

Entwicklung und Evaluation von thermosensitiven Hydrogelen als Glaskörperersatzstoffe - ex vivo Ergebnisse

Bohnacker S.¹, Hagedorn N.², Kamlage S.³, Kugler W.², Lendlein A.³, Maier M.¹, Feucht N.¹, Neffe A.³, Messmer A.⁴, Lohmann C.P.¹, Kobuch K.¹

¹Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München; ²Fluoron GmbH, Ulm;

³Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Institut für Biomaterialforschung, Teltow; ⁴Dr. Schmidt Intraocularlinsen GmbH, St. Augustin, Germany.

Fragestellung

Aktuell in klinischer Anwendung befindliche Glaskörperersatzstoffe wie Gase oder Perfluorcarbonflüssigkeiten sind für eine langfristige intraokulare Verweildauer nur sehr begrenzt geeignet. Silikonöle, derzeit Goldstandard der langfristigen Tamponadematerialien, können diverse Komplikationen zur Folge haben. Als neuer Ansatz auf dem Gebiet der Glaskörperersatzstoffe werden thermosensitive Hydrogele auf der Basis von Biopolymeren entwickelt, die bei Erwärmen auf Körpertemperatur gelieren. Es handelt sich um Mischungen von Hyaluronsäure und Poly(ethylen glycol-b-propylen glycol-b-ethylen glycol) (PEPE)¹, welche in Konzentrationen von 20 Gew.% in wässriger Lösung verwendet werden.

Methodik

Entwicklungsbegleitend wurden Versuche zur intraoperativen Handhabbarkeit der Gele durchgeführt um Thermosensitivität, deren Reversibilität und die Injizierbarkeit durch dünne Kanülen zu untersuchen. Zytotoxizitätsversuche wurden entsprechend ISO 10993-5 mit Mausfibroblasten L929 durchgeführt, sowohl qualitativ, durch direkten Kontakt zwischen thermosensitiven Hydrogelen und Zellen, als auch quantitativ mittels Tests mit verschiedenen Verdünnungen der Hydrogele. Um die Wirkung der Gele auf die Netzhaut zu untersuchen wurden Versuche an einem organtypischen Modell der Netzhaut² durchgeführt, gefolgt von einer histologischen Auswertung.

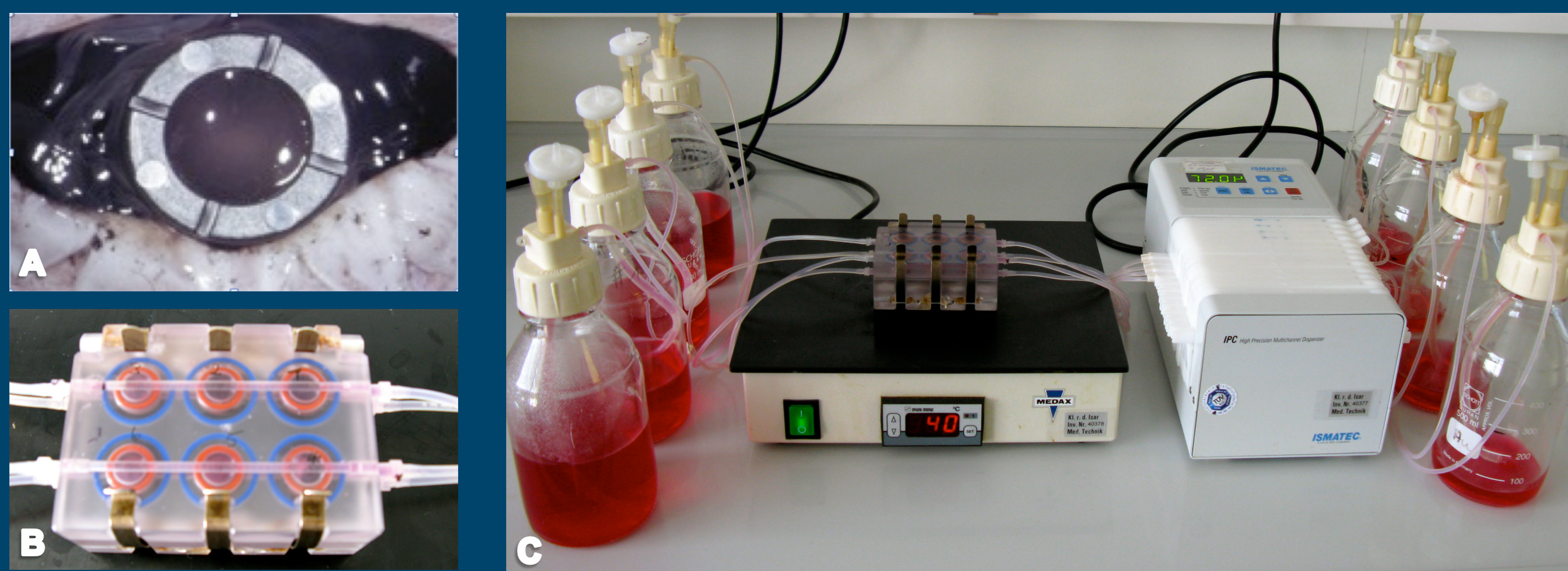


Abb. 1: Perfusionkultur Versuchsaufbau

A) Porcine Retina und RPE in einem Gewebeträger
B) Die Präparatkammer beinhaltet 6 Gewebeträger mit Gel und ohne Gel (Kontrolle)
C) Von rechts nach links: Kulturmediumzufuhr, Peristaltikpumpe, Wärmeplatte mit Präparatkammer, Kulturmediumauffangbehälter

Ergebnis

Die bei Raumtemperatur flüssigen Gele gelierten nach 2 min bei 37°C, dieser Vorgang war mehrfach reversibel. Zunächst zeigte sich keine Mischbarkeit der mit einer wässrigen Phase überschichteten Gele. Nach 3 Tagen bei 37°C verflüssigten sie sich jedoch durch Wasserabsorption und verloren ihre Gelierfähigkeit. Desweiteren zeigte sich eine unbeeinträchtigte Gelierbarkeit der Gele nach Injektion durch eine 27g Kanüle.

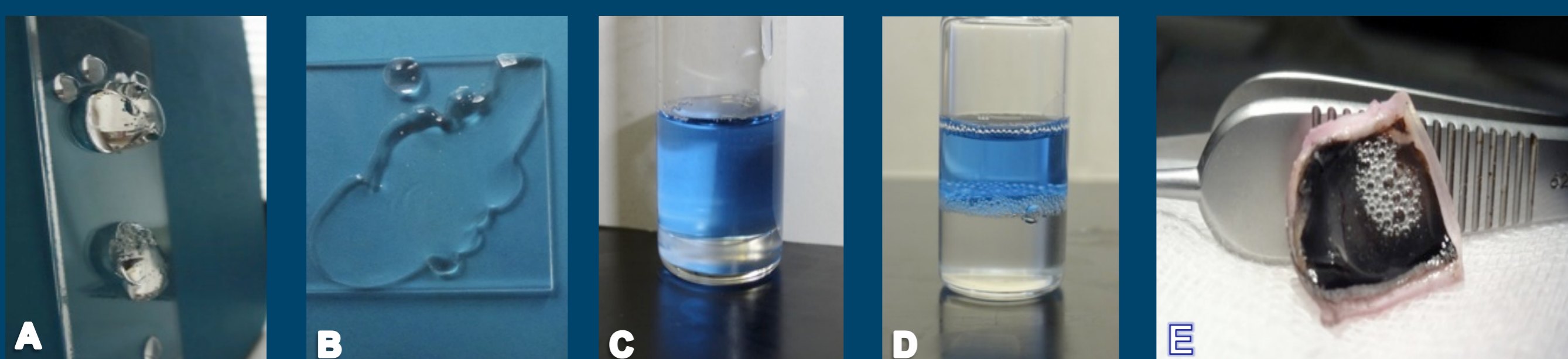


Abb. 2:

A) Geltropfen auf einem senkrecht gehaltenen Objektträger bei 37°C
B) Verflüssigung der Geltropfen nach Abkühlen auf Raumtemperatur
C) Gel überschichtet mit Brilliant Peel gefärbter Intraokularflüssigkeit bei 37°C
D) Nach 3 Tagen
E) Porcines eye cup auf Wärmeplatte mit adhärenter Gel-Schicht nach Zerschneiden des eye cups

In der Zellkultur war kein dreidimensionales Einwachsen von Zellen in das Gel zu beobachten. Während erste getestete Gele noch Zytotoxizität zeigten, konnte diese nach Anpassung der Gele durch Stabilisierung von pH-Wert und Osmolarität fast vollständig reduziert werden.

Abb. 3: Direct contact test; Ergebnisse nach 4 Tagen

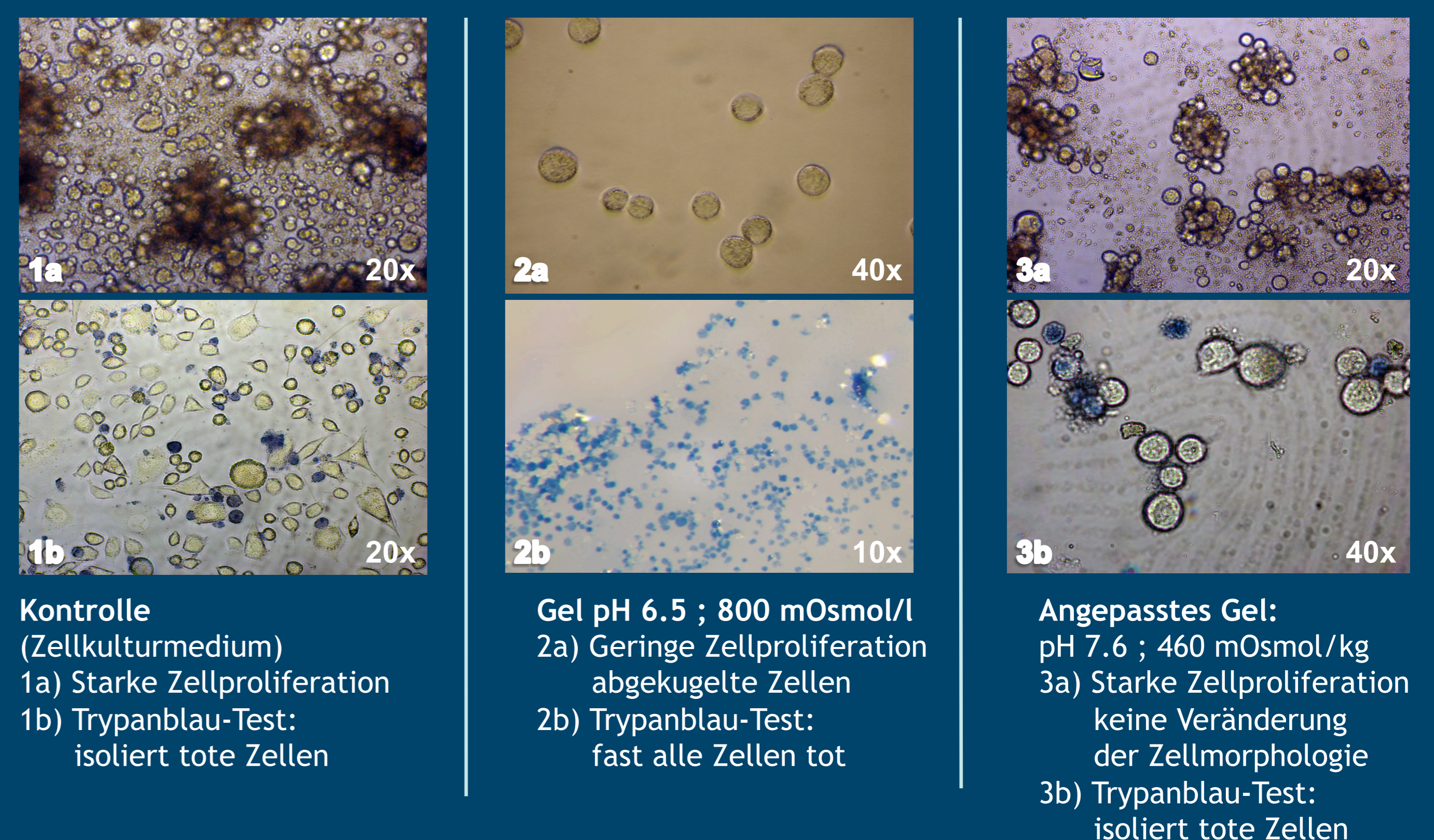
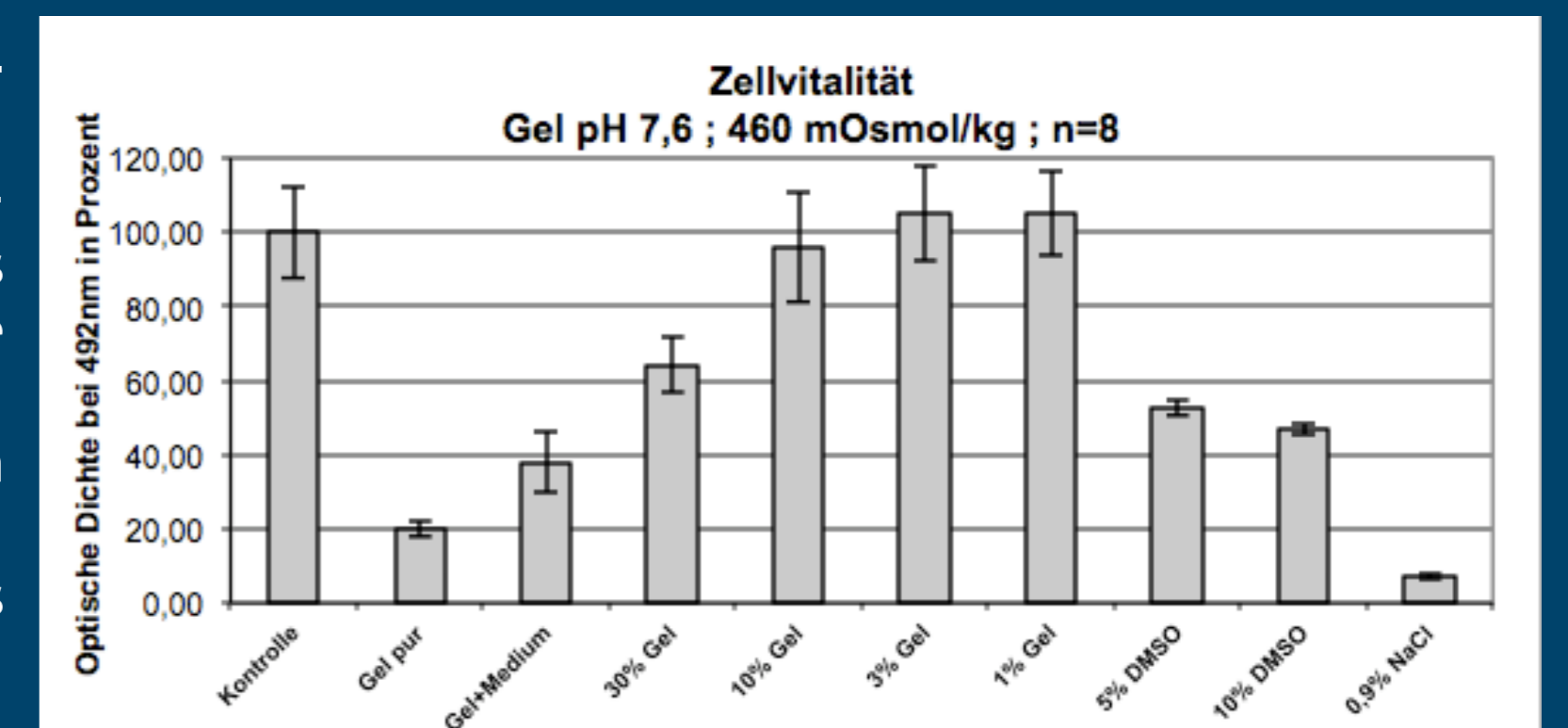


Abb. 4: Ergebnisse nach photometrischer Auswertung der Zellvitalität: Verglichen mit der Kontrolle (Kulturmedium), zeigte sich wohl mangels Kulturmedium eine deutlich reduzierte Zellvitalität von Zellen in purem Gel. Jedoch lag die Zellvitalität höher als in dem Ansatz mit 0,9% Natriumchlorid. In niedrigen Konzentrationen zeigte das Gel keine Zytotoxizität.



Histologische Ergebnisse nach Perfusionskulturversuchen zeigten zunächst toxische Reaktionen der Netzhaut. Nach Versuchen mit adaptierten Hydrogelen hingegen blieben Netzhautarchitektur und -morphologie erhalten.

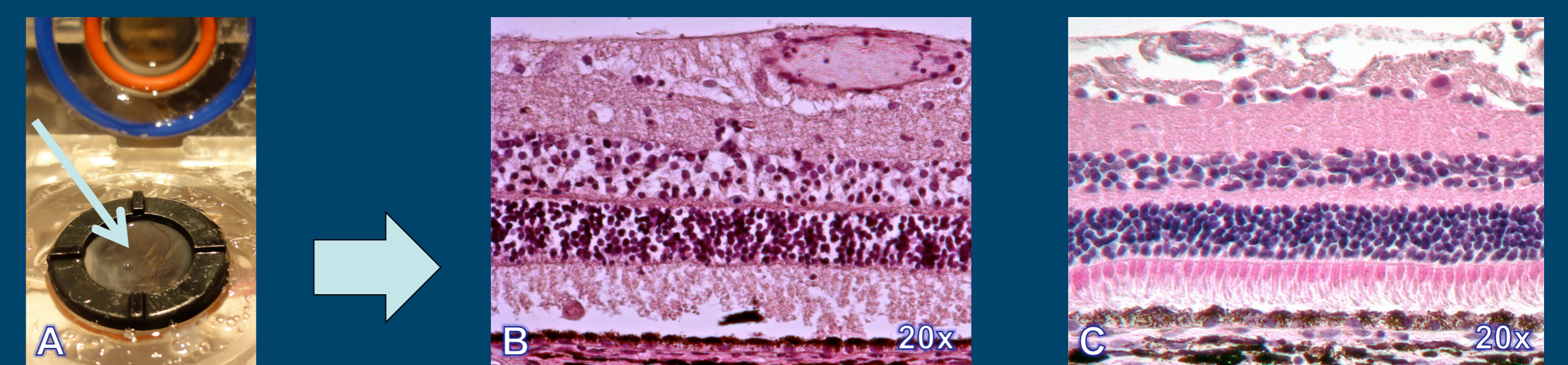


Abb. 5: (A) Gel-Schicht auf der Retina adhären. (B) Toxische Netzhautreaktion in Form von Desintegration der inneren Netzhautschichten wo ein direkter Kontakt zwischen Gel und Netzhaut bestand. (C) Komplette erhaltene Netzhautarchitektur und Gewebemorphologie der einzelnen Netzhautschichten in Tests mit Hydrogelen mit adaptiertem pH-Wert und Osmolarität wie mit unbehandelten Kontrollen (hier nicht gezeigt).

Schlussfolgerung

Aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften sind thermosensitive Hydrogele vielversprechende Kandidaten für die zukünftige Ophthalmochirurgie. Ein entscheidender Punkt um die Biokompatibilität zu garantieren ist die Stabilisierung von pH-Wert und Osmolarität.

Literatur

1 Santan H.D., Neffe A.T., Kamlage S., Lendlein A. Thermal Gelation and Stability of Pectin Grafted with PEPE. MRS Proceedings 2012; 1403
2 Kobuch K.A., Mecklenburg L., Herrmann W., Tuch K., Gabel V. Evaluation of Retina in Perfusion Tissue Culture as an in vitro Model for Toxic Retinopathies. IOVS 2005; 46: E.Abstract 3954

Danksagung: Petra Eberl (MTA)

Interessenkonflikt: 1. Projektpartner von FA. Fluoron GmbH und von FA. Dr. Schmidt Intraocularlinsen GmbH ja, alle übrigen nein; 2. nein; 3. nein; 4. BMBF AZ 13 N 10 326; 5. nein