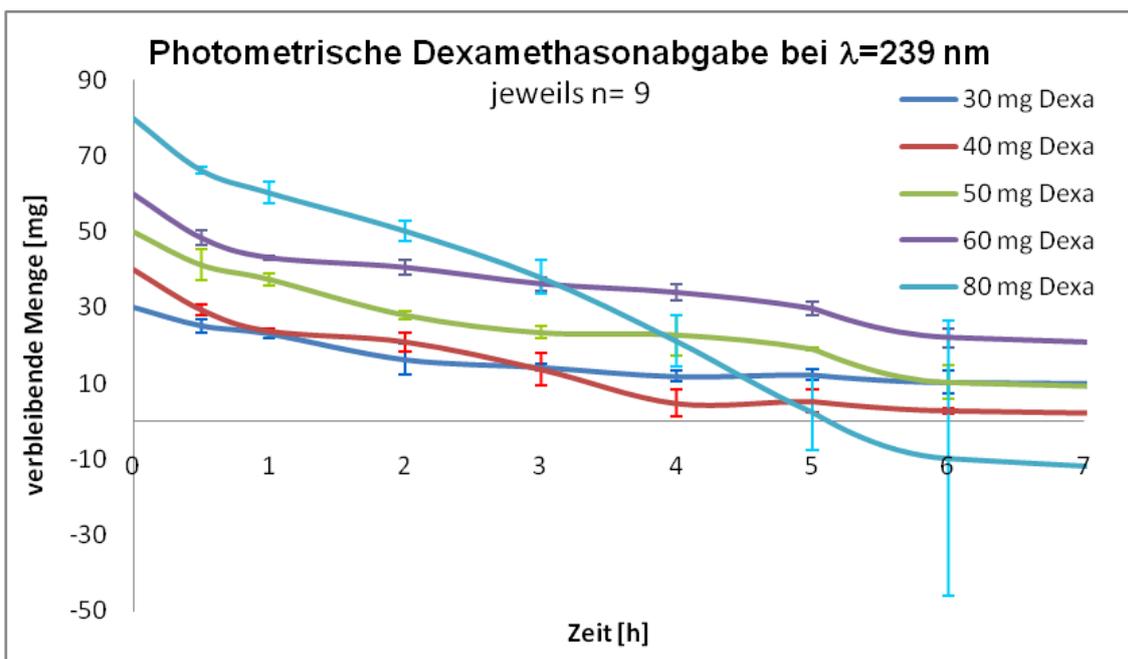
Zur Berechnung der enthaltenen Menge an Dexamethason wurde jeweils die gemessene Extinktion des 2HBC Gels von der des Gels mit Dexamethason soluble water subtrahiert und dieser Wert durch die Formel der erstellten Eichreihe umgerechnet. So ergaben sich pro Gel neun Messwerte ( $n = 9$ ). Das Ergebnis wurde von der bei der letzten Probe vorhandenen Dexamethasonmenge im Gel subtrahiert. Die verbleibende Menge an Dexamethason im Gel in Abhängigkeit zur Zeit wurde graphisch dargestellt. Hierbei kam es erwartungsgemäß zu einem anfänglichen Flush mit anschließender beinahe linearer Abnahme der verbleibenden Menge. Nach drei Stunden war etwa die Hälfte abgegeben worden. In dem Gel mit anfangs 30 mg Dexamethason wurden zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 14,29 mg verbleibende Menge mit einer Standardabweichung von 0,93 mg berechnet. Im Gel mit 40 mg Dexamethason errechnete sich eine durchschnittliche verbleibende Menge von 13,72 mg mit einer Standardabweichung von 4,24 mg. Bei initial 50 mg Dexamethason verblieben 23,36 mg mit 1,61 mg Standardabweichung. 36,27 mg errechneten sich bei dem Gel mit 60 mg Dexamethason mit einer Standardabweichung von 1,72 mg. Das Gel mit 80 mg Dexamethason enthielt noch 38,01 mg mit einer Standardabweichung von 4,49

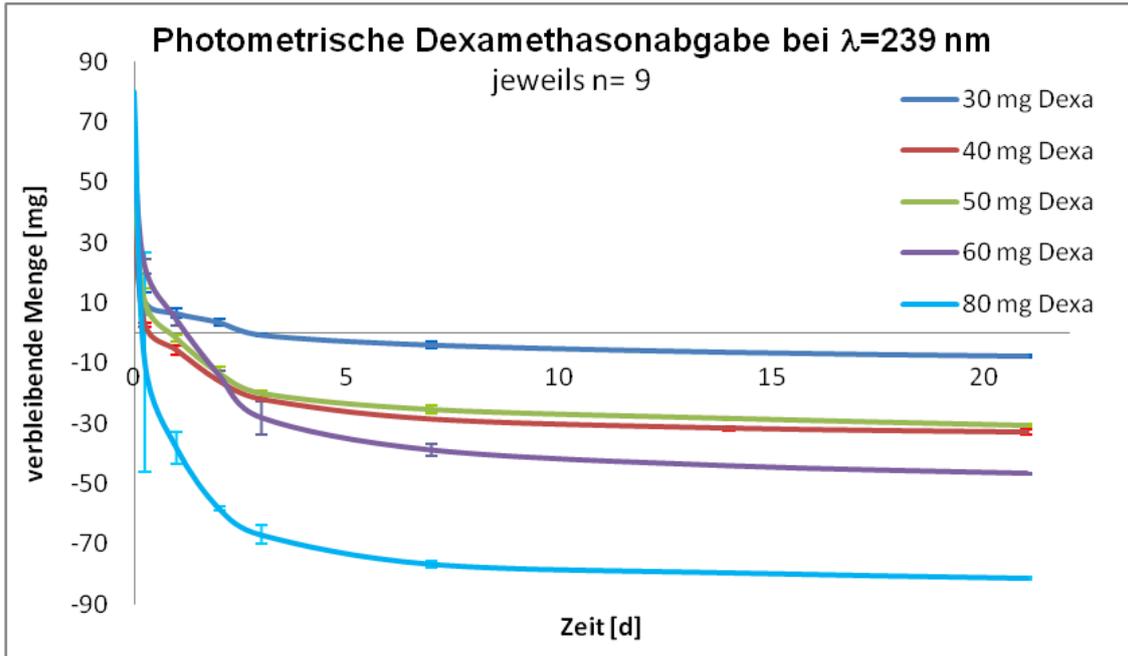
mg. Da sich durch diese Art der Messung und Berechnung bei einem Großteil der Gele bereits nach sechs Stunden und spätestens nach einem Tag kein Dexamethason mehr in den Gelen befinden dürfte scheint hier ein Fehler vorzuliegen. Die Gele mit Dexamethason waren auch nach dieser Zeit deutlich trüber als die Gele mit 2HBC. Es konnte eine Abgabe an Dexamethason von bis zu drei Wochen beobachtet werden.

Im Vergleich untereinander zeigten die unterschiedlichen Gele mit Variationen der Dexamethasonmenge einen annähernd parallelen Verlauf zueinander.

Das Phänomen der erhöhten Abgabe war bei den unterschiedlichen zugegebenen Mengen ähnlich. Aus der Reihe fiel die Kurve des Gels mit 80 mg Dexamethason, obwohl diese bereits über zwei Versuche gemittelt worden war. Als Ursache wurde die deutliche Instabilität des Gels angenommen.

Durch die Menge an Dexamethason wurde die Quervernetzung erschwert.



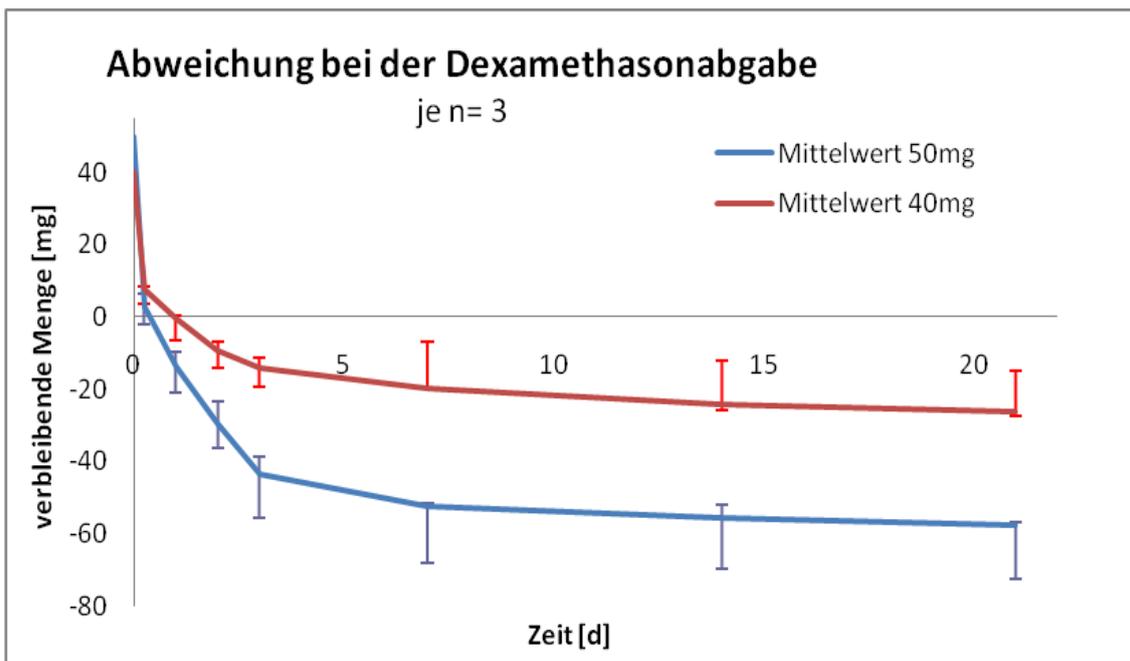
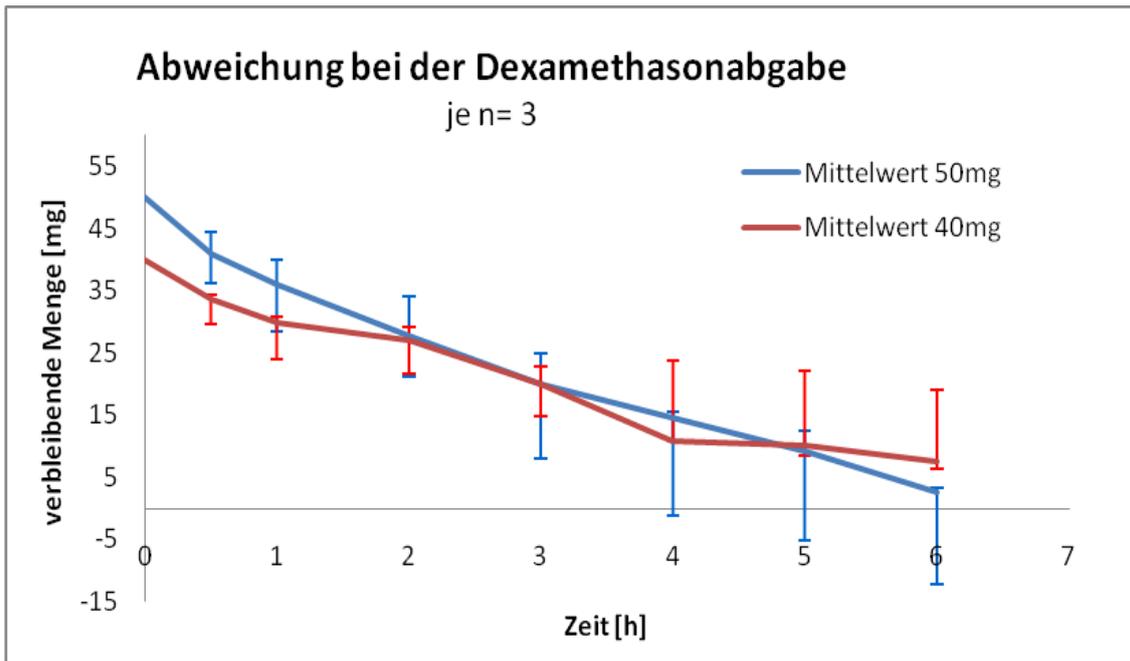


**Abb. 10:** a: Vergleich der Verläufe der verbleibenden Menge an Dexamethason in Abhängigkeit der Zeit innerhalb der ersten sechs Stunden

b: Vergleich der Verläufe der verbleibenden Menge an Dexamethason in Abhängigkeit der Zeit im Verlauf von drei Wochen.

Man erkennt den recht parallelen Verlauf, sowie die theoretische Abgabe von bis zu doppelt so viel Dexamethason wie ursprünglich zugegeben. Da dies nicht möglich sein kann scheint hier ein Fehler vorzuliegen.

Es wurden jeweils drei Gele mit 40 mg und 50 mg Dexamethason hergestellt und getestet. Wie bei den vorigen Gelen wurde ein Diagramm erstellt. Es wurde mit  $n = 3$  ein Mittelwert errechnet und die jeweiligen Abweichungen dargestellt. Der Verlauf mit einer Abgabe über bis zu drei Wochen und der scheinbar doppelten Menge der anfänglichen Zugabe war ähnlich. Es konnte eine deutliche Abweichung gesehen werden.



**Abb. 11:** a: Vergleich der Abgabe aus je drei Gelen mit 40 mg (rot) bzw. 50 mg (blau) zugegebenem Dexamethason nach sechs Stunden  
 b: Vergleich der Abgabe aus je drei Gelen mit 40 mg (rot) bzw. 50 mg (blau) zugegebenem Dexamethason nach drei Wochen.  
 Es zeigt sich ein ähnlicher Verlauf mit einer deutlichen Abweichung.

Bei der Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge durch die Extinktionsmessung ergaben sich negative Werte. Da dies nicht möglich sein kann wurde nach möglichen Störfaktoren gesucht. Eine mögliche Erklärung ist, dass außer Dexamethason noch mindestens ein weiterer Stoff abgegeben wurde, welchen man photometrisch bei 239 nm messen kann. Um dies weiter zu verfolgen wurden weitere Versuche durchgeführt. Zusätzlich wurden andere Methoden zur Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge angewandt, da die Methode von Spitzer et. al in diesem Fall nicht praktikabel war.

### 3.3 Extinktionsspektren

Mit diesem in 2.2.3 beschriebenen Versuch sollte die Störkomponente der vorherigen Versuche ermittelt werden. Hierzu wurden Extinktionsspektren von  $\lambda = 200$  nm bis  $\lambda = 400$  nm erstellt. Dies geschah von den verschiedenen Komponenten zur Herstellung der Gele, sowie von dem die unterschiedlichen Gele umgebenden PBS. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Werte um  $\lambda = 239$  nm gelegt.

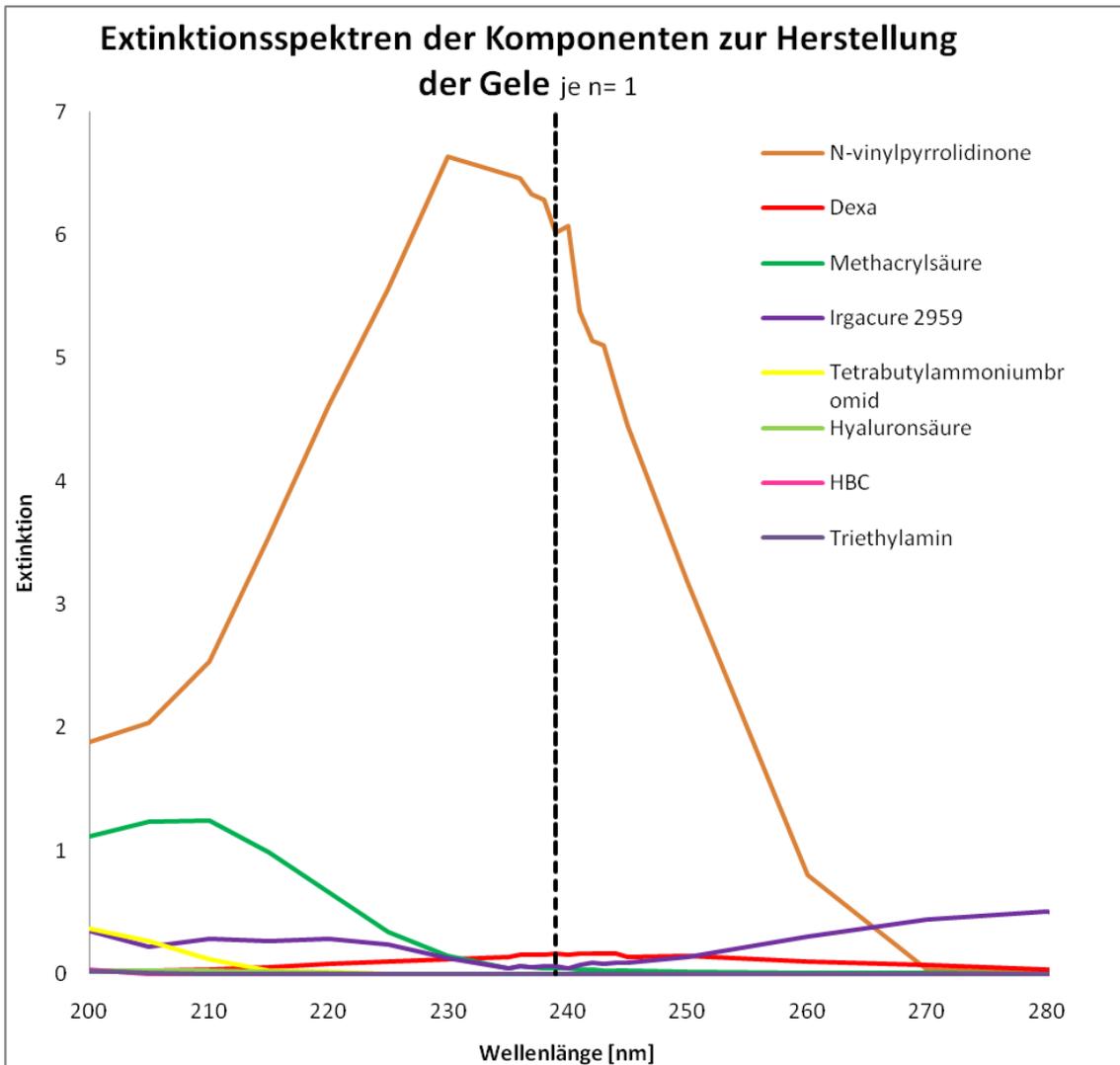
#### 3.3.1 Komponenten zur Herstellung der Gele

Die Komponenten lagen wie in 2.2.3 erklärt in der gleichen Verdünnung wie in den fertigen Gelen vor. Triethylamin, 2HBC und HA waren im gemessenen Wellenlängenbereich von  $\lambda = 200 - 400$  nm photometrisch nicht messbar. Bei Tetrabutylammoniumbromid gab es einen Extinktionsausschlag, dieser lag jedoch mit 3,7 bei  $\lambda = 200$  nm, war stark abfallend und verlief bei einer Wellenlänge über  $\lambda = 220$  nm gegen 0. Ähnlich verhielt sich Methacrylsäure mit einer Spitze (Peak) von 1,24 um  $\lambda = 210$  nm und einem Abfall bis etwa  $\lambda = 230$  nm auf eine Extinktion von maximal 0,06. Wie bereits mehrfach in der Literatur

beschrieben liegt bei Dexamethason ein Extinktionspeak bei  $\lambda = 239$  nm [Cheng CK et al. 1995; Spitzer MS et al. 2008; Szurman P et al. 2007].

Dies bestätigte sich in dieser Versuchsreihe mit einer maximalen Extinktion von 0,16 bei  $\lambda = 239$  nm. Das Gegenteil zeigte sich bei Irgacure 2959. Hier konnte eine deutliche Reduktion der Extinktion zwischen  $\lambda = 235$  nm und  $\lambda = 245$  nm unter 0,1 beobachtet werden. Einzig bei 1-vinyl-2-pyrrolidinone wurde ebenfalls ein Peak zwischen  $\lambda = 230$  nm und  $\lambda = 240$  nm gemessen. Dieser lag mit einer Extinktion von über 6 um ein Vielfaches höher als die bei Dexamethason gemessene Extinktion von 0,16 und über den Extinktionen der anderen Komponenten.

Über  $\lambda = 280$  nm gingen alle Messwerte gegen Null, außer bei Irgacure, welches noch eine Extinktion von 0,5 zeigte. Diese war bis zu einer Wellenlänge von  $\lambda = 350$  nm ebenfalls nicht mehr messbar.

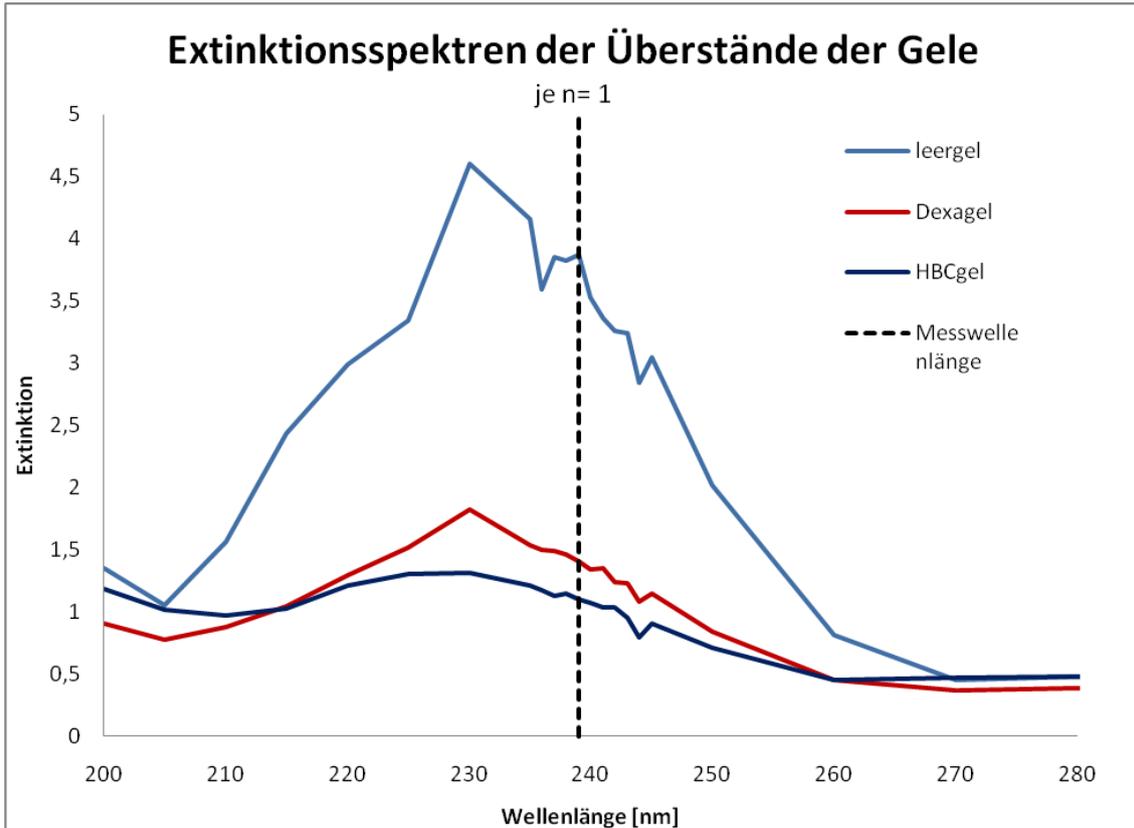


**Abb. 12:** Der Vergleich der Extinktionsspektren der Komponenten der Gele bestätigte den in der Literatur beschriebenen Peak von Dexamethason bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 239 \text{ nm}$ . Bei dieser Wellenlänge zeigte 1-vinyl-2-pyrrolidinone eine Extinktion von 6. Dies war um ein Vielfaches höher, als die Extinktion von Dexamethason mit 0,16 an dieser Stelle. Der Peak des 1-vinyl-2-pyrrolidinone lag mit 6,63 bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 230 \text{ nm}$ . Die Extinktionen der anderen Komponenten lagen bei  $\lambda = 239 \text{ nm}$  unter 0,1.

### 3.3.2 Umgebendes PBS

Die Proben des PBS, in welchem die Gele eingelegt waren, wurden bei der Erstellung der Extinktionsspektren wie in 2.2.3 beschrieben nur 1: 100 verdünnt. Die PBS – Probe des Leergels zeigte durchgehend die höchste Extinktion mit einem deutlichen spitzen Peak von 4,6 bei  $\lambda = 230$  nm. Die Proben der Gele mit Dexamethason (Dexagel) bzw. 2HBC (2HBCgel) hatten einen flacheren Verlauf. Das Maximum lag aber auch bei diesen um  $\lambda = 230$  nm. Gleichzeitig war bei dieser Wellenlänge die Differenz zwischen den Gelen am größten.

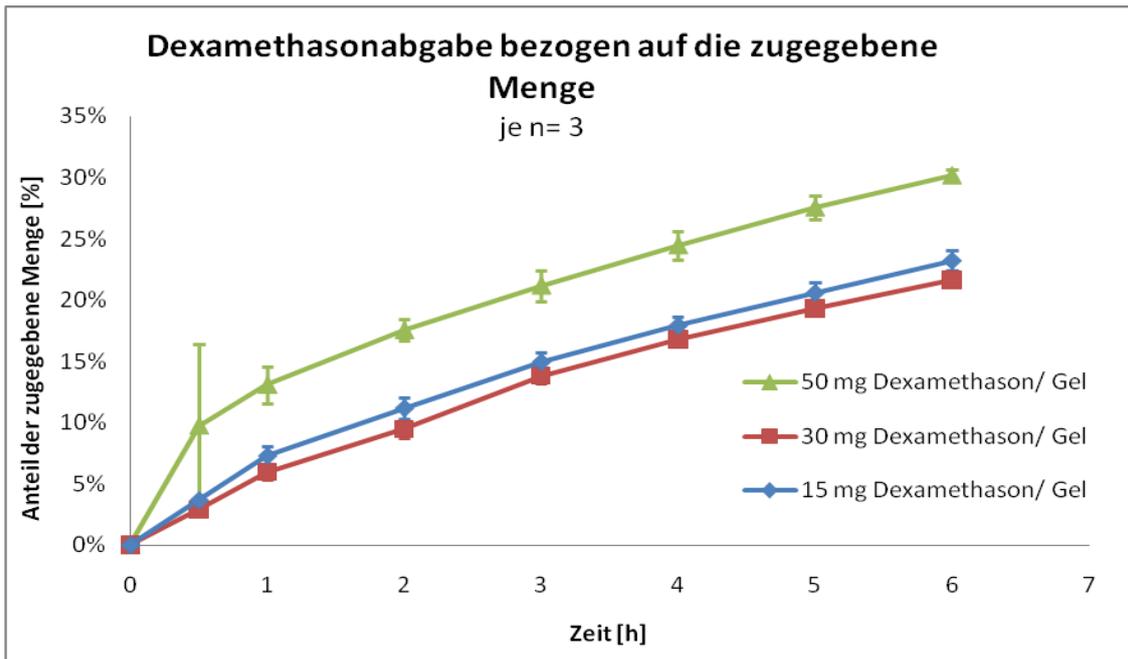
Das Gel mit Dexamethason hatte dabei einen deutlicheren Peak von 1,8 gegen eine Extinktion von 1,3 des 2HBCgels. Das Dexagel zeigte einen steileren Anstieg und Abfall der Extinktionswerte bei einer Wellenlänge um  $\lambda = 230$  nm. Auffällig war, dass die maximale Extinktion bei allen Proben bei etwa 230 nm lag. Dies entsprach dem deutlichen Peak im Extinktionsspektrum von 1-vinyl-2-pyrrolidinone (siehe 3.3.1 und Abb.12) und ließ vermuten, dass es sich hierbei um das störende Agens der Messungen handelte.



**Abb. 13:** Im Vergleich der Extinktionen des umgebenden PBS wird deutlich, dass das Leergel mit einem Peak von 4,6 am meisten Stoffe mit einer hohen Extinktion abgibt. Zwischen ihm und den Gelen mit Dexamethason und 2HBC besteht ein großer Unterschied, während die Differenz dieser beiden mit 1,8 und 1,3 deutlich geringer ist. Die Maxima liegen bei allen drei Gelen bei  $\lambda = 230$  nm, was dem Extinktionspeak von 1-vinyl-2-pyrrolidinone (vgl. Abb. 12) entspricht.

### 3.4 HPLC zur Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge

Um die tatsächliche Menge an abgegebenem Dexamethason bestimmen zu können, wurde wie in 2.2.4 beschrieben eine HPLC durchgeführt. Die Abgabe des Dexamethason wurde mit  $n = 3$  in Prozent der anfangs enthaltenen Menge berechnet und die Werte wurden entsprechend in einem Schaubild dargestellt.



**Abb. 14:** Dexamethasonabgabe pro Zeit bezogen auf die zugegebene Menge. Man erkennt die gute Deckung der Gele mit 15 mg und 30 mg sowie eine sehr große Standardabweichung von 6,63% des Gels mit 50 mg bei 30 Minuten und den anschließenden parallelen Verlauf.

Um eine bessere Darstellung der weiteren Werte zu erreichen wurde die Standardabweichung des Gels mit 50 mg bei 30 Minuten angepasst.

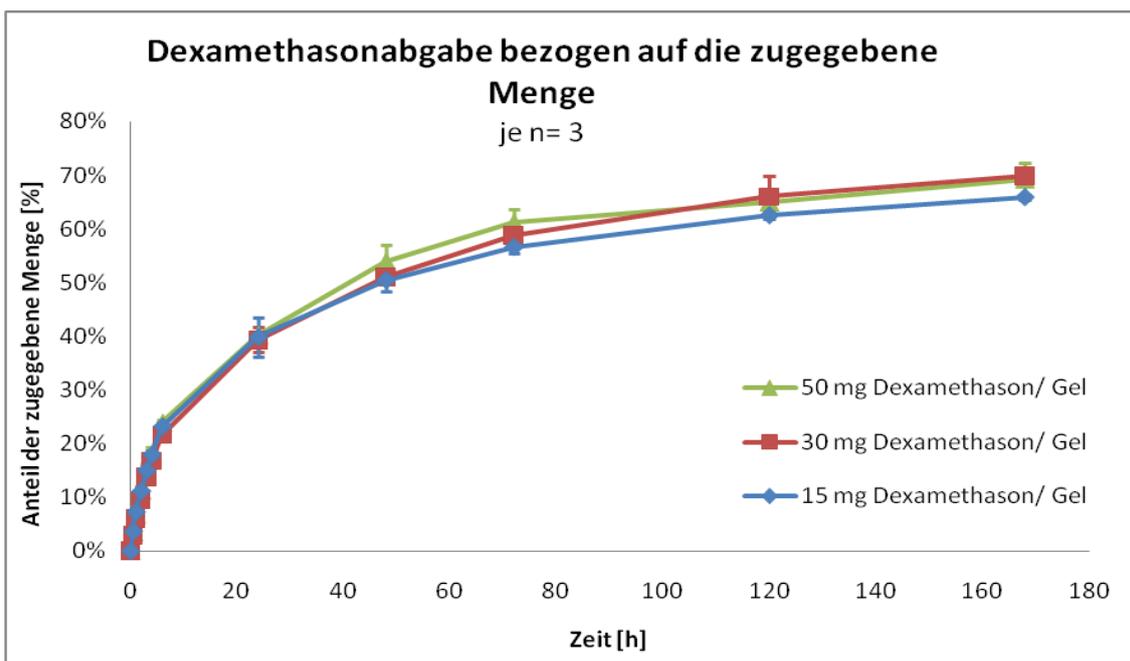
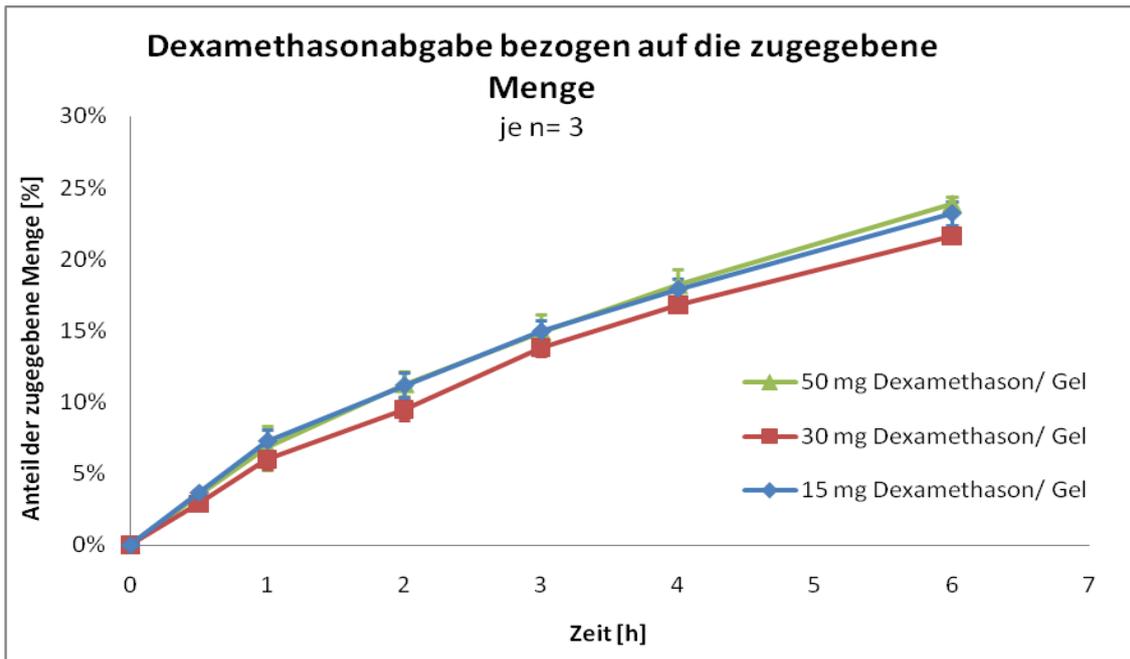
Die Mehrabgabe mit auffällig großer Standardabweichung von 6,63% könnte auf die erhöhte Forminstabilität des Gels zurückzuführen sein. Es wurde erneut ein Schaubild erstellt. Dieses zeigte zu Beginn einen Flush mit einer Abgabe von 7,3% der Ausgangsmenge des Gels mit 15 mg Dexamethason mit einer Standardabweichung von 0,8% und von 6% der Ausgangsmenge des Gels mit 30 mg mit einer Standardabweichung von 0,6% in der ersten Stunde.

Durch die Korrektur errechnete sich für das Gel mit 50 mg eine Abgabe von 6,8% mit einer Standardabweichung von 1,5%.

Nach 6 Stunden waren aus dem Gel mit anfangs 15 mg Dexamethason 23,2% mit einer Standardabweichung von 0,8%, aus dem Gel mit 30 mg 21,6% mit 0,5% Standardabweichung und aus dem korrigierten Gel mit 50 mg 23,9% mit

0,5% Standardabweichung abgegeben worden. 39,8% mit 3,6% Standardabweichung waren es nach einem Tag bei dem Gel mit 15 mg, 39,3% mit 2,3% Standardabweichung bei dem Gel mit 30 mg und bei dem korrigierten Gel mit 50 mg betrug die Abgabe nach einem Tag 40,2% mit einer Standardabweichung von 1,6%. Ab hier verringerte sich die Abgabe deutlich. Nach zwei Tagen waren aus dem Gel mit anfangs 15 mg Dexamethason 50,5% mit 2% Standardabweichung, aus dem Gel mit zu Beginn 30 mg Dexamethason 51% mit 1,3% Standardabweichung und 53,9% mit einer Standardabweichung von 3% aus dem 50 mg Gel mit Korrektur abgegeben worden. Bei der Messung nach einer Woche lag die Abgabe aus dem Gel mit 15 mg bei 65,9% mit einer Standardabweichung von 0,4%, aus dem 30 mg Gel bei 69,9% mit 1,2% als Standardabweichung und das Gel mit 50 mg hatte nach der Korrektur 69,3% mit einer Standardabweichung von 3,0 % abgegeben.

Es zeigte sich, dass alle Gele in der gleichen Zeit etwa denselben Prozentsatz der zugegebenen Dexamethasonmenge abgaben. Das Gel mit 50 mg Dexamethason hatte nach 30 Minuten eine stärkere Abgabe mit einer großen Standardabweichung, was vermutlich auf die Forminstabilität zurückzuführen ist. Zu Beginn war die Abgabe bei allen Gelen deutlich größer. Nach einem Tag waren 40% abgegeben. Anschließend wurde die Abgabe weniger bis nach einer Woche etwa 60 – 70% abgegeben worden waren.



**Abb. 15:** Dexamethasonabgabe pro Zeit in Prozent der zu Beginn zugegebenen Menge mit Anpassung der Messung nach 30 Minuten des Gels mit 50 mg Dexamethason.  
 a: Abgabe im Verlauf der ersten 6 Stunden.  
 b: Abgabe über einen Zeitraum von einer Woche.

*Es lässt sich feststellen, dass die Kurven beinahe deckungsgleich sind. Zu Beginn war die Abgabe mit 7% der Ausgangsmenge in der ersten Stunde, 23% nach 6 Stunden und 40% nach einem Tag größer. Anschließend verringerte sich die Abgabe deutlich. Nach zwei Tagen waren im Mittel 52% des Dexamethason abgegeben worden und bei der Messung nach einer Woche lag die Abgabe bei 65 – 70%.*

### 3.5 Testung der biologischen Wirksamkeit des abgegebenen Dexamethason

Es wurde getestet, ob mit Hilfe der biologischen Wirksamkeit auf die Dexamethasonmenge geschlossen werden kann bzw. ob das quervernetzte Dexamethason seine biologische Wirksamkeit behält. Hierzu wurde der MTT – Test, wie in 2.2.6 beschrieben, verwendet.

#### 3.5.1 Eichreihen

Es wurden je zwei Eichreihen aus jeweils  $n = 12$  Einzelwerten nach einem und nach drei Tagen erstellt und der Mittelwert gebildet. Dieser wird im Weiteren als Eichreihe bezeichnet. Abgebildet wurden die Unterschiede der optischen Dichte (OD), dargestellt in Prozent lebender Zellen, bezogen auf die Zahl der lebenden Zellen ohne Dexamethasonzugabe. Sie wurden in Abhängigkeit von der zugegebenen Dexamethasonkonzentration dargestellt.

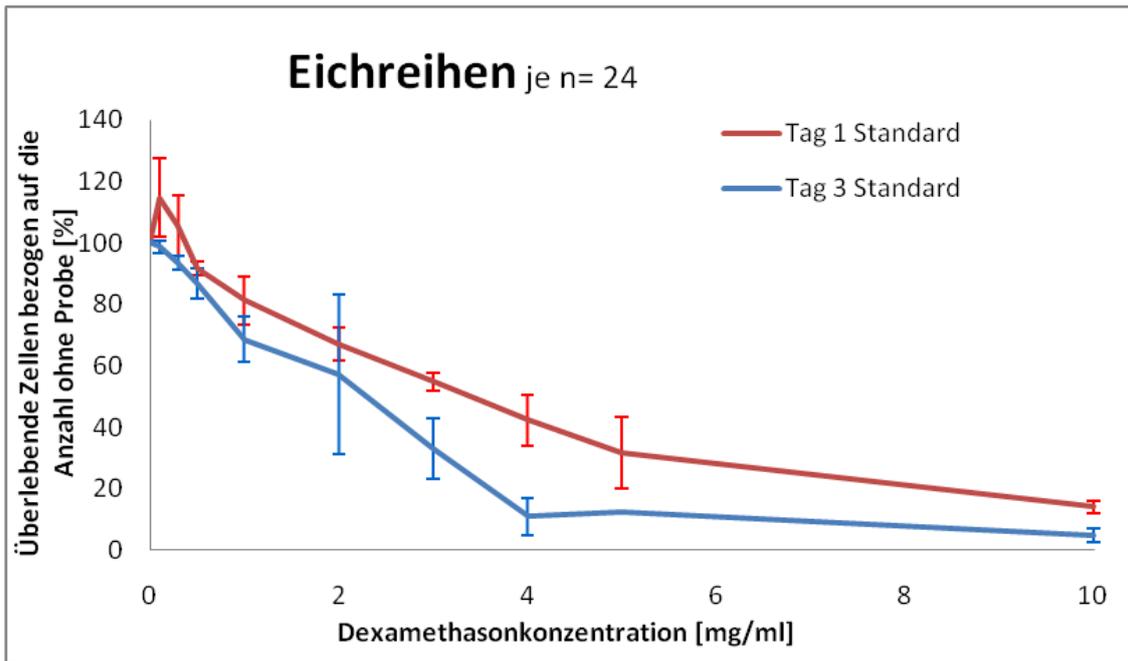
Die Eichreihe nach einem Tag konnte in drei Abschnitte unterteilt werden.

Zu Beginn zeigte sich eine leichte proliferative Wirkung des Dexamethason. Diese war bereits ab einer Konzentration von 0,1 mg/ml wieder rückläufig und bei 0,3 mg/ml entsprach die Zellzahl ungefähr der ohne Dexamethasonzugabe. Die folgenden Phasen waren unterschiedlich steile lineare Abnahmen der lebenden Zellen.

Bis zu einer Konzentration von etwa 5 mg/ml war die Abnahme des Anteils lebender Zellen bis auf 32% mit einer Standardabweichung von 11,5% wesentlich steiler als der nachfolgende Abfall. Hier konnte man einen Zellverlust bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml auf 14% lebende Zellen mit 1,28% als Standardabweichung beobachten.

Die Eichreihe nach drei Tagen konnte ebenfalls in zwei Abschnitte geteilt werden. Hier konnte bis zu einer Konzentration von 4 mg/ml ein annähernd linearer Abfall der überlebenden Zellen beobachtet werden, jedoch war dieser deutlich steiler als nach einem Tag. Durch den Vergleich mit der Überlebensrate ohne Dexamethasonzugabe nach drei Tagen war mit etwa 12% lebender Zellen mit einer Standardabweichung von 4,26% der Einfluss von Dexamethason noch ausgeprägter. Noch höhere Konzentrationen führten zu einem wesentlich flacheren Abfall. Bei einer zugegebenen Konzentration von 10 mg/ml waren noch 3% lebende Zellen mit 2,16% als Standardabweichung messbar. Absolut gab es ohne Dexamethason nach drei Tagen etwas mehr lebende Zellen als nach einem Tag, was auf die Proliferation zurückzuführen ist.

Da der Unterschied aber nicht besonders groß war, kann von einer annähernden Sättigung nach einem Tag ausgegangen werden.



**Abb. 16:** *Eichreihen nach einem Tag (rot) und drei Tagen (blau). Dargestellt wurde die Wirkung der unterschiedlichen Dexamethasonkonzentrationen auf die ARPE 19 Zellen abgebildet in Prozent der lebenden Zellen ohne Dexamethasonzugabe. In der Eichreihe nach einem Tag fand sich zusätzlich bei sehr kleinen Mengen Dexamethason ein leicht proliferativer Effekt. Ab einer Konzentration von 0,1 mg/ml war dieser jedoch wieder rückläufig und bei 0,3 mg/ml entsprach die Zellzahl ungefähr der ohne Dexamethasonzugabe. Anschließend fiel die Zellzahl bis zu einer Konzentration von 5 mg/ml steil auf 32% lebenden Zellen ab, während der Abfall bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml auf 14% deutlich flacher war. Bei der Eichreihe nach drei Tagen war diese Verteilung noch ausgeprägter. Der steile Abfall bis zu einer Konzentration von 4 mg/ml reduzierte die Zellzahl auf 12% und bei einer Konzentration von 10 mg/ml lebten noch 3% der Zellen verglichen mit der Kontrolle.*

### 3.5.2 Proben

Auf der Grundlage des ersten Abschnitts der Eichreihen aus 3.5.1 wurde jeweils eine Regressionsgerade erstellt und daraus die Menge des biologisch wirksamen Dexamethason errechnet. Dieser Wert wurde mit den anhand der Extinktion errechneten und den nach HPLC bestimmten Konzentrationen verglichen.

Hierzu wurde eine Tabelle erstellt in welcher für die unterschiedlichen Proben (vgl. Tabelle 5) die jeweils durch die drei Verfahren bestimmten Mengen an Dexamethason verglichen wurden.

Es zeigte sich, dass für die unterschiedlichen Proben mit Hilfe der HPLC die geringste Dexamethasonmenge berechnet wurde. Die anhand der Extinktionen ermittelten Konzentrationen waren meist etwa doppelt so groß. Hierdurch erhärtete sich die Vermutung, dass neben dem abgegebenen Dexamethason auch 1-vinyl-2-pyrrolidinone abgegeben wurde, da dies wie in 3.3.1 gezeigt bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 239$  nm ebenfalls eine starke Extinktion hat. Die Extinktionsmessung eignet sich deshalb nicht zur Quantifizierung der abgegebenen Dexamethasonmenge.

Da die Mengen an Dexamethason welche durch den MTT- Test bestimmt wurde meist am höchsten war muss von einer toxischen Wirkung des 1-vinyl-2-pyrrolidinone ausgegangen werden, wie sie von Frank et al. bereits beschrieben wurde [Frank C. 2010]. Nach drei Tagen waren die Ergebnisse ähnlich wie nach einem Tag. Somit war es nicht möglich, anhand der überlebenden Zellen auf die Konzentration an freigesetztem Dexamethason zu schließen.

*Tabelle 7: a: Vergleich der auf unterschiedliche Weise bestimmten Dexamethasonmengen bezogen auf die Prozent überlebender ARPE19 – Zellen nach einem Tag.*

<b>Probe nach einem Tag</b>	<b>Nach HPLC bestimmte Menge [mg] n = 3</b>	<b>Anhand der Extinktion errechnete Menge [mg] n = 9</b>	<b>Errechnete Menge nach MTT [mg] n = 12</b>	<b>Überlebende Zellen bezogen auf die Anzahl ohne Probe [%]</b>
<b>P 1</b>	1,36	3,73	5,21	107,04
<b>P 2</b>	1,60	4,03	11,44	97,45
<b>P 3</b>	4,80	6,65	21,91	81,34
<b>P 4</b>	6,76	9,87	32,27	65,42
<b>P 5</b>	8,45	15,21	25,04	76,53
<b>P 6</b>	1,70	15,31	1,72	112,41
<b>P 7</b>	3,55	23,46	16,44	89,77
<b>P 8</b>	6,0	24,07	18,36	86,81
<b>P 9</b>	1,25	1,75	3,11	110,28
<b>P 10</b>	2,84	5,24	16,56	89,58
<b>P 11</b>	1,65	8,56	16,92	89,03
<b>P 12</b>	4,80	8,86	25,09	76,46
<b>P 13</b>	6,0	12,29	5,81	106,11
<b>P 14</b>	3,55	12,29	42,96	48,96
<b>P 15</b>	8,45	21,35	47,18	42,47

*b: Vergleich der auf unterschiedliche Weise bestimmten Dexamethasonmengen bezogen auf die Prozent überlebender ARPE19 – Zellen nach drei Tagen.*

*Die nach HPLC bestimmte Menge aus Versuch 2.2.4 lag deutlich unter der durch den MTT – Test bestimmten aus Versuch 2.2.6. Dies spricht für eine toxische Wirkung, da kleinere Mengen bereits eine starke Wirkung haben.*

*Die anhand der Extinktion aus Versuch 2.2.2 errechnete Menge lag meist doppelt so hoch wie die durch die HPLC bestimmte, was die Vermutung erhärtete, dass ebenfalls 1-vinyl-2-pyrrolidinone abgegeben wurde, was bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 239$  nm ebenfalls eine große Extinktion zeigt (vgl. 3.3.1).*

*Es wird deutlich, dass weder anhand der gemessenen Extinktion noch auf Grund der überlebenden Zellen ein Rückschluss auf die abgegebene Menge an Dexamethason gezogen werden kann.*

*Nach drei Tagen waren die Ergebnisse ähnlich.*

<b>Probe nach drei Tagen</b>	<b>Nach HPLC bestimmte Menge [mg] n = 3</b>	<b>Anhand der Extinktion errechnete Menge [mg] n = 9</b>	<b>Errechnete Menge nach MTT [mg] n = 12</b>	<b>Überlebende Zellen bezogen auf die Anzahl ohne Probe [%]</b>
<b>P 1</b>	1,36	3,73	15,45	64,55
<b>P 2</b>	1,60	4,03	12,94	70,13
<b>P 3</b>	4,80	6,65	17,21	60,64
<b>P 4</b>	6,76	9,87	24,58	44,28
<b>P 5</b>	8,45	15,21	31,37	29,18
<b>P 6</b>	1,70	15,31	26,08	40,94
<b>P 7</b>	3,55	23,46	21,52	51,06
<b>P 8</b>	6,0	24,07	30,37	31,41

<b>P 9</b>	1,25	1,75	-30,84	167,43
<b>P 10</b>	2,84	5,24	-11,50	124,44
<b>P 11</b>	1,65	8,56	-4,55	108,99
<b>P 12</b>	4,80	8,86	7,52	82,19
<b>P 13</b>	6,0	12,29	13,53	68,82
<b>P 14</b>	3,55	12,29	25,44	42,36
<b>P 15</b>	8,45	21,35	12,09	72,01

### 3.6 Herstellung von Hyaluronsäuregelen mit unterschiedlichen Bevacizumabmengen

Dieser Versuch mit Bevacizumab wurde ähnlich aufgebaut wie der mit Dexamethason. Es wurden ebenfalls runde Gele aus quervernetzter Hyaluronsäure mit einem Innendurchmesser von ca. 22,5 mm und einer Höhe von ca. 17,0 mm hergestellt (siehe 2.2.6). Ihnen wurden vor der Bestrahlung mit UV – Licht 10 mg, 12,5 mg oder 15 mg Bevacizumab zugegeben. Um eine ausreichende Formstabilität zu erreichen, war eine längere Belichtung von 15 bis 20 Minuten notwendig. Dabei korrelierte die benötigte Zeit mit der zugegebenen Menge an Bevacizumab. Je mehr Bevacizumab zugegeben wurde, desto länger war die notwendige Bestrahlungsdauer.

Die fertigen Gele waren alle durchsichtig und stabil. Im Inneren der Gele mit 15 mg Bevacizumab konnte man nach der Quervernetzung haardünne ebenfalls durchsichtige Schlieren erkennen, welche die Transparenz nicht einschränkten.

### 3.7 Bevacizumab – ELISA zur Bestimmung der abgegebenen Menge

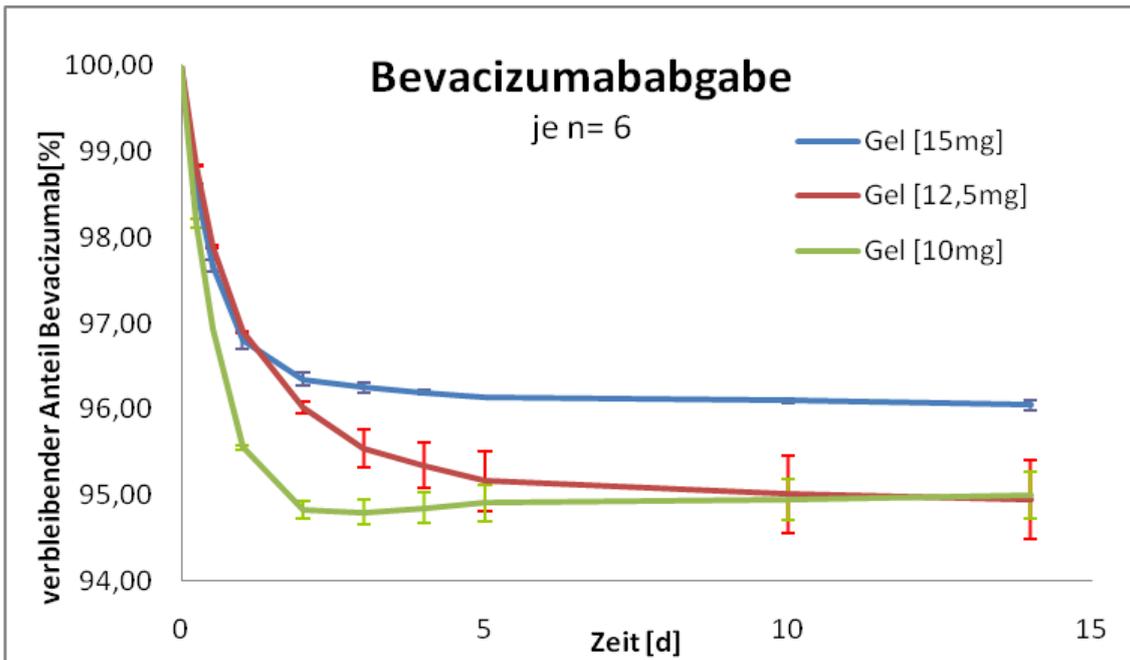
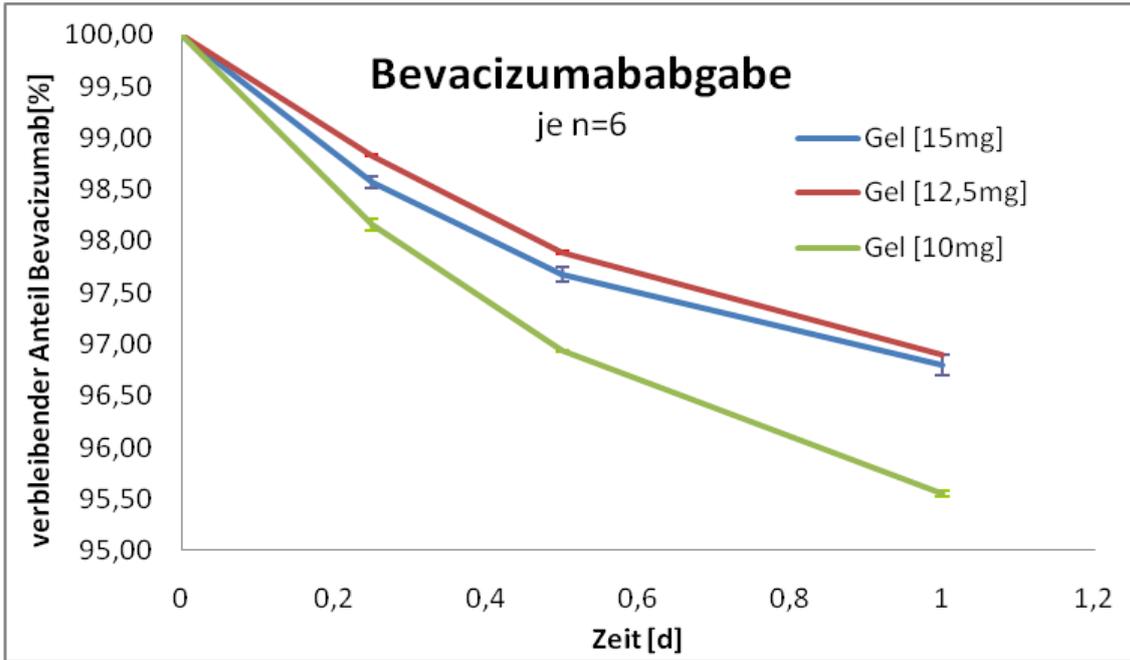
Die Abkürzung ELISA steht für Enzyme-linked Immunosorbent Assay und dient dem Nachweis bestimmter Substanzen mit Hilfe einer enzymatischen

Farbreaktion. In diesem Fall sollte Bevacizumab, ein VEGF – Antikörper, nachgewiesen werden. Anhand verschiedener Antikörperreaktionen war es möglich, auf die abgegebene Menge an Bevacizumab zu schließen.

### 3.7.1 Proben

Da jeweils zwei Gele hergestellt wurden und von jeder Probe drei Werte ermittelt wurden ergibt sich  $n = 6$ . Es wurde der Mittelwert berechnet. Anhand der zugehörigen Eichreihen (vgl. 2.2.9 und Abb.6) wurde die abgegebene Menge ermittelt sowie die verbleibende Menge in Prozent der Ausgangsmenge errechnet. Der Kurvenverlauf der unterschiedlichen Gele war parallel, jedoch nicht deckungsgleich. Es konnte deutlich der erwartete initiale Flush beobachtet werden. Innerhalb des ersten Tages wurden aus dem Gel mit 10 mg etwa 138  $\mu\text{g}$ , aus dem mit 12,5 mg 124  $\mu\text{g}$  und aus dem Gel mit initial 15 mg wurden 131  $\mu\text{g}$  abgegeben. Dies entsprach 3 – 4,5% der zugegebenen Menge. Die Standardabweichungen waren mit Werten unter 0,1% niedrig. Es folgte eine Stagnation der Abgabe nach zwei bis drei Tagen. Zu diesem Zeitpunkt waren insgesamt lediglich 4 – 5% entsprechend 502,5  $\mu\text{g}$  aus dem Gel mit 10 mg zugegebenem Bevacizumab, 558  $\mu\text{g}$  aus dem Gel mit 12,5 mg und 562  $\mu\text{g}$  aus dem Gel mit initial 15 mg abgegeben worden. Hier lagen die Standardabweichungen bei etwa 0,1%. Einzig bei dem Gel mit 12,5 mg war sie nach drei Tagen mit 0,22% etwas erhöht. Anschließend wurde bis zu einer Messung nach zwei Wochen keine weitere Abgabe gemessen, wobei die Standardabweichung bei dem Gel mit 10 mg ab Tag drei zunahm bis 0,268% nach zwei Wochen. Bei dem Gel mit 12,5 mg war die Standardabweichung ebenfalls ansteigend und nach zwei Wochen mit 0,46% am höchsten.

Da es möglich war, das abgegebene Bevacizumab mit Hilfe des spezifischen ELISA – Tests nachzuweisen und dieser auf der Funktion des Antikörpers beruht, konnte davon ausgegangen werden, dass die Wirkung des Medikaments erhalten bleibt.



**Abb. 17:** a: Verbleibende Menge Bevacizumab in Prozent der in die Gele zugegebenen Menge nach einem Tag.  
b: Verbleibende Menge Bevacizumab in Prozent der in die Gele zugegebenen Menge nach zwei Wochen.

*Man konnte einen ähnlichen Verlauf der unterschiedlichen Gele erkennen. Je mehr Bevacizumab ursprünglich zugegeben wurde, desto weniger wurde prozentual abgegeben.*

*Nach einem initialen Flush mit einer Abgabe von 3 – 4,5% der Ausgangsmenge mit niedrigen Standardabweichungen mit Werten unter 0,1% wurde nach zwei bis drei Tagen nur noch sehr wenig abgegeben. Zu diesem Zeitpunkt lag die Abgabe bei 4 – 5% mit Standardabweichungen von etwa 0,1%. Einzig bei dem Gel mit 12,5 mg war sie nach drei Tagen mit 0,22% etwas erhöht. Bis zur Messung nach zwei Wochen konnte keine weitere Abgabe nachgewiesen werden. Die Standardabweichungen der Messungen stiegen etwas an und lagen bei dem Gel mit 15 mg am Ende weiter unter 0,1%, bei dem Gel mit 10 mg bei 0,268% und bei dem Gel mit 12,5 mg mit 0,464% am Höchsten. Die Kurvenverläufe waren parallel, aber nicht deckungsgleich.*

## 4. Diskussion

### 4.1 Der Glaskörper als Medikamententräger

Der häufigste Grund für ein Therapieversagen nach Vitrektomie ist die proliferative Vitreoretinopathie (PVR), bei welcher es zu einer Entzündungsreaktion mit Erhöhung der Durchlässigkeit der Blut – Retina – Schranke und zur Einwanderung von Entzündungszellen, Pigmentepithelzellen(RPE), Astrozyten, Fibroblasten und Makrophagen, Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und Produktion von Matrixproteinen kommt [Cheema RA et al. 2007; Xi L et al. 2014; Zhang X et al. 2015;Sebag J. 2015]. Durch Glaskörperkollagenfasern bauen sie einen Zug auf die Netzhaut auf, der zu deren Ablösung führen kann. Im schlimmsten Fall kann es zur Erblindung kommen [Joussen AM et al. 2007].

Um die Proliferation zu verhindern, wurden verschiedene antiproliferative Substanzen, vor allem Kortikoide, zur Stabilisierung der Blut – Retina – Schranke postoperativ bzw. am Ende der OP dem Glaskörperersatz zugefügt [Cheema RA et al. 2007]. Die Halbwertszeit der meisten Medikamente ist im Auge jedoch mit einigen Stunden viel zu kurz, so dass keine ausreichende Wirkung erzielt werden kann. Dies stellt vor allem bei direkter Injektion ein Problem dar [Guidetti B et al. 2008; Szurman P, Frank C et al. 2009]. Diese müssen in regelmäßigen Abständen, meist monatlich, wiederholt werden, da sie den Glaskörperraum sowohl über die Vorderkammer als auch durch die Retina verlassen [Maurice D. 2001; Kiernan DF, Mieler WF. 2009]. Hierdurch kann es zu Nebenwirkungen wie Linsenverletzungen, Glaskörperblutung, Netzhautablösung oder Endophthalmitis kommen [Wang C et al. 2014]. Die Alternative sind sehr hohe Dosen, die zwar effektiv sind, jedoch treten Nebenwirkungen wie die Entwicklung von Katarakt, Glaskörperblutungen, Endophthalmitis, Ptosis und Netzhautablösungen oder die Erhöhung des Augeninnendrucks, verstärkt durch Entzündungen bis hin zum Glaukom besonders häufig auf [Berger AS et al. 1996; Mansoor S, Kuppermann BD,

Kenney MC. 2009]. Im Intervall kommt es zusätzlich zu Sehschärfenverlust [Brumm MV, Nguyen QD. 2007].

Besser wäre deshalb ein Medikamentendepot mit einer verzögerten Freisetzung, wodurch eine annähernd konstante Wirkkonzentration über einen längeren Zeitraum möglich wäre. Mit einem Release – System könnte dies realisierbar sein. Die Zellen wären dann nicht dem Stress der sich laufend ändernden Medikamentenkonzentration ausgesetzt [Kiernan DF, Mieler WF. 2009]. Auch die Gefahr der toxischen Wirkung durch zu hohe Dosen wäre geringer, die Inzidenz von Infektionen und dadurch Entwicklung einer Endophthalmitis niedriger. Durch häufige Injektion sind diese Risiken deutlich erhöht [Guidetti B et al. 2008].

Als mögliche Release – Implantate stehen biologisch abbaubare und nicht abbaubare Trägersubstanzen zur Verfügung. Zu den nicht abbaubaren gehören Polyvinylalkohol und Ethylvinylacetat. Bei der Abgabe von Medikamenten haben sie den Vorteil, dass es keinen initialen Flush mit potentiell toxischen Konzentrationen gibt [Yasukawa T et al. 2005]. Im Verlauf konnte eine kontrollierte lineare Abgabe über Jahre beobachtet werden [Mansoor S, Kuppermann BD, Kenney MC. 2009]. Ein großer Nachteil ist, dass man in einer zweiten Operation den Träger wieder entfernen muss.

Eine lineare, jedoch viel schnellere Abgabe erreichen auch hydrophobe abbaubare Trägersubstanzen. Hierbei besteht die Möglichkeit der Medikamentenabgabe durch kontinuierliches Auflösen der Trägersubstanz oder durch Abgabe des Medikaments aus der Mitte und anschließendes Wandern durch den Träger. Dabei ist die Abgabe nicht linear, sondern in drei Phasen geteilt; den initialen Flush, die Diffusionsphase und den Endflush. Um diese Konzentrationsschwankungen zu verhindern, werden Träger aus zwei Polymeren mit unterschiedlichem Molekulargewicht hergestellt. Das schwerere Polymer bildet den Rahmen, während das leichtere für eine konstante Abgabe sorgt [Mansoor S, Kuppermann BD, Kenney MC. 2009]. Alternativ kann durch Vorinkubation in Saline eine Reduktion des Flush erreicht und somit die Entstehung toxischer Konzentrationen minimiert werden [Yasukawa T et al. 2004]. Als abbaubare Implantate stehen Polylactolsäure, Polyglycolsäure und

ihr Kopolymer Polylactolcoglycolsäure sowie Albumin, Gelatine, Kollagen, Chitosan und Dextran zur Verfügung.

Durch Quervernetzung kann aus ihnen ein dreidimensionales Hydrogel hergestellt werden. Beim Abbau werden die Gele entweder enzymatisch oder nichtenzymatisch verflüssigt und abtransportiert [Mansoor S, Kuppermann BD, Kenney MC. 2009].

Eine PVR – Amotio tritt in der Regel in den ersten Monaten nach der ersten Operation auf, weshalb die schnelle antiproliferative Wirkung wichtig ist [Berger AS et al. 1996]. Hier bietet sich die Nutzung des Glaskörperersatz als Medikamentendepot an. Durch den direkten postoperativen Einsatz werden Komplikationen wie proliferative Retinopathie, choroidale Neovaskularisation oder diabetische Retinopathie gemindert und so die Heilung verbessert [Yasukawa T et al. 2004]. Durch die lokale Bindung im Glaskörper wird die systemische Belastung deutlich reduziert. Bei einem Versuch mit einem Dexamethasonimplantat konnten Jaffe et al. 2006 das von ihm eingesetzte Kortikoid im Blut nicht nachweisen [Brumm MV, Nguyen QD. 2007]. Gibt man ein Medikamentenimplantat zusätzlich in das Auge, kann es durch Kumulation zur Netzhautverletzung kommen. Außerdem ist durch die Implantation eines Fremdkörpers eine weitere Operation bzw. Intervention notwendig, um diesen wieder zu entfernen. Auch kann es zu einer Immunreaktion gegen diesen Fremdkörper kommen. Bei einer entstehenden Überdosierung ist es dagegen vorteilhaft, dass man das zusätzliche Implantat einfacher entnehmen kann als den Glaskörperersatz [Maurice D. 2001].

#### 4.2 Diskussion der Ergebnisse mit Dexamethason

In dieser Arbeit wurde als erstes Medikament Dexamethason zu einem Glaskörperäquivalent auf der Basis quervernetzter Hyaluronsäure, welches von Frank et al. entwickelt worden war, zugegeben [Frank C. 2010].

Die entstandenen Gele hatten eine runde Form, ein Volumen von ca. 6,75 ml und waren milchig trüb (Abb. 7), was auf das zugegebene Dexamethason

zurückgeführt wurde. Diese Trübung hellte sich über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen durch Abgabe des Dexamethason von außen nach innen auf (Abb. 8). Je mehr Dexamethason zugegeben worden war, desto schneller klarte das Gel auf (Abb. 9). Dies schien mit der geringeren Formstabilität zusammen zu hängen. Vermutet wurde eine Überladung mit Dexamethason soluble water, welche die Quervernetzung behinderte.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Spitzer et. al. nach der Zugabe von Dexamethason zu dem Hydrogel Healon keine Änderung der Klarheit und Viskosität feststellen [Spitzer MS et al. 2008]. Es scheint sich also um ein Phänomen zu handeln, welches einerseits durch die höhere Menge an Dexamethason entsteht, sowie durch die Quervernetzung. In vivo würde die Trübung sicher zu einer Visusminderung führen. Durch die Abgabe des Dexamethason und folgende Aufklärung der Gele wäre diese Einschränkung jedoch reversibel. Ebenso ist nach einer Vitrektomie im Allgemeinen der Visus eingeschränkt und stabilisiert sich über eine gewisse Zeit, weshalb die zusätzliche temporäre Trübung durch das Dexamethason bei erhaltener Wirkung und dadurch verbesserter Heilung als unerwünschte Arzneimittelwirkung vertretbar erscheint.

Die abgegebene Medikamentenmenge pro Zeiteinheit sollte durch Messung der Extinktion bei  $\lambda = 239$  nm bestimmt werden. Dies entsprach der Wellenlänge, welche als Extinktionsmaximum von Dexamethason beschrieben worden war und bei welcher die Messungen in der Arbeit von Spitzer et al. durchgeführt worden waren [Spitzer MS et al. 2008]. Bei dieser Wellenlänge wurde bei 1-vinyl-2-pyrrolidinone eine starke Extinktion festgestellt (Abb. 12). Dadurch wurde die Messung gestört und es konnte nicht auf die Dexamethasonmenge geschlossen werden.

Daraufhin wurde eine Bestimmung der abgegebenen Dexamethasonmenge mittels HPLC durchgeführt.

Wie schon in den Versuchen von Spitzer et al. beschrieben, stellte sich nach einem anfänglichen Flush schnell ein Steady State mit einer Abgabe von etwa 3 – 5% der zugegebenen Menge pro Stunde ein (Abb. 15) [Spitzer MS et al. 2008]. Nach sechs Stunden waren etwa 25% abgegeben. Die nächste Messung

erfolgte nach 24 Stunden. Hier war es, wie bereits in der Literatur beschrieben, zu einer Abnahme der abgegebenen Medikamentenmenge pro Zeiteinheit gekommen, sodass eine Gesamtmenge von 40% abgegeben worden war [Szurman P, Frank C et al. 2009].

Diese Abnahme pro Zeit setzte sich fort, bis nach einer Woche 65 – 70% abgegeben worden waren. Im Anschluss war eine deutlich geringere Abgabe von Dexamethason nachweisbar. Dies stellte eine Verbesserung der Ergebnisse von Spitzer et al. dar, da die Abgabe über einen längeren Zeitraum stattfand und es einen geringeren Flush zu Beginn gab. In ihren Versuchen waren nach 6 Stunden bereits 50% abgegeben worden und die Abgabe fand nur über einen Zeitraum von 6 Tagen statt [Spitzer MS et al. 2008]. Auch in Kombination mit 5-FU wurde Dexamethason nur über einen Zeitraum von einer Woche abgegeben [Berger AS et al. 1996]. Da sich neue Membranen, die Zug auf die Netzhaut ausüben innerhalb von etwa sechs Wochen nach der Operation neu bilden, wäre eine Wirkung über einen Monat wünschenswert [Guidetti B et al. 2008]. Die schnelle Abgabe resultierte vermutlich aus der Wasserlöslichkeit und Größe des Dexamethasonmoleküls. Es handelt sich um ein sehr kleines Molekül, das sehr gut wasserlöslich ist und deshalb schnell an wässrige Umgebung abgegeben wird. Es ist bekannt, dass die Abgabe einer Substanz aus einem Hyaluronsäuregel nicht von der Konzentration der HA, sondern von ihrem Molekulargewicht abhängig ist. Je höher das Molekulargewicht, desto langsamer wird der Wirkstoff abgegeben [Miyazaki T, Yomota C, Okada S. 2001]. Die verlängerte Abgabe in den hier beschriebenen Versuchen lässt sich durch die Quervernetzung und damit einer stärkeren Bindung des Dexamethason erklären. Es können durch die geringeren abgegebenen Einzeldosen auch höhere Mengen an Dexamethason zugegeben werden, was ebenfalls ein Vorteil ist und die Abgabe weiter verlängert. Durch die Reduktion des initialen Flush wird auch eine geringere Toxizität des Dexamethason erwartet.

Von besonderem Interesse war, ob das Dexamethason durch die Quervernetzung seine biologische Wirksamkeit behält. Als Glukokortikoid wirkt

es durch Hemmung von Interleukin I und II antientzündlich, antiproliferativ und antiödematös [Karow T, Lang – Roth R. 2008].

Die Ergebnisse zeigten bei sehr niedrigen Konzentrationen einen proliferativen Effekt (Abb. 16). Dieser war bereits ab einer Konzentration von 0,1 mg/ml rückläufig und bei 0,3 mg/ml lebten ebenso viele Zellen, wie ohne Zugabe von Dexamethason. Dieser Effekt wurde bereits 1984 von Blumenkranz et al. beschrieben. Bei ihrem Versuch mit dermalen und kornealen Fibroblastenkulturen in vitro führten sowohl Dexamethason sodium phosphat als auch Triamcinolonacetonid in Konzentrationen von 1 – 30 mg/L zu einer verstärkten Proliferation. Bei Dexamethason war die Verstärkung 1,7 fach und bei Triamcinolon 2 fach. Durch Erhöhen der Dosis konnte eine Inhibition der Proliferation beobachtet werden. Im Versuch mit Triamcinolon setzte der antiproliferative Effekt bereits bei 30 mg/L, mit Dexamethason erst ab einer Konzentration über 100 mg/L ein [Blumenkranz MS et al. 1984].

Diese Beobachtungen stimmen sehr gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Nach drei Tagen trat dieser Effekt nicht auf (Abb. 16), was vermutlich auf die längere Einwirkung des Dexamethason zurückzuführen war. In höheren Konzentrationen zeigte Dexamethason eine deutliche antiproliferative Wirkung.

Bei der Auswertung der Proben (Tabelle 7) zeigte sich im Vergleich mit den Ergebnissen durch die HPLC und der Extinktionsmessung das zur Quantifizierung der Dexamethasonmenge weder die Extinktionsmessung noch die Testung des antiproliferativen Effekts geeignet sind. Die Konzentrationen an Dexamethason waren wesentlich geringer, als anhand der Wirkung errechnet. Dies spricht entweder für eine sehr starke antiproliferative oder eine toxische Wirkung einer abgegebenen Substanz.

In Kaninchenaugen konnte bis zu einer Konzentration von 400 µg/ml Dexamethason sodium phosphat als Infusionslösung nach einer Vitrektomie mit Linsektomie keine toxische Wirkung beobachtet werden [Raichand M et al. 1982].

Auch bei Menschen wurde in einer randomisierten Studie eine hohe intravitreale Konzentration ohne toxischen Effekt beobachtet [Kuppermann BD

et al. 2007]. Bei intraokularer Injektion können bis zu 440 µg Dexamethason als ungiftig für Retina, Linse und Kornea von Kaninchen angenommen werden [Cheng CK et al. 1995]. Reines Dexamethason scheint somit in niedrigeren Konzentrationen nicht toxisch zu sein.

In Kombination mit Hyaluronsäure konnten Spitzer et al. eine signifikante antiproliferative Wirkung auf humane Fibroblasten und humane retinale Pigmentepithelzellen, jedoch ebenfalls keinen Hinweis für Zytotoxizität nachweisen und durch die Quervernetzung könnte es zu einem Verlust der Wirksamkeit kommen [Spitzer MS et al. 2008]. Somit wurde darauf geschlossen, dass diese Toxizität durch einen anderen Stoff, welcher sich aus dem Gel gelöst hatte verantwortlich sein musste. Die Versuche von Frank et al. zeigten, dass keine Toxizität von den Gelen ausging, jedoch wurde dieser Versuch nach einer Dialyse durchgeführt [Frank C. 2010]. Diese ist jedoch im vorliegenden Fall nicht möglich, da das kleine sehr wasserlösliche Dexamethasonmolekül herausgewaschen werden würde. Von den Einzelkomponenten wurden die Monomere der Polyacrylamide in quervernetzter Form bereits als nicht toxisch beschrieben [Chirila TV. 1994]. Ebenso zeigten Frank et al., dass Hyaluronsäure nicht toxisch ist. Einzig ein antiadhäsiver Effekt konnte nachgewiesen werden [Frank C. 2010]. Dieser könnte beim MTT – Test auch ausschlaggebend für die geringere Zellzahl sein, da durch das Ausschütten der Flüssigkeit (vgl. 2.2.6) evtl. auch Zellen verloren gehen. Es ist möglich, dass der Einfluss von 1-vinyl-2-pyrrolidinone zu dem toxischen Effekt geführt hat, da dies ebenfalls aus dem Gel abgegeben wurde, wie durch die Messung der Extinktion gezeigt (Abb. 12). Wahrscheinlicher ist, dass der als toxisch bekannte Photoinductor Irgacure für den Tod der Zellen verantwortlich ist [Frank C. 2010].

Die Frage der Toxizität der einzelnen Bestandteile gilt es in weiteren Versuchen zu klären.

#### 4.3 Diskussion der Ergebnisse mit Bevacizumab

Als weitere Substanz wurde Bevacizumab, ein VEGF Antikörper, in die Gele integriert und untersucht. Eine Quervernetzung war möglich, jedoch musste eine längere Bestrahlungszeit mit UV – Licht eingehalten werden. Dies lag vermutlich daran, dass das große Bevacizumabmolekül mit einem Molekulargewicht von 149 kD die Vernetzung der Hyaluronsäure behinderte.

Bei einer Quervernetzung im Auge würde diese längere Strahlungsdauer eine größere potentielle Schädigung bedeuten. Folglich müsste die Quervernetzung bereits zuvor stattfinden und das Gel anschließend in das Auge gebracht werden. Dies könnte wiederum zu einer schnelleren Abgabe des Bevacizumab führen. Für den klinischen Einsatz bedarf es Untersuchungen hinsichtlich der Praktikabilität.

Wie bereits bei den Gelen mit Dexamethason wurde die prozentuale Abgabe im Bezug auf die Zeit bestimmt. Es wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen nur etwa 5% der ursprünglich zugegebenen Menge abgegeben.

Dabei fand die Hauptabgabe in den ersten beiden Tagen statt (Abb. 17). Als Ursache für diese geringe Abgabe wurde ebenfalls die Größe des Moleküls als wahrscheinlich erachtet. Ein Vorteil derselben stellt die Möglichkeit dar, eine Dialyse durchzuführen und somit den Glaskörperersatz von toxischen Begleitsubstanzen zu befreien. Wie bereits in 4.2 erwähnt konnten Frank et al. nachweisen, dass nach einer Dialyse keine Toxizität mehr bestand [Frank C. 2010]. Es ist anzunehmen, dass das große Bevacizumabmolekül nicht nennenswert ausgewaschen wird und so kann sich seine Wirkung im Glaskörper entfalten, indem es VEGF direkt im Glaskörper bindet oder die Retina penetriert und es dort blockiert [Rosenfeld PJ et al. 2005]. Über die Toxizität und die sichere Dosis des Bevacizumab selbst existieren unterschiedliche Studien. Im Tierversuch mit Kaninchen war Bevacizumab bis zu einer intravitrealen Konzentration von 2,5 mg/ml unbedenklich [Arevalo JF et al. 2010]. In einer Studie an Menschengenossen zeigten sich selbst nach dreimaliger Injektion von 1,25 mg in einem Intervall von 25 Tagen keine Glaskörperentzündung, keine Zeichen für Toxizität an Kornea oder Uveoretina,

keine histologische Veränderung und keine Apoptose oder oxidative Reaktion. Im Gegenteil reduzierte sich die Aktivität der für die Apoptose wichtigen Enzyme Caspase 3 und Caspase 8 [Sari A et al. 2009]. Im Versuch mit Mäusen, deren Retina der menschlichen in Morphologie, Biochemie und Physiologie sehr ähnlich ist, konnte bei einer 7 fach höheren Dosis als der beim Menschen angewandten keine schädliche Wirkung auf diese festgestellt werden [Heiduschka P et al. 2008]. Auch Rosenfeld et al. beschrieben es als ungiftig für die Retina [Rosenfeld PJ et al. 2005]. Jedoch existieren auch Studien, in welchen die Blockade von VEGF zu starken Schäden an Retina und Choroidea, ab 2,5 mg/ml Bevacizumab zu einer giftigen Wirkung auf retinale Pigmentepithelzellen, sowie bei einmaliger Gabe zu einer Erhöhung der Kaspase 3 und Kaspase 8 führte. Hier wurde als sichere Dosis, bei welcher auch die Proliferation nicht unterdrückt wird, eine Konzentration von maximal 0,8 mg/ml ermittelt [Spitzer MS et al. 2006].

Auf die Wirkung bezogen konnte kein Unterschied zwischen einer Injektion von 1,25 mg und 2,5 mg festgestellt werden [Arevalo JF et al. 2010].

Es empfiehlt sich demnach, die momentan verwendete Menge von 0,25 mg/ml entsprechend 1,25 mg beizubehalten [Solomon SD, Lindsley K et al. 2014]. Um diese Menge im Auge zu erreichen, müssten bei der in den vorliegenden Versuchen ermittelten Abgabe von 5% der zugegebenen Menge innerhalb von 2 – 3 Tagen dem Gel 25 mg Bevacizumab zugegeben werden (vgl. 3.7.1). Da die Dauer der Quervernetzung mit zunehmender Menge an Bevacizumab angestiegen war, würde diese Erhöhung, wie bereits oben erwähnt, eine weitere intensive Bestrahlung bedeuten und es ist fraglich, in wie weit eine Quervernetzung mit dieser Menge an Bevacizumab möglich ist.

Da die Bestimmung der Menge an abgegebenem Bevacizumab über den ELISA – Test erfolgte, welcher einen aktiven Antikörper zur Durchführung benötigt, kann davon ausgegangen werden, dass die biologische Wirksamkeit trotz langer Bestrahlungsdauer erhalten geblieben war. Der ELISA wurde wegen seiner hohen Sensitivität und Spezifität ausgewählt [Sharma RK et al. 2010]. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es wenig Störfaktoren in den Versuchen mit Bevacizumab gab (2.2.8 und 2.2.9).

Ein Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen wäre zu testen, ob eine größere Menge Bevacizumab eine Quervernetzung verhindert und wie viel Wirkstoff ein Gel mit 25 mg Bevacizumab abgibt. In den Messungen konnte beobachtet werden, dass eine höhere zugegebene Menge tendenziell zu einem geringeren abgegebenen Prozentsatz führte (Abb. 17). Wenn dieses Phänomen bei einer weiteren Erhöhung der Bevacizumabmenge fortbesteht, müsste noch mehr Bevacizumab zugegeben werden, was die Quervernetzung weiter erschweren würde. Andererseits hätte eine geringere Abgabe den Vorteil einer längeren Wirkdauer, was besonders bei chronisch verlaufenden Erkrankungen einen positiven Effekt erwarten lässt.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zu einem neuen Glaskörperäquivalent auf Hyaluronsäurebasis die antiproliferativen Medikamente Dexamethason und Bevacizumab gegeben und auf die Möglichkeit der Verwendung als Releasesystem zur Therapie nach Vitrektomie getestet.

Es war möglich, stabile Gele mit enthaltenem Medikament herzustellen. Die Transparenz war besonders bei Dexamethason anfangs gestört, dies besserte sich jedoch durch dessen Abgabe innerhalb der ersten Tage. Die Gele mit Bevacizumab waren transparent.

Für einen Medikamenten release ist eine kontinuierliche Abgabe in etwa der selben Medikamentenmenge über einen möglichst langen Zeitraum wichtig. Im Versuch mit Dexamethason konnte eine Einteilung der Abgabe in drei Phasen vorgenommen werden. Zu Beginn wurden pro Stunde 3 – 5% der zugegebenen Menge abgegeben. Später reduzierte sich die Abgabe auf etwa 10% der zugegebenen Menge pro Tag, um nach drei Tagen noch etwa 5% in zwei Tagen zu betragen. Nach einer Woche waren 65 – 70% der Ausgangsmenge abgegeben. Es folgte eine weitere geringere Abgabe in der dritten Woche. Die Schwankung in der Abgabe war also vorhanden, wenn auch nicht sehr ausgeprägt. Die Wirkdauer war jedoch nur etwas besser als in früheren Versuchen und noch keine therapeutisch ausreichende Wirkdauer.

Die Abgabe des zugegebenen Bevacizumab war mit 5% der ursprünglich zugegebenen Menge innerhalb von zwei Wochen sehr gering. Entsprechend müssten dem Gel sehr hohe Ausgangsdosen zugegeben werden um eine gute Wirkkonzentration zu bekommen. Bei höheren zugegebenen Mengen war jedoch die Quervernetzung behindert. Deshalb muss ein Mittelweg zwischen wirkungsvoller abgegebener Menge und erhaltener Möglichkeit der Quervernetzung gefunden werden. Die beschriebene geringe Abgabe des Bevacizumab bietet den potentiellen Vorteil einer weitaus längerfristigen Abgabe. Dies ist besonders bei chronischen oder sehr langwierigen Erkrankungen wie der PVR wichtig.

Um antiproliferativ zu wirken, sollte bei einem Release – System die biologische Wirksamkeit nicht verloren gehen. Da dies bei der Quervernetzung theoretisch möglich war, wurde diese überprüft. Hier bestätigte sich die 1984 von Blumenkranz et al. gemachte Beobachtung, dass Dexamethason in sehr geringer Konzentration eine proproliferative und erst ab einer Konzentration von etwa 100 mg/L eine antiproliferative Wirkung hat. Zusätzlich sprechen die Ergebnisse des MTT – Tests der Proben aus den Dexamethasongelen für eine toxische Wirkung, welche vermutlich durch den Photoinduktor Irgacure bedingt ist. In den Versuchen von Frank et al. waren die Gele nach Dialyse ungiftig. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Dexamethason durch die Dialyse ebenfalls verloren gehen würde wegen der guten Wasserlöslichkeit und des niedrigen Molekulargewichts groß.

Die Durchführung einer Dialyse wäre durch die Größe des Bevacizumabmoleküls eher möglich. So könnte die Toxizität der anderen Chemikalien reduziert werden. Da das Bevacizumab mit Hilfe eines ELISA – Tests bestimmt wurde, kann von einem Erhalt der biologischen Wirkung ausgegangen werden.

Beide Ansätze haben Potential und können mit Hilfe weiterer Versuche verbessert und dadurch für die klinische Anwendung optimiert werden.

## **Literaturverzeichnis**

**Araiz JJ, Refojo MF, Arroyo MH, et al. (1993)**

Antiproliferative effect of retinoic acid in intravitreal silicone oil in an animal model of proliferative vitreoretinopathy  
Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 522-530

**Arevalo JF, Adan A, Berrocal MH, Espinoza JV, Maia M, Wu L, Roca JA, Quiroz-Mercado H, Ruiz-Moreno JM, Serrano MA. (2010)**

Intravitreal bevacizumab for inflammatory choroidal neovascularization: Results from the Pan-American Collaborative Retina Study Group at 24 Months.  
Retina Sep 30.

**Arroyo JG, Trobe J, Park L. (2015)**

Retinal detachment  
Wolters Kuwer UpToDate 2015 www.uptodate.com

**Berger AS, Cheng CK, Pearson PA, Ashton P, Crooks PA, Cynkowski T, Cynkowska G, Jaffe GJ. (1996)**

Intravitreal sustained release corticosteroid-5-fluoruracil conjugate in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 37(11):2318-25

**Blumenkranz MS, Claflin A, Hajek AS. (1984)**

Selection of therapeutic agents for intraocular proliferative disease. Cell culture evaluation  
Arch Ophthalmol.102(4):598-604

**Braithwaite T1, Nanji AA, Lindsley K, Greenberg PB. (2014)**

Anti-vascular endothelial growth factor for macular oedema secondary to central retinal vein occlusion.  
Cochrane Database Syst Rev. 2014 May 1; NIH Public Access

**Brumm MV, Nguyen QD. (2007)**

Fluocinolone acetonide intravitreal sustained release device – a new addition to the armamentarium of uveitic management  
Int J Nanomedicine. 2(1):55-64

**Chirila TV, Tahija S, Hong Y, Vijayasekaran S, Constable IJ (1994)**

Synthetic polymers as materials for artificial vitreous body: review and recent advances.  
J Biomater Appl. Oct;9(2):121-37

**Cheema RA, Peyman GA, Fang T, Jones A, Lukaris AD, Lim K. (2007)**

Triamcinolone acetonide as an adjuvant in the surgical treatment of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy  
Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 38(5):365-70

**Cheng CK, Berger AS, Pearson PA, Ashton P, Jaffe GJ. (1995)**

Intravitreal sustained-release dexamethasone device in the treatment of experimental uveitis  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 36(2):442-53

**de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, Piao Y, Eterovic K, Ji Y, Conrad CA. (2010)**

Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice.  
Neuro Oncol. Mar;12(3):233-42. Epub 2010 Jan 6.

**Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. (1996)**

ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties  
Exp Eye Res. 62(2):155-69

**Eisner G. (1975)**

Zur Anatomie des Glaskörpers  
Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol. 193(1):33-56

**Eisner G. (1989)**

Posterior vitreous detachment  
Klin Monatsblatt Augenheilkunde 194(5):389-92

**Feltgen N, Walter P. (2014)**

Rhegmatogenous retinal detachment—an ophthalmologic emergency.  
Dtsch Arztebl Int 2014; 111(1–2): 12–22. DOI: 10.3238/arztebl.2014.0012

**Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003)**

The biology of VEGF and its receptors.  
Nat Med. Jun;9(6):669-76.

**Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. (2004)**

Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer.  
Nat Rev Drug Discov. May;3(5):391-400.

**Frank C. (2010)**

Quervernetzte Hyaluronsäure als Glaskörperersatz  
Inaugural-Dissertation Eberhard Karls Universität zu Tübingen

**Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. (1997)**

Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover  
J Intern Med. 242(1):27-33

**Guidetti B, Azéma J, Malet-Martino M, Martino R. (2008)**

Delivery systems for the treatment of proliferative vitreoretinopathy: materials, devices and colloidal carriers  
Curr Drug Deliv. 5(1):7-19

**Hahn SK, Jelacic S, Maier RV, Stayton PS, Hoffman AS. (2004)**

Anti – inflammatory drug delivery from hyaluronic acid hydrogels  
J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol.15, No.9 1111-1119

**Heiduschka P, Julien S, Hofmeister S, Bartz-Schmidt KU, Schraermeyer U. (2008)**

Bevacizumab (avastin) does not harm retinal function after intravitreal injection as shown by electroretinography in adult mice.  
Retina. Jan;28(1):46-55.

**Hockwin O. (1985)**

Biochemie des Auges  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Kapitel 6 Wurster U, Hoffmann K. S. 110 – 129

**Jaissle GB, Leitritz M, Gelisken F, Ziemssen F, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. (2009)**

One-year results after intravitreal bevacizumab therapy for macular edema secondary to branch retinal vein occlusion.  
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. Jan;247(1):27-33.

**Jonas JB, Sofker A. (2001)**

Intraocular injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of diabetic macular edema  
Am J Ophthalmol 132:425-427

**Joussen AM, Kirchhof B, Schrage N, Ocklenburg C, Hilgers RD. (2007)**

Heavy silicone oil versus standard silicone oil as vitreous tamponade in inferior PVR (HSO Study): design issues and implications  
Acta Ophthalmol Scand. 85(6):623-30

**Jubb AM, Harris AL. (2010)**

Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer.  
Lancet Oncol. Dec;11(12):1172-83.

**Karow T, Lang – Roth R. (2008)**

Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie  
Thomas Karow, Köln 16. Auflage, S. 665/887

**Kelly RM, Meyer JD, Matsuura JE, Shefter E, Hart MJ, Malone DJ, Manning MC. (1999)**

In vitro release kinetics of Gentamycin from a sodium hyaluronate gel delivery system suitable for the treatment of peripheral vestibular disease  
Drug Dev Ind Pharm. 25(1):15-20

**Kiernan DF, Mieler WF. (2009)**

The use of intraocular corticosteroids  
Expert Opin Pharmacother. 10(15):2511-25

**Kuno N, Fujii S**

Ocular Drug Delivery Systems for the Posterior Segment: A Review  
Retina today may/june 2012: 54-59

**Kuppersmann BD, Blumenkranz MS, Haller JA, Williams GA, Weinberg DV, Chou C, Whitcup SM (2007)**

Randomized controlled study of an intravitreal dexamethasone drug delivery system in patients with persistent macular edema  
Arch Ophthalmol. 125(3):309-17

**Lang GK, Amann J, Gareis O, Lang GE, Recker D, Spraul CW, Wagner P. (2000)**

Augenheilkunde  
Georg Thieme Verlag 2. Auflage S.283 – 288; 299 – 303; 335 – 339

**Lee SS, Robinson MR. (2009)**

Novel drug delivery systems for retinal diseases  
Ophthalmic Res. 41(3):124-35

**Lindl T. (2002)**

Zell-und Gewebekultur  
Spektrum Akademischer Verlag; Auflage 5

**Lobo AM, Sobrin L, Papaliodis GN. (2010)**

Drug delivery options for the treatment of ocular inflammation.  
Semin Ophthalmol. Sep-Nov;25(5-6):283-8.

**Machemer R, Sugita G, Tano Y. (1979)**

Treatment of intraocular proliferations with intravitreal steroids  
Trans Am Ophthalmol Soc 77: 171-180

**Mansoor S, Kuppersmann BD, Kenney MC. (2009)**

Intraocular sustained-release delivery systems for triamcinolone acetonide  
Pharm Res. 26(4):770-84

**Mansour AM, Arevalo JF, Ziemssen F, Mehio-Sibai A, Mackensen F, Adan A, Chan WM, Ness T, Banker AS, Dodwell D, Chau Tran TH, Fardeau C, Lehoang P, Mahendradas P, Berrocal M, Tabbarah Z, Hrisomalos N, Hrisomalos F, Al-Salem K, Guthoff R. (2009)**

Long-term visual outcomes of intravitreal bevacizumab in inflammatory ocular neovascularization.

Am J Ophthalmol. Aug;148(2):310-316.e2. Epub 2009 May 9.

**Mason JO 3rd, Frederick PA, Neimkin MG, White MF Jr, Feist RM, Thomley ML, Albert MA Jr. (2010)**

Incidence of hemorrhagic complications after intravitreal bevacizumab (avastin) or ranibizumab (lucentis) injections on systemically anticoagulated patients.

Retina. Oct;30(9):1386-9.

**Maurice D. (2001)**

Review: practical issues in intravitreal drug delivery

J Ocul Pharmacol Ther. 17(4):393-401

**Medeiros MD, Postorino M, Navarro R, Garcia-Arumí J, Mateo C, Corcóstegui B. (2014)**

Dexamethasone intravitreal implant for treatment of patients with persistent diabetic macular edema.

Ophthalmologica. 2014;231(3):141-6. doi: 10.1159/000356413. Epub 2013 Dec 19.

**Miyazaki T, Yomota C, Okada S. (2001)**

Development and release characterization of hyaluronan – doxycycline gels based on metal coordination

J Control Release. 76(3):337-47

**Nowosielski M, Recheis W, Goebel G, Güler O, Tinkhauser G, Kostron H, Schocke M, Gotwald T, Stockhammer G, Hutterer M. (2010)**

ADC histograms predict response to anti-angiogenic therapy in patients with recurrent high-grade glioma.

Neuroradiology. Dec 2.

**Raichand M, Peyman GA, Schwartz H, Roe C. (1982)**

Anti-inflammatory action of dexamethasone in vitrectomy infusion fluid.

Ophthalmic Surg. 13(6):493-8.

**Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. (2005)**

Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion.

Ophthalmic Surg Lasers Imaging. Jul-Aug;36(4):336-9.

**Sadaka A, Giuliari GP. (2012)**

Proliferative vitreoretinopathy: current and emerging treatments.  
Clin Ophthalmol. 2012;6:1325-33. doi: 10.2147/OPTH.S27896. Epub 2012 Aug 14.

**Sari A, Adiguzel U, Canacankatan N, Yilmaz N, Dinc E, Oz O. (2009)**

Effects of intravitreal bevacizumab in repeated doses: an experimental study.  
Retina Oct;29(9):1346-55.

**Schwartz SG, Flynn HW Jr. (2007)**

Pharmacotherapies for diabetic retinopathy: present and future  
Exp Diabetes Res. 52487

**Sebag J (2014)**

Vitreous in health and disease  
Springer New York Auflage 2014 S. 3 - 191

**Sebag J. (2015)**

The vitreoretinal interface and its role in the pathogenesis of vitreomaculopathies  
Ophthalmologe. 2015 Jan;112(1):10-9. doi: 10.1007/s00347-014-3048-6.

**Solomon SD, Lindsley K, Vedula SS, Krzystolik MG, Hawkins BS. (2014)**

Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration.  
Cochrane Database Syst Rev. 2014 Aug 29 NIH Public Access

**Spitzer MS, Kaczmarek RT, Yoeruk E Petermeier K, Wong D, Heimann H, Jaissle GB, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. (2009)**

The distribution, release kinetics and biocompatibility of triamcinolone injected and dispersed in silicone oil  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 50(5):2337-43

**Spitzer MS, Wallenfels-Thilo B, Sierra A, Yoeruek E, Peters S, Henke-Fahle S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. (2006)**

Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells.  
Br J Ophthalmol. Oct;90(10):1316-21. Epub 2006 May 24.

**Spitzer MS, Yoeruek E, Kaczmarek RT, Sierra A, Aisenbrey S, Grisanti S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. (2008)**

Sodium hyaluronate gels as a drug-release system for corticosteroids: release kinetics and antiproliferative potential for glaucoma surgery  
Acta Ophthalmol. 86(8):842-8

**Szurman P, Frank C, Kaczmarek RT, Spitzer MS. (2009)**

Vitreous substitutes as drug release systems  
Klin Monatsbl Augenheilkd. 226(9):718-24

**Szurman P, Kaczmarek R, Spitzer MS, Jaissle GB, Decker P, Grisanti S, Henke-Fahle S, Aisenbrey S, Bartz-Schmidt KU. (2006)**

Differential toxic effect of dissolved triamcinolone and its crystalline deposits on cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) cells  
Exp Eye Res. 83(3):584-92

**Szurman P, Sierra A, Kaczmarek RT. (2007)**

Different biocompatibility of crystalline triamcinolone deposits on retinal cells in vitro and in vivo  
Exp Eye Res 85: 44-53

**Tarantola RM, Folk JC, Boldt HC, Mahajan VB. (2010)**

Intravitreal bevacizumab during pregnancy.  
Retina. Oct;30(9):1405-11.

**Wang C, Hou H, Nan K, Sailor MJ, Freeman WR, Cheng L. (2014)**

Intravitreal controlled release of dexamethasone from engineered microparticles of porous silicon dioxide.  
Exp Eye Res. 2014 Dec;129:74-82. doi: 10.1016/j.exer.2014.11.002. Epub 2014 Nov 5.

**Weiss K, Steinbrugger I, Weger M, Ardjomand N, Maier R, Wegscheider BJ, Wedrich A, El-Shabrawi Y. (2009)**

Intravitreal VEGF levels in uveitis patients and treatment of uveitic macular oedema with intravitreal bevacizumab.  
Eye (Lond). Sep;23(9):1812-8. Epub 2009 Jan 23.

**Williams RG, Chang S, Comaratta MR, Simoni G. (1996)**

Does the presence of heparin and dexamethasone in the vitrectomy infusate reduce proliferation in proliferative vitreoretinopathy?  
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 234(8):496-503

**Wu WC, Kao YH, Hu DN. (2002)**

A comparative study of effects of antiproliferative drugs on human retinal pigment epithelial cells in vitro  
J Ocul Pharmacol Ther 18: 251-264

**Xi L, Wang T, Zhao F, Zheng Q, Li X, Luo J, Liu J, Quan D, Ge J. (2014)**

Evaluation of an injectable thermosensitive hydrogel as drug delivery implant for ocular glaucoma surgery.  
PLoS One. 2014 Jun 20;9(6):e100632. doi: 10.1371/journal.pone.0100632. eCollection 2014.

**Yang H, Jager MJ, Grossniklaus HE, O'Neill E. (2010)**

Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma.  
Invest Ophthalmol Vis Sci. Dec;51(12):6904-7.

**Yasukawa T, Ogura Y, Sakurai E, Tabata Y, Kimura H. (2005)**  
Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices  
Adv Drug Deliv Rev. 57(14):2033-46

**Yasukawa T, Ogura Y, Tabata Y, Kimura H, Wiedemann P, Honda Y. (2004)**  
Drug delivery systems for vitreoretinal diseases  
Prog Retin Eye Res. 23(3):253-81

**Zhang X, Wei J, Ma P, Mu H, Wang A, Zhang L, Wu Z, Sun K. (2015)**  
Preparation and evaluation of a novel biodegradable long-acting intravitreal implant containing ligustrazine for the treatment of proliferative vitreoretinopathy.  
J Pharm Pharmacol. 2015 Feb;67(2):160-9. doi: 10.1111/jphp.12327. Epub 2014 Dec 31.

**Zhu Q, Ziemssen F, Henke-Fahle S, Tatar O, Szurman P, Aisenbrey S, Schneiderhan-Marra N, Xu X; Tübingen Bevacizumab Study Group, Grisanti S. (2008)**  
Vitreous levels of bevacizumab and vascular endothelial growth factor-A in patients with choroidal neovascularization.  
Ophthalmology 115(10):1750-5