

Augenklinik
Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. R. F. Guthoff)



In-vitro-Inhibition von humanen Linsenepithelzellen (hLEZ) mittels eines pharmakologisch modifizierten Kapselspannrings zur Prävention der Cataracta secundaria

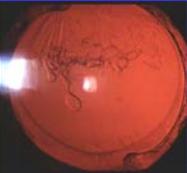
Kwittner S¹, Nebe B³, Beck R¹
¹Universitäts-Augenklinik Rostock;
²Klinik für Innere Medizin, Abteilung Klinische Forschung, Universität Rostock

DGII 2007

In-vitro-Inhibition von hLEZ mittels pharmakologisch modifizierter Kapselspannringe

Ziel

In-vitro-Untersuchungen zur Inhibition von hLEZ mittels pharmakologisch modifizierter Kapselspannringe (Mibefradil) mit dem Ziel der Nachstarprophylaxe.



Nachstar

Mibefradil-Hydrochlorid: T-Kalzium-Kanalblocker

In-vitro-Inhibition von hLEZ mittels pharmakologisch modifizierter Kapselspannringe

Voruntersuchungen

(Beck R, Nebe B, Guthoff R, Ryckly F: Inhibition of lens epithelial cell adhesion by the calcium antagonist mibefradil correlates with impaired integrin distribution and organization of the cytoskeleton. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2001; 39:432-439)

Wirkung von Mibefradil auf hLEZ bei In-vitro-Versuchen

- Inhibition der Zelladhäsion bei einer Konzentration ab 10 µM
- Fragmentierung des Zytoskeletts (Aktin)

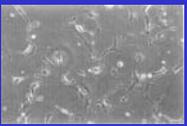


Abb. 1: hLEZ nach Inkubation mit Mibefradil über 24 h

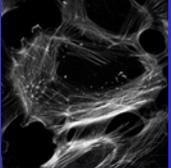


Abb. 2: Actinzytoskelett, hLEZ

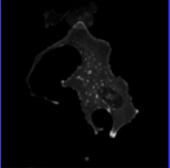


Abb. 3: Actinzytoskelett (hLEZ) nach Einwirkung von 20 µM Mibefradil

In-vitro-Inhibition von hLEZ mittels pharmakologisch modifizierter Kapselspannringe

Material und Methode

Info@micromod.de 

Immobilisierung des Kalzium-Antagonisten Mibefradil

1. Synthetisierung der Mikrokapselfn nach der Solvent-Evaporation-Methode unter Verwendung von PLGA (Poly(lactid-co-glycolid))
2. Mikroverkapselung des Wirkstoffes
3. Inkorporierung des Wirkstoffes in eine poröse Silicatmatrix



Abb. 4: Mikrokapselfn, makroskopisch

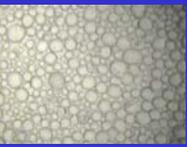


Abb. 5: Mikrokapselfn, Lichtmikroskopisch

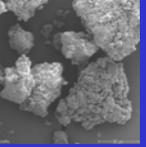


Abb. 6: Mikrokapselfn, RIM

In-vitro-Inhibition von hLEZ mittels pharmakologisch modifizierter Kapselspannringe

Material und Methode

Info@micromod.de 

Ankopplung von immobilisiertem Mibefradil an die Oberfläche von Kapselspannringen (PMMA)

1. Anfeuchten der Kapselspannringe mit Ethanol
2. Behandlung mit Monomergemisch (0,1 M Methacrylsäuremethylester + 0,1 M Methacrylsäurepropylester in Ethanol (5 ml)), 5 min., 2 mal
3. Trocknen bei Raumtemperatur, 10 min.
4. Einbringen der vorbehandelten Kapselspannringe in Kristallstierschale mit immobilisiertem Mibefradil, 10 min.

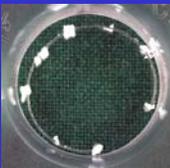


Abb. 7: pharmakologisch modifizierter Kapselspannring

→ **Modifikation der Kapselspannringe mit immobilisiertem Mibefradil möglich**

In-vitro-Inhibition von hLEZ mittels pharmakologisch modifizierter Kapselspannringe

Material und Methode

Modifizierte Kapselspannringe in der hLEZ-Kultur

1. Adhäsionsverhalten
2. Metabolische Aktivität (MTT-Test)
3. Vitalität (Live/Dead-Test)

In-vitro-Versuche zum Adhäsionsverhalten von hLEZ mit modifizierten Kapselspannringen

Zellkultur

- hLEZ (Kapsulorhexispräparat)
- DMEM + 10% FCS + Gentamycin
- Kultivierung in 48 well-Platte, 37°C + 5% CO₂
- subkonfluenter Zellrasen (Ø 20 d) Zugabe der modifizierten Kapselspannringe (10 µM, 20 µM, 30 µM)
- Inkubation für 24 h

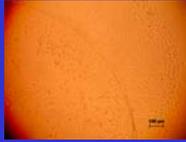


Abb.8: immobilisierte hLEZ, Kapsulorhexispräparat



Abb.9: hLEZ nach Inkubation mit modifizierter Kapselspannung (30 µM) über 24 h

In-vitro-Versuche zur metabolischen Aktivität von hLEZ mit modifizierten Kapselspannringen mittels MTT-Test (Cell Proliferation Kit D)

hLEZ-Zellkultur inkubiert mit modifiziertem Kapselspannung

- Inkubation mit MTT (10 µl, 4 h)
- Inkubation mit Solubilisierungslösung (100 µM, über Nacht)

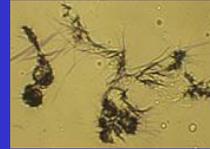


Abb.10: hLEZ, Salzkristalle nach Inkubation mit MTT

→ Messung der spektrofotometrischen Absorption (Elisa-Reader)

Ergebnisse

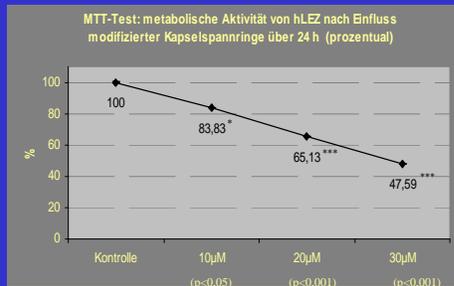


Diagramm 1

→ **signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität von hLEZ**

In-vitro-Versuche zur Vitalität von hLEZ mit modifizierten Kapselspannringen mittels Live/Dead-Test

Analyse: Fluoreszenzmikroskopie (Zellfläche, Zellmorphologie)

hLEZ-Zellkultur inkubiert mit modifiziertem Kapselspannung

- Waschen mit PBS
- Inkubation mit Ethidium homodimer (4 µM) und Calcein AM (8 µM), 20 min.

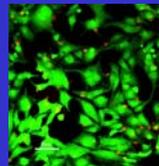


Abb.11: hLEZ, Kontrolle

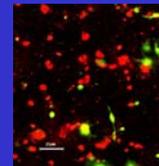


Abb.12: hLEZ, nach Inkubation mit modifiziertem Kapselspannung

Weiterführende Untersuchungen

- Etablierung eines In-vitro-Organkulturmodells
 - erste Voruntersuchungen zeigten das hLEZ im Organkulturmodell proliferieren
 - Testung von immobilisiertem Mibefradil im In-vitro-Organkulturmodell
- Testung der pharmakologisch modifizierten Kapselspannringe im In-vitro-Organkulturmodell (Spenderaugen)



Abb.13: In-vitro-Organkulturmodell



Abb.14: hLEZ im In-vitro-Organkulturmodell



Abb.15: In-vitro-Organkulturmodell mit immobilisiertem Mibefradil, 30 µM



Abb.16: hLEZ nach Inkubation mit 30 µM Mibefradil über 24 h

Schlussfolgerung

Immobilisiertes Mibefradil gebunden an einen Kapselspannung führt unter In-vitro-Bedingungen zur Hemmung von proliferierenden hLEZ. Die Möglichkeit zukünftig im Rahmen der Kataraktchirurgie ein mit Mibefradil beladenen Kapselspannung zu implantieren, der kontinuierlich Wirkstoff freigtibt sowie potentiell toxisch nur auf proliferierende Zellen wirkt, stellt somit eine Chance für die Nachstarprophylaxe dar.



Vielen Dank