

Aus der Augenklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. F. Grehn

**Einsatz des Excimer-Lasers zur Präparation  
von Spendertransplantaten für die  
posteriore lamelläre Keratoplastik**

**Inaugural - Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Maren Widmann**  
aus Obertraubling

Würzburg, September 2010

Referent: Prof. Dr. med. G. Geerling

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dipl.-Phys. T. Meigen

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08. April 2011

Die Promovendin ist Ärztin

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Ziel der Arbeit .....	1
1.2 Hornhaut .....	2
1.3 Perforierende und lamelläre Keratoplastik .....	9
1.4 Posteriore lamelläre Keratoplastik .....	13
1.5 Excimer-Laser .....	15
1.6 Fragestellungen .....	18
<b>2. Material und Methoden</b> .....	19
2.1 Allgemeiner Ablauf mit Flusschema .....	19
2.2 Gewinnung der Spenderbulbi, Excimerlaserablation, Präparation der Korneo- skleralscheiben .....	21
2.3 Pachymetrie .....	23
2.4 Excimer-Laser-Ablation .....	24
2.5 Histologie .....	25
2.6 Beurteilung der Endothelvitalität vor und nach 48 Std. Inkubation Alizarin-Rot-/Trypan-Blau Doppelfärbung .....	26
2.7 Rasterelektronenmikroskopie .....	30
2.8 Statistische Methoden .....	31
<b>3. Ergebnisse</b> .....	33
3.1 Pachymetrie .....	33
3.2 Histologie .....	35
3.3 Endothelvitalität .....	39
3.3.1 Schaden unmittelbar nach Excimer-Laser-Ablation (Nekrose) .....	42
3.3.2 Schaden nach 48-stündiger Inkubation (Apoptose) .....	45
3.4 Oberflächenstruktur der Spenderlentikel .....	48
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	50

<b>4. Diskussion</b> .....	51
4.1 Pachymetrie .....	51
4.2 Histologie.....	52
4.3 Endothelvitalität.....	53
4.3.1 Schaden unmittelbar nach Excimer-Laser-Ablation (Nekrose).....	53
4.3.2 Schaden nach 48-stündiger Inkubation (Apoptose) .....	57
4.4 Oberflächenstruktur der Spenderlentikel.....	59
4.5 Antworten auf Fragestellungen .....	61
<b>Zusammenfassung</b> .....	63
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	65
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	69
<b>Danksagung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	kleiner als
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µs	Mikrosekunde
Abb.	Abbildung
Aq 5	Aquaporin 5
ArF	Argon-Fluor
ATP	Adenosintriphosphat
CA	Carboanhydrase
ca.	circa
Cl <sup>-</sup>	Chlor
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
EL	Excimer-Laser-Gruppe
et al.	lat. et alii ( und andere)
g	Gramm
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonat
HE	Hämatoxilin-Eosin
Hz	Hertz
K <sup>+</sup>	Kalium
KEL	Kultur-Excimer-Laser-Gruppe
KG	Kontrollgruppe
KKG	Kultur-Kontrollgruppe
LASIK	Laser in situ Keratomileusis
LKP	lamelläre Keratoplastik

Max	Maximum
Min	Minimum
min	Minuten
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
n	Anzahl
N.	Nervus
Na <sup>+</sup>	Natrium
nm	Nanometer
OLCR	optical low-coherence reflectometry
pH	pondus hydrogenii = Maß für Wasserstoffionenkonzentration
PKP	perforierende Keratoplastik
PLKP	posteriore lamelläre Keratoplastik
PTK	Phototherapeutischer Keratektomie
s.	siehe
sog.	sogenannt
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
zw.	zwischen

# **1. Einleitung**

## **1.1 Ziel der Arbeit**

Die gegenwärtig am häufigsten durchgeführte Transplantation ist die Hornhauttransplantation [1]. Dabei wird bislang das Verfahren der perforierenden Keratoplastik, bei der eine komplette Hornhaut transplantiert wird, als Standardverfahren durchgeführt, obwohl die Ursache der Hornhauttrübung meist auf eine der fünf Schichten der Kornea beschränkt ist [2]. Daher wäre eine lamelläre Keratoplastik, bei der nur die beschädigten Hornhautschichten transplantiert werden, vorzuziehen. Der Ersatz aller Schichten bringt mehr postoperative Komplikationsmöglichkeiten mit sich als bei alleiniger Transplantation der geschädigten Schicht.

Die posteriore lamelläre Keratoplastik kommt zum Einsatz bei unzureichender Funktion des Endothels des Empfängers. Hierbei werden beim Empfänger Endothel und Descemet-Membran durch eine limbo-sklerale Tunnelinzision mit einer entsprechenden Spenderlamelle ersetzt.

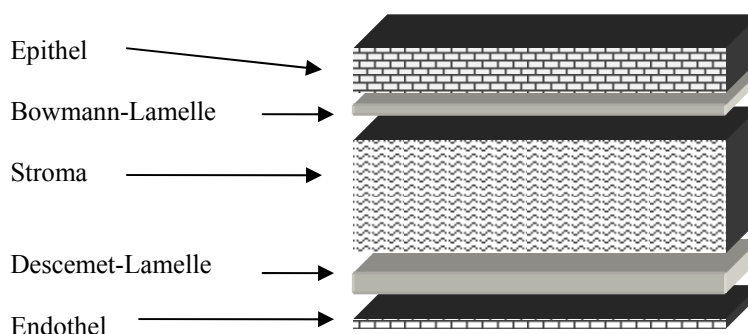
Bisher wurden Transplantate für eine posteriore lamelläre Keratoplastik v.a. manuell oder mittels Mikrokeratom hergestellt. Der Vorteil der manuellen Präparation ist, dass sie mit ~200 € die preisgünstigste Methode ist (Zitat). Der Nachteil liegt in einer geringen Genauigkeit und Vorhersehbarkeit bzgl. der Restdicken der Transplantate und einer höheren Perforationsgefahr während der Herstellung dieser. Die Präparation mittels Mikrokeratom bringt den Vorteil eines standardisierbarem Verfahrens im Vergleich zur manuellen Methode. Der Nachteil liegt in den hohen Anschaffungskosten von ~50.000 € für ein Mikrokeratom und in der Gefahr einen Fehlschnitt zu machen. Eine neue Methode ist die Präparation der Transplantate mittels Excimer-Laser, indem man das Hornhautgewebe bis zur gewünschten Restdicke ablasert. Die Präparation mittels Excimer-Laser bringt die höchste Genauigkeit eines individuellen Präparationsmuster mit sich und ist die einfachste und sicherste Methode, wegen der sehr geringen Perforationsgefahr. Allerdings ist sie auch die teuerste Methode, da eine Neuanschaffung eines Excimer-Lasers ~250-300.000 € kostet. Jedoch wird der Excimer-Laser auch vielseitig in der refraktiven Chirurgie eingesetzt und ist daher in

vielen Kliniken schon vorhanden. In dieser Arbeit wurde daher der Einsatz des Excimer-Lasers zur Präparation von Spendertransplantaten überprüft. Von besonderem Interesse war dabei vor allem der Effekt des Lasers auf die stromale Oberflächenbeschaffenheit und das Endothel des Transplantates.

## 1.2 Hornhaut

Die Hornhaut (Kornea) bildet zusammen mit der Lederhaut (Sklera) die äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi). Sie geht an ihrem Rand, dem Limbus, unmittelbar in die Sklera über. Die Hornhaut gehört zum dioptrischen Apparat und ist uhrglasförmig, d.h. nach vorn hin konvex, nach hinten hin konkav gewölbt, mit einem Krümmungsradius von 7,8 mm [3]. Die refraktive Stärke beträgt 40-44 Dioptrien und macht zwei Drittel der Gesamtrefraktivität des Auges aus. Die menschliche Hornhaut hat eine Fläche von 90-100 mm<sup>2</sup>, bedingt durch die elliptische Form mit dem vertikalen Durchmesser von 9-11 mm und dem horizontalen Durchmesser von 11-12 mm. Die Kornea ist zentral ca. 550 µm dick und nimmt zur Peripherie hin auf 670 µm zu [3, 4].

Die Hornhaut setzt sich mikroskopisch von außen nach innen aus fünf Schichten zusammen (Abb. 1): Hornhautepithel (Epithelium anterius), Bowman-Lamelle (Lamina limitans anterior), Stroma (Substantia propria), Descemet-Lamelle (Lamina limitans posterior) und Hornhautendothel (Epithelium posterius).



**Abb.1** Schematischer Aufbau der fünf Schichten der Hornhaut

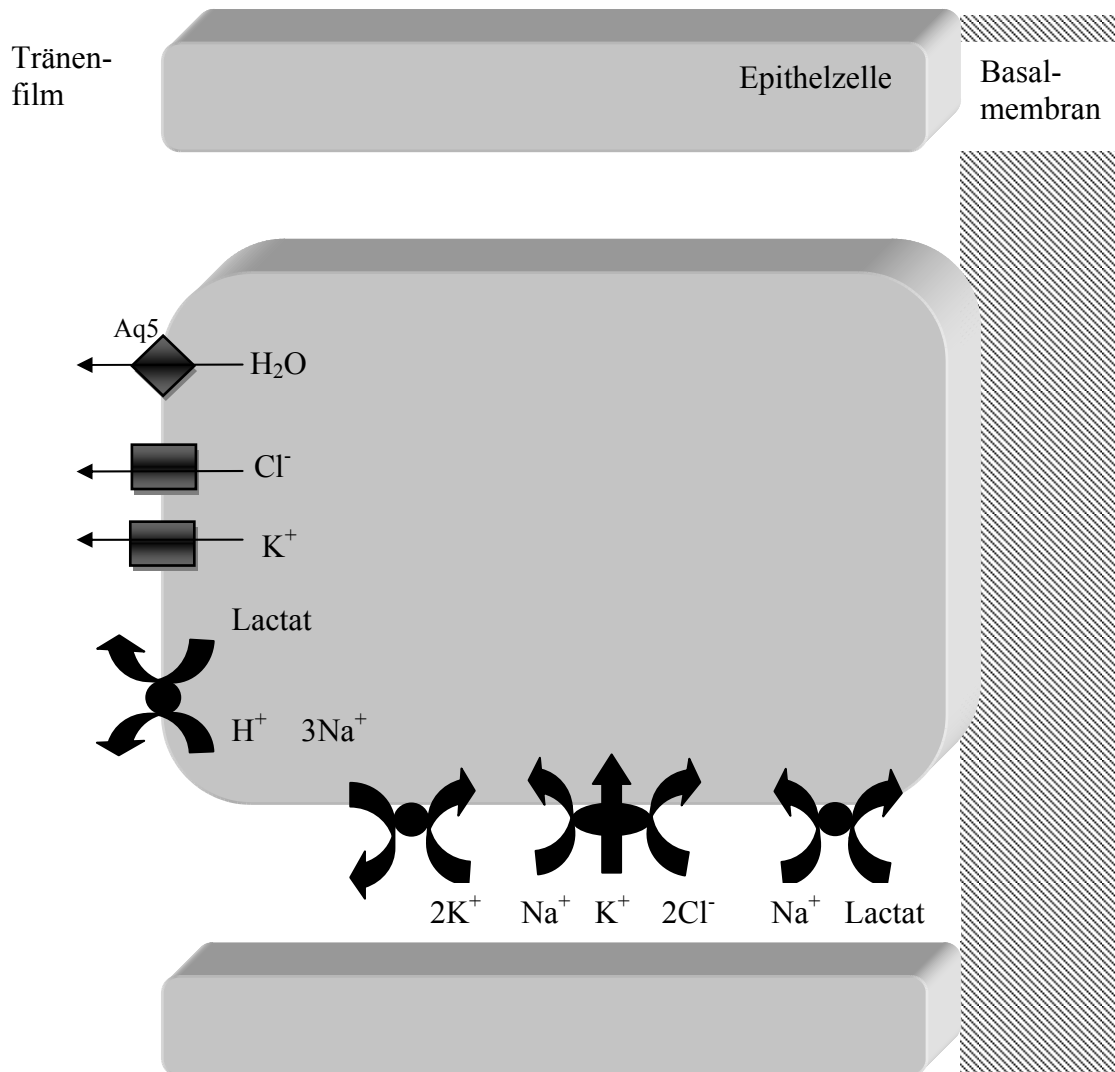
Die Hornhaut ist - entgegen ihrem Namen – von nichtverhornendem Epithel bedeckt. Das Epithel ist ein mehrschichtiges (fünf bis sechs Zellschichten), unverhorntes Plattenepithel mit einer Dicke von ca. 50 µm. Die oberste Zellschicht besteht aus



abgeplatteten Zellen mit Mikrovilli und Mikroplicae und einer Glykokalix aus u.a. Membranmucin MUC1, an der der Tränenfilm haftet. Die mittlere Zellschicht besteht aus sog. Flügelzellen, die konvex gekrümmt sind. Die unterste Zellschicht besteht aus säulenförmigen bis kubischen Basalzellen, die über Hemidesmosomen in der Basallamina verankert sind. Basalzellen sind die einzigen Zellen die proliferieren. Ihre Tochterzellen differenzieren sich zu Flügel- oder Oberflächenzellen. Die Zellen der einzelnen Schichten sind über Desmosomen, Adhärenskontakte und Nexus miteinander verbunden, über die sie miteinander kommunizieren und Transportvorgänge regulieren [3, 4].

Das Epithel eliminiert überschüssiges Lactat, entstanden bei der anaeroben Glycolyse, aus dem Stroma über einen  $H^+$ -Lactat-Cotransporter in den Tränenfilm. Basolateral wird Lactat über einen  $Na^+$ -Lactat-Cotransporter aufgenommen. Hier befindet sich außerdem die  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase und ein  $Na^+$ - $K^+$ - $2Cl^-$ -Cotransporter, über den  $Cl^-$  und  $K^+$  aufgenommen und über entsprechende Kanäle apikal in den Tränenfilm abgegeben werden.  $H_2O$  strömt durch Aquaporin 5 nach. Diese kontinuierliche Dehydratation trägt zum Erhalt der Transparenz bei [3]. (Abb.2)

Das Epithel übernimmt außerdem eine Barrierefunktion und trägt somit zur Aufrechterhaltung eines konstanten Wassergehalts der Kornea bei. Die Resistenz des Epithels durch Tight junctions zwischen den Zellen an der Oberfläche verhindert die Diffusion von Elektrolyten ins Stroma [5, 6].



**Abb.2** Schematischer Aufbau einer Epithelzelle und ihrer Transportvorgänge. Aq5 = Aquaporin 5

Die Bowman-Lamelle trennt das Epithel vom Stroma. Sie ist eine zellfreie Lamelle und besteht aus dünnen Kollagenfibrillen und proteoglykanreicher Grundsubstanz. Sie ist ca. 8-14  $\mu\text{m}$  dick [3]. Nach einer Verletzung regeneriert die Bowman-Lamelle nicht, aber es bildet sich trotzdem ein gut organisiertes Epithel aus. Viele andere Säugetiere besitzen keine Bowman-Lamelle, so dass deren physiologische Rolle unklar bleibt [4].

Das Stroma trägt mit einer Dicke von 450  $\mu\text{m}$  9/10 zur Gesamtdicke der Kornea bei und besteht zu 78% aus Wasser. Das restliche Trockengewicht wird zu 78% von Kollagen gebildet. Die Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von 23-30 nm sind parallel und uniform angeordnet. Die Distanz zwischen einzelnen Fibrillen beträgt 41nm. Die Kollagenfibrillen bilden ca. 250-300 Lamellen. Diese sind 1-2,5  $\mu\text{m}$  dick und 100-200

µm breit. Zwischen den Lamellen liegen die Keratozyten, die Fibroblasten des Stromas, welche Kollagen bilden, hauptsächlich Typ I. Sie sind über ihre langen Ausläufer untereinander über Nexus verbunden und bilden somit ein Netzwerk [3, 4].

Für die Transparenz der Kornea sind der hohe Wassergehalt und die regelmäßige Anordnung und Dicke der Kollagenfibrillen entscheidend. Für die Anordnung sind Proteoglykane nötig, welche hauptsächlich aus dem Glycosaminoglykan Keratansulfat und den Bindungsproteinen Lumican, Keratocan, Mimecan und Fibromodulin bestehen [3, 4]. Störungen in der Synthese führen zu unregelmäßigen Fibrillendurchmessern und somit zu Defekten in der Transparenz.

Proteoglykane besitzen außerdem eine hohe Wasserbindungskapazität, welche für ein Stromaödem verantwortlich sind, wenn Flüssigkeit Zugang zum Stroma erhält, wie es der Fall bei Schädigung des Epithels oder Endothels ist. Die Neigung zur Schwellung wird mittels des Schwellungsdrucks beschrieben, der bei normaler Hornhautdicke 50 mmHg beträgt. Normalerweise befinden sich der Schwellungsdruck und die dehydrierenden Mechanismen in einem konstanten Gleichgewicht. Wenn die Dehydratation infolge einer Erkrankung oder eines Traumas weniger effektiv wird, schwillt die Kornea, bis ein neues Gleichgewicht entsteht [5].

Um den stromalen Wassergehalt zu quantifizieren wurde der Begriff „stromale Hydratation“ eingeführt. Hydratation ist definiert als das Gewicht des Wassers geteilt durch das Gewicht der Trockensubstanz (g Wasser/g Trockengewicht). Der Wert für die menschliche Hornhaut beträgt ca. 3,5. Der Vorteil der Angabe der stromalen Hydratation gegenüber der Prozentangabe des Wassergehalts liegt darin, dass bei Zu- oder Abnahme des Wassergehalts der Wert linear mit der Dicke der Kornea korreliert [5].

Die Descemet-Lamelle trennt das Stroma vom Endothel und ist Teil der Basalmembran des Endothels. Im Stroma sind die Kollagenfasern nur schwach verankert, so dass man die Descemet-Lamelle leicht abziehen kann. Ihre Dicke nimmt mit dem Alter von anfangs 3-4 µm auf 10-12 µm zu. Die Descemet-Lamelle besteht aus Kollagen Typ VIII, welches sehr dicht und geordnet liegt.

Das Hornhautendothel ist einschichtig und besteht aus hexagonalen Zellen, die ca. 20µm breit und 3-4 µm dick sind (Abb. 3). Es weist eine Zelldichte von ca. 3000

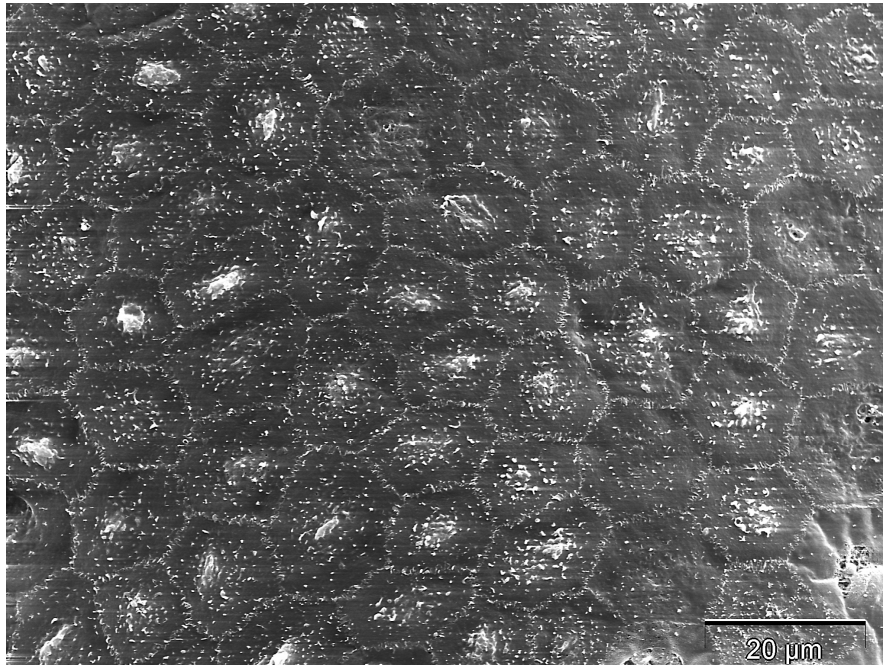
Zellen/mm<sup>2</sup> auf. Zur Vorderkammer hin besitzt jede Zelle 20-30 Mikrovilli, welche der Oberflächenvergrößerung dienen. Die Zellen sind untereinander über Haftkomplexe, wie Zonula occludens, Macula occludens und Macula adhaerens verbunden und können über gap junctions miteinander kommunizieren. Die Zellen enthalten anstelle von Zytokeratin fast ausschließlich Vimentinfilamente. Sie besitzen einen großen Zellkern (7µm Durchmesser) und viele Zellorganellen (Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat), welche indizieren, dass die Zelle metabolisch und sekretorisch aktiv ist [3, 4, 6, 7].

Die Aufgabe des Endothels besteht in der Regulation des Wasserhaushaltes und somit in der Aufrechterhaltung der Transparenz der Kornea. Diese wird durch zwei Mechanismen gesteuert:

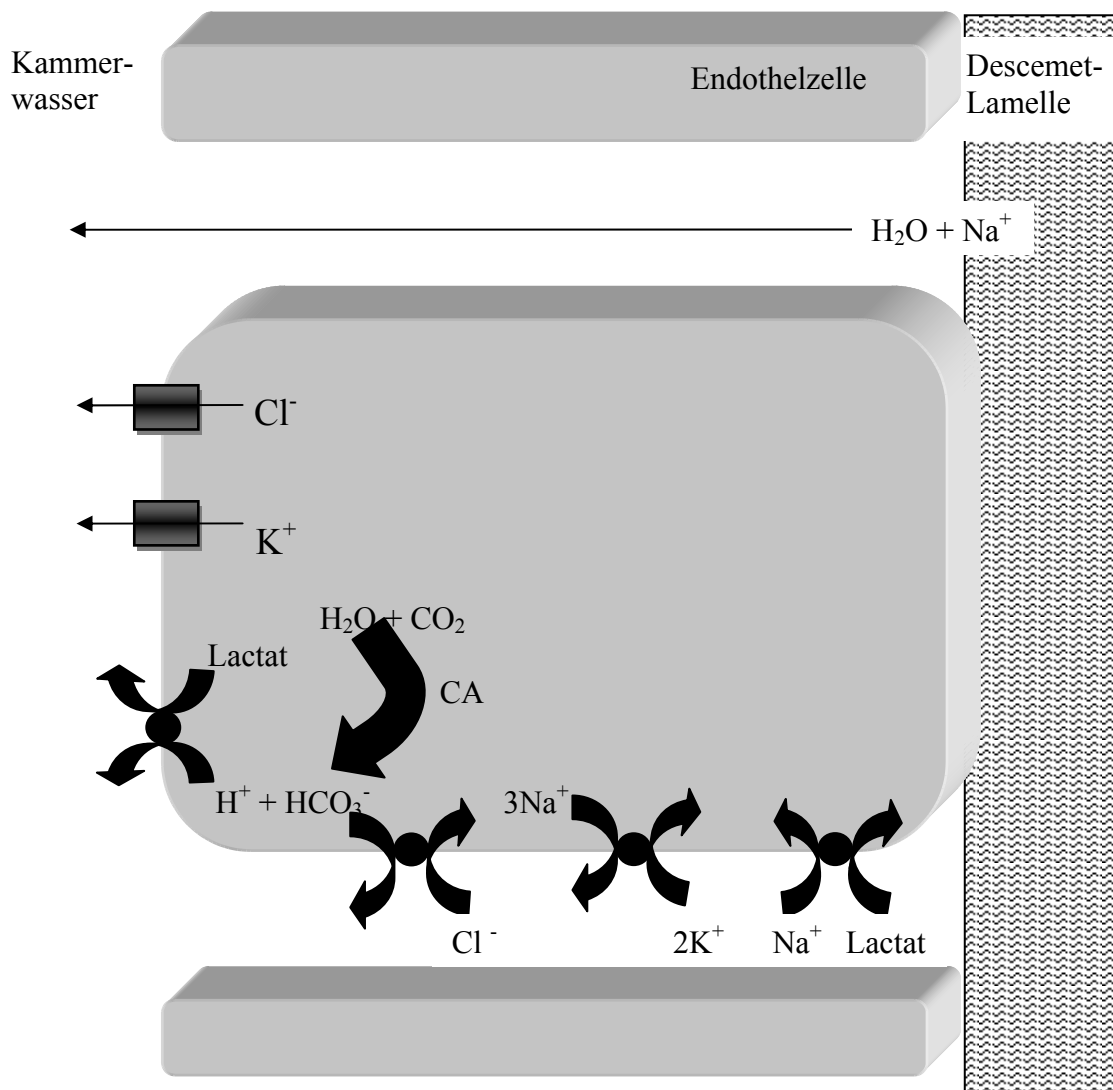
- a) Die Barrierefunktion der Zellen verhindert einen unkontrollierten Einstrom von Kammerwasser in die Hornhaut. Die Resistenz des Endothels gegen Ionendiffusion ist zwar geringer als die des Epithels, wegen fehlender regelmäßiger tight junctions, aber größer als die des Stromas und trägt somit trotzdem einen wichtigen Teil zur Regulation bei. Die relativen Resistenzen für Diffusion von Epithel, Stroma und Endothel betragen 2000 : 1 : 10 [5].
- b) Die endotheliale Pumpfunktion dagegen transportiert einströmendes Wasser aktiv aus der Hornhaut in das Kammerwasser. Die Pumpfunktion ist ein energieverbrauchender Stoffwechselprozess [8]. Dieser erfolgt über verschiedene Transportmechanismen, die eine Flussrate von 6,7 µm/cm<sup>2</sup>/h gegen den normalen hydrostatischen Druck erreichen [5]. Die Zellen geben Cl<sup>-</sup> über Cl<sup>-</sup>-Kanäle und Lactat aktiv über einen Lactat-H<sup>+</sup>-Cotransporter an das Kammerwasser ab. K<sup>+</sup> folgt passiv über K<sup>+</sup>-Kanäle, Wasser und Na<sup>+</sup> parazellulär über Zonulae occludentes. An der basolateralen Membran wird Cl<sup>-</sup> über einen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>-Austauscher aufgenommen und Lactat über einen Lactat-Na<sup>+</sup>-Cotransporter. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> wird ständig über die Carboanhydrase neu gebildet. Basolateral befindet sich außerdem die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase [3] (Abb. 4).

Die Endothelschicht ist nicht regenerationsfähig, da die Fähigkeit zur Zellteilung fehlt. Bei der Geburt sind ca. 380.000 Endothelzellen homogen verteilt. Mit steigendem Lebensalter kommt es zu einer Inhomogenität bedingt durch den Verlust von 1600

Zellen pro Jahr. Schäden am Endothel werden mit Hypertrophie der verbliebenen Zellen kompensiert [8]. Erst ab einer Zelldichte von 400-700 Zellen/mm<sup>2</sup> verliert das Endothel die Fähigkeit die Kornea transparent zu halten [7].



**Abb. 3** REM Aufsicht auf das Endothel einer Hornhaut bei 1000-facher Vergrößerung. Die hexagonalen Zellen und deren vorgewölbter Zellkern sind gut erkennbar. Bei den feinen weißen Strukturen handelt es sich um Mikrovilli.



**Abb. 4** Schematischer Aufbau einer Endothelzelle und ihrer Transportvorgänge. CA = Carboanhydrase

Die gesamte Kornea ist frei von Blut- und Lymphgefäßen, was zusätzlich zur Transparenz derselben beiträgt. Die Hornhaut wird hauptsächlich über Diffusion von Sauerstoff aus der Atmosphäre versorgt, den sie über den Tränenfilm aufnimmt. Das Endothel nimmt auch einen Teil Sauerstoff aus dem Kammerwasser der Vorderkammer auf, über das auch Glucose und Aminosäuren zur Verfügung stehen. Des Weiteren diffundiert Sauerstoff aus dem stark vaskularisierten Limbus in die Kornea.

Die Kornea ist das am stärksten innervierte Gewebe des Auges und die Dichte der Nervenendigungen ist 300-400 Mal größer als in der Haut. Die meisten sensorischen Nervenfasern stammen aus dem N. ciliaris des N. ophthalmicus der aus dem N. trigeminus stammt. Die Nervenfasern verlieren nach Eintritt in die Mittelschicht des

Stromas ihre Myelinscheide und ziehen bis zur Bowman-Lamelle, unter welcher sie einen Plexus bilden. Die Nervenfasern enden nach Penetration der Bowman-Lamelle in der Flügelzellschicht des Epithels. Dies erklärt die hohe Empfindlichkeit und das Schmerzempfinden bei oberflächlichen Verletzungen des Epithels [4].

### **1.3 Perforierende und lamelläre Keratoplastik**

Die Keratoplastik (Hornhauttransplantation) beschreibt eine Operation bei der geschädigtes Hornhautgewebe durch Spendergewebe ersetzt wird. Die Hornhautverpflanzung kann lamellär oder perforierend geschehen. Die lamelläre Keratoplastik (LKP) ist eine Form der Transplantation bei der nur ein Scheibchen bestimmter Schichten durch ein entsprechend dickes Spenderscheibchen ersetzt wird. Die perforierende Keratoplastik (PKP) dagegen ist sehr viel invasiver, da die Hornhaut in ihrer ganzen Dicke ersetzt wird.

Das Konzept der Hornhauttransplantation ist ca. 165 Jahre alt. Erfolge lassen sich aber erst Ende des 19. Jahrhunderts mit der ersten lamellären Keratoplastik von Arthur von Hippel 1888 datieren. Die perforierende Keratoplastik gelang dem Österreicher Eduard Zirm 1905 zum ersten Mal [1, 5, 9]. Die anfangs beschriebenen Techniken dieser Chirurgen wurden über viele Jahre weiter verbessert. Dazu zählten die Entwicklung von Operationsmikroskopen, feineren Instrumenten und Nahtmaterial, sowie der Einsatz von Antibiotika und Steroiden in der Nachbehandlung. Heute werden in den USA jährlich ca. 40.000 und in Deutschland ca. 4000-5000 Transplantationen durchgeführt. Dies macht die Hornhauttransplantation zur weltweit häufigsten Transplantation [1].

Die Indikationen zur Hornhauttransplantation lassen sich unterteilen in optisch, kurativ und tektonisch. Ziele sind vor allem eine verbesserte Sehschärfe, die Heilung einer Erkrankung oder die Gewebestabilisierung und Defektdeckung, wie bei der tektonischen Indikation [5]. In Tabelle 1 sind verschiedene Diagnosen den drei Indikationsbereichen zugeordnet [10].

<b>Optisch</b>	<b>Kurativ</b>	<b>Tektonisch</b>
Zentrale Trübungen	Tiefe Keratitis	Traumatische Hornhautdefekte
- Dystrophien	- Herpetisch	Perforiertes Hornhautulkus
- Narben	- Akanthamöben	Postoperative Wundfistel
Pathologische Krümmungen	Endothel-Dekompensation	
	Primär Fuchssche Dystrophie	
	Hintere polymorphe Dystrophie	
- Keratokonus		
- Keratoglobus	Sekundär nach intraokularer Chirurgie nach Transplantatversagen	

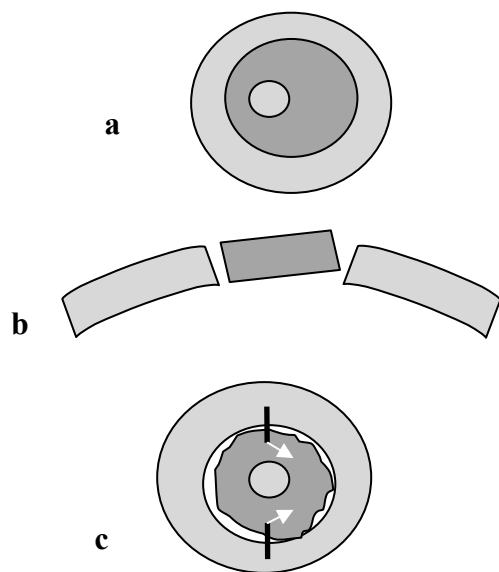
**Tab.1** Indikationen zur Keratoplastik. Dargestellt ist die Unterteilung der Indikationen in optisch, kurativ und tektonisch.

Die PKP setzte sich als Standardverfahren durch, da sie zum einen technisch schnell (ca. 45 min.) und einfach durchführbar ist, zum anderen die optische Achse nicht durch Wundheilungsprozesse beeinflusst wird. Außerdem ist eine immunologisch bedingte Abstoßungsreaktion relativ selten, so dass man auf den Einsatz von systemischen Immunsuppressiva meist verzichten kann.

Bei der PKP wird die Spenderhornhaut oft von der Endothelseite, die Empfängerhornhaut stets von epithelseits mit einem Trepan unterschiedlichen Durchmessers trepaniert. Das Transplantat wird in Deutschland meist mit einer doppelt fortlaufenden, gekreuzten Nylonnaht nach Hoffmann fixiert. Der erste Faden kann frühestens nach vier bis sechs, der zweite nach 12-14 Monaten entfernt werden [9].

Intraoperative Faktoren, wie die gewählte Trepanations- und Nahttechnik zur Adaptierung des Transplantates spielen eine wichtige Rolle für die postoperativen refraktiven Ergebnisse und die Transparenz des Transplantats. Hierbei soll vor allem der postoperativ entstehende Astigmatismus klein gehalten werden. Dieser entsteht meist durch eine Dezentrierung der Empfänger- und/oder Spendertrepanation, durch vertikale Verkippung des Transplantats bei ungleichen Schnittwinkeln während der Trepanation oder durch "horizontale Torsion" bei asymmetrischer Fadenlegung [9]. (Abb.5)





**Abb. 5** Gründe für hohen Astigmatismus nach PKP a Dezentrierung, b vertikale Verkipfung, c horizontale Torsion (angelehnt an [9]).

Da die Ursache der Hornhauttrübungen auf eine der fünf Schichten der Kornea zu beschränken ist, ist eine PKP oft als „Überbehandlung“ anzusehen. Außerdem bringt ein Ersatz aller Schichten mehr postoperative Komplikationsmöglichkeiten mit sich, als bei alleiniger Transplantation der geschädigten Schicht [2].

Die LKP kommt in den letzten Jahren wieder mehr zum Einsatz. Dennoch beträgt die Häufigkeit dieses OP-Verfahrens immer noch nur 5% aller Keratoplastiken. Gefürchtet waren v.a. Wundheilungsstörungen mit Narbenbildung im lamellären Spaltraum, die sog. „Interface-Problematik“ [1].

Die LKP lässt sich heute in folgende Techniken unterteilen:

- Tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik (tiefe ALKP)
- Posteriore lamelläre Keratoplastik (PLKP)
- Lamelläre Segment-Keratoplastik
- Epikeratoplastik

Bei der ALKP wird beim Empfänger das Endothel und die Descemet-Lamelle erhalten und ein Spendertransplantat bestehend aus Stroma und Epithel eingesetzt. Vorteile dieser Methode sind, dass das Endothel des Empfängers erhalten bleibt und das Transplantatüberleben damit unabhängig von der Endothelqualität des Spenders ist. Die

tiefe ALKP ist v.a. indiziert bei tiefen Stromanarben und –dystrophien sowie beim Keratokonus. Um die besten optischen Ergebnisse zu erzielen ist die Freilegung der Descemet-Lamelle wichtig, da sonst Stromalamellen von Empfänger und Spender aufeinanderliegen, so eine Narbenreaktion in dieser Kontaktzone entsteht und die Visusergebnisse schlechter ausfallen als bei PKP. Da die Technik zudem relativ schwierig ist, kommt es bei bis zu 40% der Operationen zu einer unbeabsichtigten Perforation, so dass dann auf eine PKP zurückgegriffen wird. [2].

Die Segmentkeratoplastik kommt meist aus tektonischen Gründen zum Einsatz, d.h. bei peripheren Keratektasien und Ulcera. Sie dient zur Defektdeckung von Stromaschäden außerhalb der optischen Achse, v.a. bei immunologischen Grunderkrankungen. Die Transplantation ist technisch und zeitlich anspruchsvoll, da das Spendergewebe passgenau auf den bestehenden Defekt modelliert werden muss. Auf Grund eines postoperativen Astigmatismus kann der Visus auf 0,1 limitiert bleiben und es muss postoperativ dann ggf. noch eine weitere Keratoplastik durchgeführt werden, um die Sehkraft zu verbessern [2].

Die Epikeratoplastik ist ein äußerst seltenes Verfahren, bei der die Hornhaut mit einer ganzen Spenderscheibe komplett abgedeckt wird. Die Methode dient hauptsächlich dem Bulbuserhalt bei progredienten, großflächigen Stromaeinschmelzungen [2].

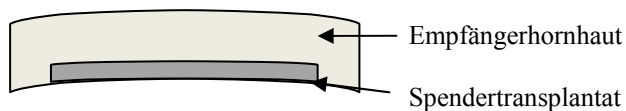
In Tabelle 2 sind die Vor- und Nachteile der LKP und der PKP vergleichend dargestellt. Vorteile der LKP sind ein geringeres Risiko für Immunreaktion bei der tiefen ALKP sowie die Minderung des Risikos für expulsive Blutungen und Sekundärglaukome. Nachteilig sind die noch nicht standardisierten zeitaufwändigen Techniken, sowie die „Interface“-Problematik, bei verbliebenen Stromaresten, die zu schlechteren Visusergebnissen als bei der PKP führen können. Insgesamt ist die LKP allerdings als risikoärmer zu werten. Bei schlechtem Visusergebniss kann immer noch eine PKP angeschlossen werden [1, 2]. Die posteriore lamelläre Keratoplastik wird im nächsten Abschnitt detailliert erläutert.

	LKP	PKP
Vorteile	Geringeres Risiko für Immunreaktion Geringeres Risiko für Blutungen und Sekundärglaukom	Standardisierte, schnelle Technik Transparenz der optischen Achse
Nachteile	Technik nicht standardisiert zeitaufwändig Narben → Visusminderung	Immunreaktion Eingriff am offenen Auge Postoperativer Astigmatismus

**Tab.2** Vergleich der Vor- und Nachteile der lamellären (LKP) und perforierenden (PKP) Keratoplastik

#### 1.4 Posteriore lamelläre Keratoplastik

Bei der posterior lamellären Keratoplastik (PLKP) werden beim Empfänger Endothel und Descemet-Lamelle durch ein Spenderscheibchen aus hinterer Stromalage, Descemet-Lamelle und Endothel ersetzt (Abb. 6).



**Abb. 6** Schematische Darstellung einer PLKP mit Empfängerhornhaut und Spendertransplantat bestehend aus Endothel, Descemet-Lamelle und einem Teil des Stromas.

Eine erste Technik wurde 1965 von Polack beschrieben [11], welche um 1998 durch die Arbeiten von Melles et al. wieder aufgegriffen wurde. Dazu wurde beim Empfänger eine anteriore Lamelle manuell oder per Mikrokeratom präpariert, beiseite geklappt, das posteriore Stroma einschließlich Descemet-Lamelle und Endothel herabstrepaniert und durch Spendergewebe ersetzt. Das Spenderscheibchen wurde ebenso wie die danach in ihre Ausgangsposition zurückgeklappte vordere Hornhautlamelle durch Nähte fixiert. Diese Operation wurde zwar als technisch relativ einfach durchführbar bewertet, sie konnte sich aber, wegen postoperativer Probleme mit der Naht und dem postoperativ resultierenden irregulären Astigmatismus nie durchsetzen [12, 13].

Der Ansatz der limbo-skleralen Inzision für die Keratoplastik wurde zum ersten Mal von Ko et al. 1993 beschrieben. Dieser Schnitt am Übergang von Hornhaut zu Sklera ermöglichte den Zugang zur vorderen Augenkammer und die Einbringung des

Transplantates ohne Präparation einer vorderen Lamelle. Die Technik beinhaltete zunächst aber immer noch korneale Nähte zur Fixierung des Transplantats. Melles et al gelang es 1999 zum ersten Mal eine Transplantation mit limbo-skleraler Inzision durchzuführen ohne das Transplantat mit Nähten fixieren zu müssen, indem er Luft in die Vorderkammer gab, die das Transplantat bei Rückenlagerung des Patienten an das Wirtsgewebe andrückte bis es bedingt durch die Pumpfunktion des Endothels von selbst haftete. Er nannte diese Technik posteriore lamelläre Keratoplastik und erzielte hierdurch den Durchbruch in der modernen Hornhaut-Endothel-Chirurgie [14, 15].

In der Folge wurde die Technik verfeinert, indem die Inzisionsbreite von neun auf fünf Millimeter reduziert wurde. Mit dieser Tunnelinzision wird sowohl das Gewebe des Empfängers entnommen, als auch das Transplantat implantiert [2, 12, 16, 17]. Des Weiteren wurde die Methode vereinfacht, indem beim Empfänger nur noch das Endothel mit Descemet-Lamelle mit Hilfe der sog. „Descemetorhexis“ entfernt wird. [2, 18, 19].

Terry et al. beschrieben 2003 die Vorteile einer idealen PLKP [13]:

1. eine gleichmäßige Oberflächentopographie ohne relevante prä- zu post-operative Änderung des Astigmatismus
2. eine gut vorhersehbare postoperative korneale Brechkraft
3. ein tektonisch stabiler Bulbus, sicher vor Verletzung und Infektion

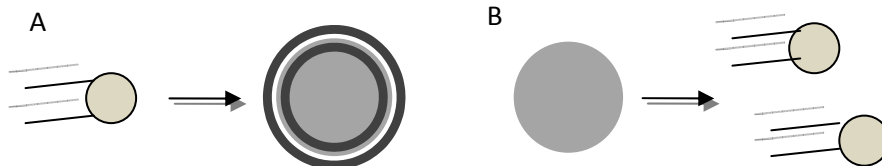
Weitere Vorteile sind die rasche postoperative visuelle Rehabilitation und die vollständige Vermeidung nahtassoziierter Komplikationen wie Nahtinfektion und Neovaskularisation [2, 12, 17, 19]. Auch die „Interface“-Problematik, ließ sich unter Verwendung sehr scharfer Lamelliermesser und Anwendung der Descemetorhexis auf eine Minderheit senken [2, 17]. Außerdem steigt die Sehschärfe postoperativ schneller als bei PKP.

Die größte Komplikation einer PLKP ist die Dislokation der Spenderscheibe. Sie wurde von Terry et al. mit fünf von 100 Fällen beschrieben [12]. Dies hängt möglicherweise mit der Oberflächenstruktur des Transplantates zusammen. Um diese Rate zu senken schlugen die Autoren vor, dass stromale Empfängerbett mittels Spatel aufzurauen, um eine bessere Adhäsion des Transplantats zu erreichen. Außerdem scheint die Adhäsion

vor allem von einem gesunden Spenderendothel abhängig zu sein, das früh seine Pumpfunktion aufnimmt und die darüber liegende Flüssigkeit der Hornhaut resorbiert [12].

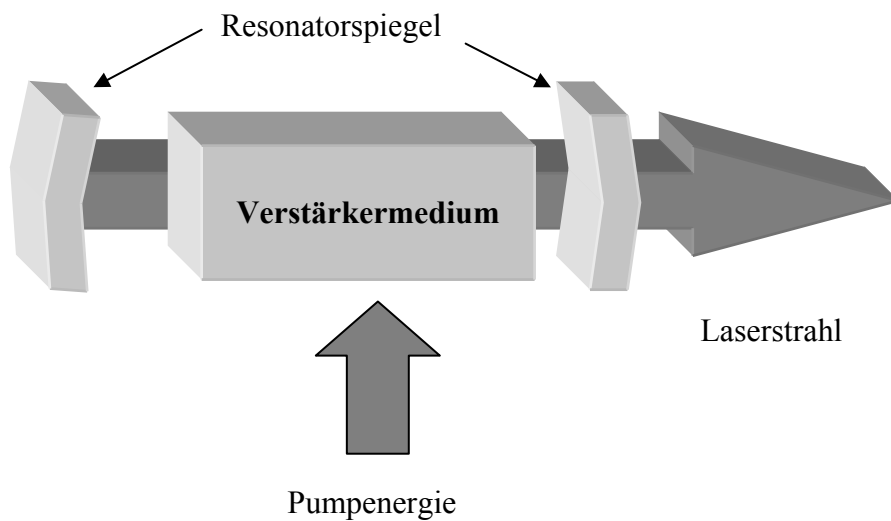
### 1.5 Excimer-Laser

LASER bedeutet „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“, d.h. Lichtverstärkung durch induzierte Emission. Unter induzierter Emission versteht man, wenn sich ein Atom in einem energetisch höheren (angeregten) Zustand befindet und seine gespeicherte Energie in Form eines Lichtquanten abgibt, indem es durch ein anderes Photon stimuliert wird, um so selbst auf ein günstigeres Energieniveau zu sinken. Das entstandene Lichtteilchen gleicht dem ersten in seiner Ausbreitungsrichtung, Frequenz, Phase und Polarisation, d.h. es ist kohärent und verstärkt somit das ursprüngliche Lichtteilchen, welches durch spontane Emission, d.h. selbstständigen, zufälligen Zerfall entstand [20, 21]. (Abb. 7)



**Abb. 7** Induzierte Emission. Dargestellt ist das Auftreffen eines Lichtquanten auf ein angeregtes Atom (A) und die Emission eines neuen Photons, das dem ersten gleicht. Das angeregte Atom fällt in den Grundzustand zurück. (B)

Im Laser entsteht das Licht in einem optischen Resonator. Hier wird durch spontane Emission erzeugtes Licht zwischen zwei Spiegeln immer wieder durch ein Verstärkungsmedium geleitet und erzeugt durch induzierte Emission mehr Licht. Die Energie die zur Aufrechterhaltung der angeregten Zustände benötigt wird, wird von außen durch sog. Pumpen hinzugefügt, z.B. durch Gasentladungen. Es entsteht ein gebündelter Strahl mit hoher Frequenzschärfe, der durch einen teildurchlässigen Spiegel ausgekoppelt wird [20, 21]. (Abb. 8)



**Abb.8** Schematischer Aufbau eines Lasers

Je nach Aufbau des Lasers unterscheidet man Gaslaser, Festkörperlaser und Halbleiterlaser.

Der Excimer-Laser gehört zu den Gaslasern. Excimer kommt aus dem Englischen und steht für „excited dimers“. Ein Excimer ist ein Molekül, das aus zwei Atomen besteht und nur im angeregten Zustand kurzzeitig stabil ist, d.h. keinen stabilen Grundzustand besitzt. Im Grundzustand zerfällt das Excimer wieder in seine zwei Atome. Die Wellenlängen der Excimer-Laser liegen im UV-Bereich und sind durch das bei der Anregung entstehende Molekül festgelegt, z.B. beim ArF-Laser (Argon-Fluorid) auf 193nm [22, 23].

Die Besonderheit der UV-Laser-Ablation ist, dass einzelne Photonen genügend Energie besitzen um Molekülbindungen zu spalten. Die Photonenenergie eines 193 nm Laserlichts ist 6.4 eV, und damit weitaus höher als die für die Spaltung von Molekülbindungen benötigte Energie. Wenn die Photonenkonzentration einen bestimmten Wert überschreitet, zerfällt das Material ablativ (sog. Ablative Photodekomposition). Thermische Prozesse spielen bei der Verwendung eines Excimer-Lasers keine Rolle [24]. Dadurch werden sehr scharfe Schnitte ohne thermische Veränderungen des Materials an der Schnittkante möglich [20, 25]. Der Excimer-Laser wird v.a. in der refraktiven Hornhautchirurgie eingesetzt.

Die optimale Wellenlänge für die Ablation von Hornhautgewebe ist 193 nm. Höhere Wellenlängen penetrieren tiefer und resultieren in einem größeren Schaden des

umgebenden Gewebes, u.a. auf thermischen Effekten beruhend. Zudem ähneln die höheren Wellenlängen den UV-Strahlen der Sonne, die für ihre Mutagenität und Onkogenität bekannt sind [26].

1983 führten Trokel und Srinivasan die ersten Hornhauteingriffe mit dem Excimer-Laser an Kadaveraugen durch [27]. 1986 wurden dann therapeutische Anwendungen, sog. phototherapeutische Keratektomie (PTK) am Menschen durchgeführt. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche klinische Studien durchgeführt, die 1994 zur wissenschaftlichen Anerkennung des Excimer-Lasers zunächst zur Korrektur der Myopie, dann zur Behandlung des myopen Astigmatismus, des hyperopen Astigmatismus und der Hyperopie führten (photorefraktive Keratektomie = PRK) [25]. Auch in der Entwicklung der Keratoplastik spielt der Excimer-Laser eine Rolle. Er wurde bereits zur nichtmechanischen Trepanation sowohl beim Empfänger als auch für die Präparation der Spenderscheibe für die perforierende Keratoplastik eingesetzt. Hierbei schneidet ein rotierender Laserstrahl entlang einer Metallmaske. Dies verhindert die Distorsion während der Trepanation und führt zu glatten Schnittkanten beim Spender und Empfänger und verhindert somit die vertikale Verkipfung des Transplantats. Auf diese Weise lässt sich die optische Qualität nach der Transplantation verbessern [9, 28-30].

Kerr-Muir et al. stellten außerdem fest, dass mittels Laser die Vorhersage der Schnitttiefe exakter möglich ist, als bei manuellen Techniken [31]. Dieser Aspekt könnte für die Herstellung von Hornhautlentikeln für die PLKP mittels Excimer-Laser von großem Interesse sein, da man die Dicke des Transplantates sowohl besser standardisieren als auch ggf. individuell an die Bedürfnisse des Patienten anpassen könnte.

## 1.6 Fragestellungen

In dieser Arbeit wurde die Tauglichkeit des Excimer-Lasers zur Präparation von Spenderlentikeln für eine posteriore lamelläre Keratoplastik ex vivo untersucht. Hierfür ist eine großflächige und tiefe Ablation von Hornhautgewebe bis nahe an das Endothel erforderlich. Die Vorteile eines solchen Vorgehens lägen in einer besonders präzisen/kontrollierten Präparationstechnik, die eine exakte Wahl der Spenderlentikeldicke, zusätzlich eine sehr glatte Lentikeloberfläche und daraus resultierend evtl. ein besseres Visusergebnis ohne Interfacenarbe ermöglichen würde. Ziel der Arbeit war daher die Beantwortung folgender Fragen:

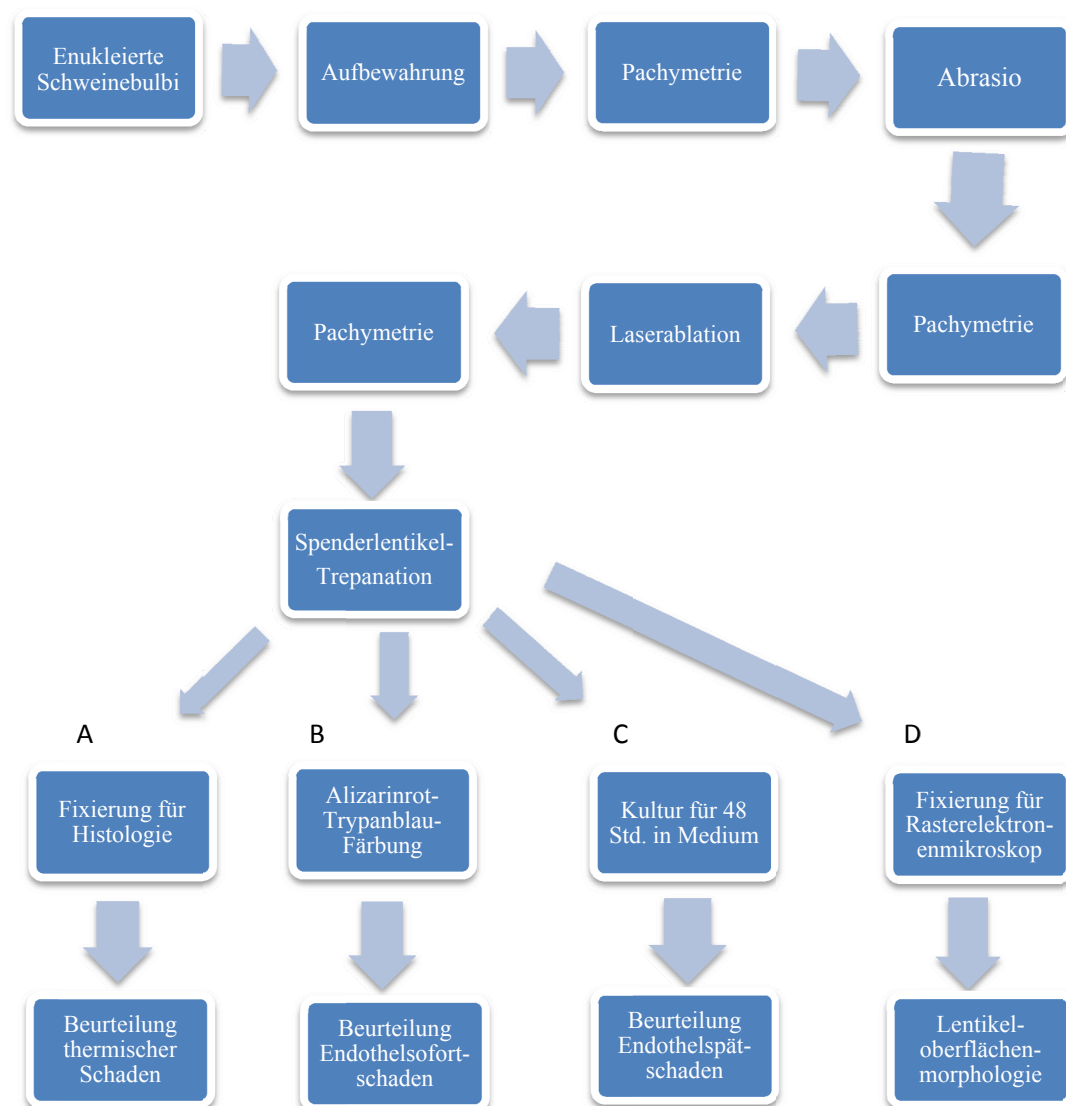
1. Entsteht durch die Laser-Applikation ein in der Histologie der Hornhaut sichtbarer oder auffallender akuter Schaden an einer der verbliebenen Hornhautschichten des Transplantates (insbesondere dem Endothel)?
2. Müssen am Endothel akute oder Spätschäden durch eine vermehrt induzierte Apoptose erwartet werden?
3. Ist ein solcher Schaden evtl. abhängig von der Tiefe der Laserablation?
4. Wie ist die Oberflächenstruktur des Stromas nach einer so ausgedehnten Laserablation?



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Allgemeiner Ablauf mit Flussschema (Abb. 9)**

Frisch enukleierte Schweinebulbi wurden unmittelbar nach Entnahme im Schlachthof bei 4°C aufbewahrt. Zunächst wurde die Hornhautmitteldicke vor und nach einer Epithelabrasio pachymetrisch vermessen. Die Bulbi wurden dann unter standardisierten Bedingungen einer Laserablation unterzogen. Danach wurde die Resthornhautdicke erneut pachymetrisch vermessen und ein Hornhautlentikel, wie für eine posteriore lamelläre Transplantation präpariert. Anschließend erfolgte entweder eine Alizarinrot-Trypanblau-Doppelfärbung, um den Sofortschaden am Endothel feststellen zu können, eine Inkubation für 48 Std. (Stunden) in Kulturmedium, um danach mittels Alizarinrot-Trypanblau-Doppelfärbung einen Spätschaden beurteilen zu können oder eine Fixation für die histologische bzw. rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.



**Abb. 9** Schematische Übersicht des allgemeinen Ablaufs

Für die Untersuchungen wurden fünf Gruppen unterschiedlicher Resthornhautdicke definiert (Tab. 3). Von Anfang an wurden kleine Abweichungen zwischen der gewünschten und der tatsächlichen Restdicke angenommen, denn die erwartete Restdicke wurde zunächst nur rechnerisch ermittelt. Diese ergab sich aus der Pachymetrie nach Abrasio minus die gewünschte Gewebsablation.

Um den mittels Laserpräparation maximal induzierbaren Endothelschaden zu evaluieren, wurde in Gruppe 1 bis zur Perforation, die durch schwallartigen Austritt von Flüssigkeit durch die Restlamelle gekennzeichnet war, gelasert. Auf weitere Gruppen

mit einer Restdicke größer 400  $\mu\text{m}$  wurde verzichtet, da ein solches Transplantat nach bisheriger Kenntnis nicht sinnvoll zum Einsatz käme.

Gruppe	Restdicke
1	Perforation
2	50 -100 $\mu\text{m}$
3	100-200 $\mu\text{m}$
4	200-300 $\mu\text{m}$
5	300-400 $\mu\text{m}$

**Tab.3** Gruppeneinteilung der angestrebten / erwarteten Hornhautrestdicke. Bei Gruppe 1 wurde bis zur Perforation der Kornea gelasert.

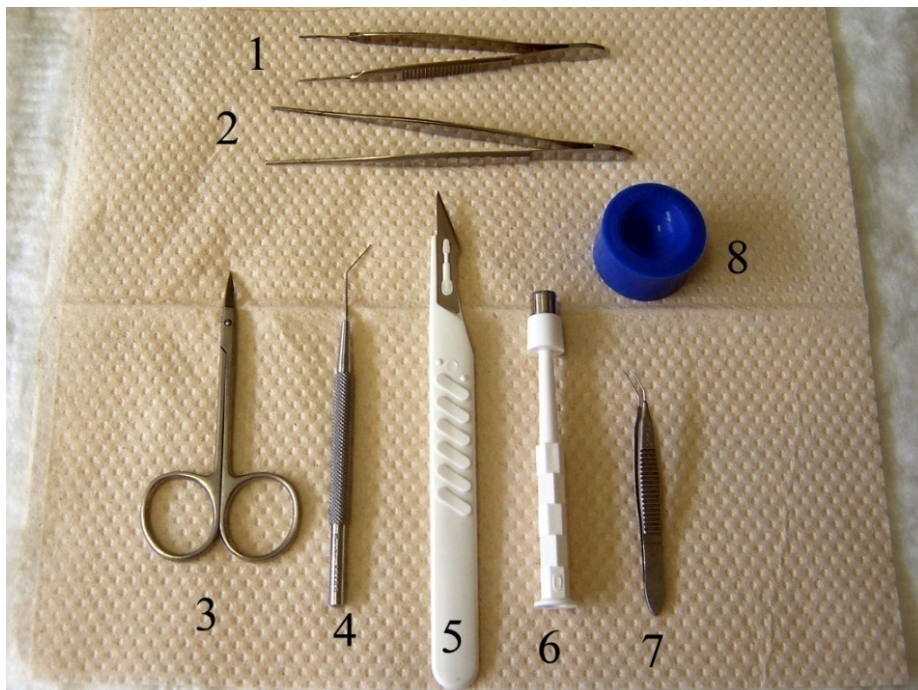
## **2.2 Gewinnung der Spenderbulbi, Excimerlaserablation, Präparation der Korneoskleralscheiben**

Für die Untersuchungen wurden frische Schweinebulbi vom Schlachthof verwendet. Die Bulbi stammten von ca. fünf bis sieben Monate alten Hybridschweinen und wurden unmittelbar nach Enukleation bis zur weiteren Verarbeitung in einem Becherglas in einer Kühlbox bei ca. 4°C aufbewahrt und bis maximal 6 Stunden post enucleationem verwendet. Unmittelbar vor Verwendung wurden sie makroskopisch auf äußere Schäden der Hornhaut untersucht und ggf. entsprechend aussortiert.

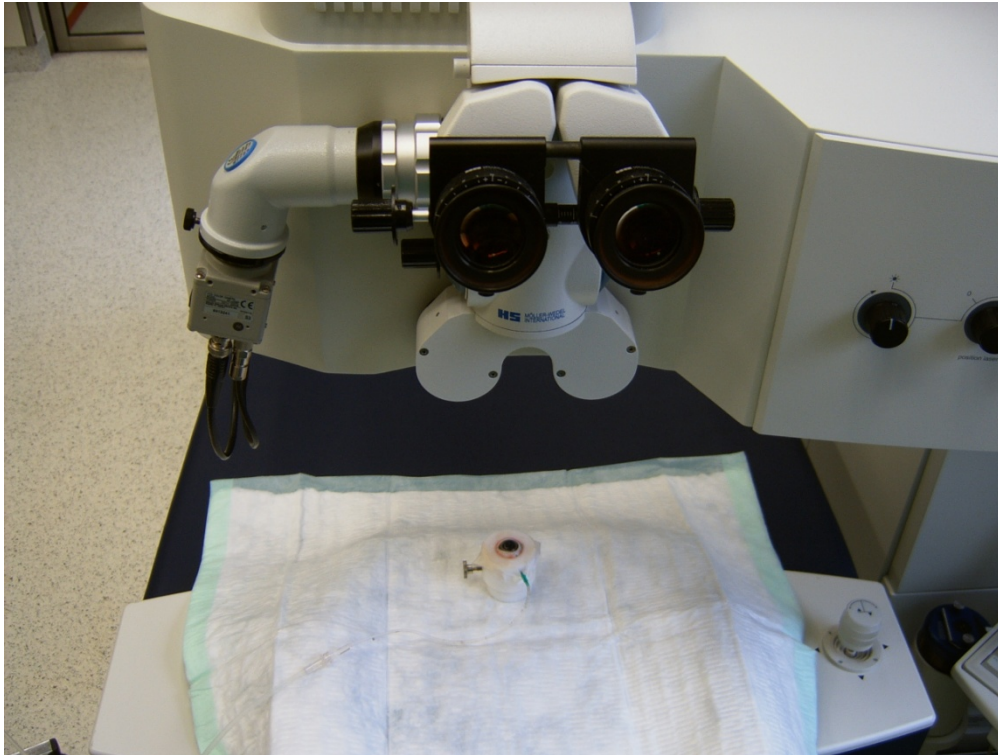
Zur Präparation der Kornea wurde der Bulbus vorsichtig mit Schere und Pinzette von Muskeln, Sehnerv und Lidern befreit, in einen speziell angefertigten Augenthalter (Abb. 11) eingebracht und die Hornhautmitteldicke bei intaktem Epithel pachymetrisch vermessen. Danach erfolgte mit einem Skalpell die Abrasio des Hornhautepithels und die erneute Messung der restlichen Hornhautdicke. Anschließend wurde die Laserablation (s. auch 2.4) durchgeführt. Dazu wurde der Bulbus im Augenthalter zentral unter dem Laser positioniert, der Laserstrahl fokussiert (Abb. 11) und nach erfolgter Abtragung die Resthornhautdicke erneut pachymetrisch vermessen und danach aus dem Augenthalter zur weiteren Präparation gelöst.

Mit Skalpell und Schere wurde ca. 0,5 cm hinter dem Limbus die Sklera inzidiert und eine Korneoskleralscheibe präpariert. Mit Hilfe zweier Pinzetten wurden die Reste des Glaskörpers, die Linse, die Iris und der Ziliarkörper vollständig entfernt. Dies geschah

so vorsichtig wie möglich, um einen präparationsbedingten Schaden, insbesondere am Endothel der Hornhaut, zu vermeiden. Die erhaltene Korneoskleralscheibe wurde mit dem Endothel nach oben auf einen Stanzblock (Silikonblock für Hornhauttransplantate der Firma Geuder Deutschland) gelegt und von endothelseitig mit einem acht mm durchmessenden Einmal-Trepan (Biopsy Punch® der Firma Stiefel Deutschland) eine Spenderlamelle trepaniert. Der erhaltene Lentikel wurde mit dem Endothel nach oben auf einen Objektträger gelegt und mit PBS-Lösung (Phosphate Buffered Saline der Firma PAA Österreich, pH 6,7) vor dem Austrocknen bewahrt. Das verwendete Präparationsbesteck ist in Abbildung 10 dargestellt.



**Abb. 10** Präparationsinstrumente: 1 = feine anatomische Pinzette, 2 = grobe anatomische Pinzette, 3 = Schere, 4 = Hockey-Spatel, 5 = Skalpell, 6 = Trepan , 7 = Kolibripinzette, 8 = Stanzblock



**Abb. 11** Auge in speziell angefertigtem Halter vor Laserapplikation

### **2.3 Pachymetrie**

Zur Dickenmessung der Kornea, sowohl post enucleationem, nach erfolgter Abrasio, als auch nach Laserbehandlung, wurde das OLCR (optical low-coherence reflectometry)-Spaltlampenpachymeter 01-SL der Firma Haag-Streit International gewählt. Dieses Pachymeter weist eine hohe Präzision und Korrelation der Messungen normaler Korneae im Vergleich mit einem Ultraschall-Pachymeter auf [32, 33]. Die Arbeitsgruppe von Gaujoux konnte dies auch für die Pachymetrie nach perforierender Hornhauttransplantation bestätigen [34]. Genth et al. zeigten außerdem, dass man mit dem OLCR-Pachymeter sowohl die Flap-Dicke, als auch die verbliebene Stromadicke der Hornhaut nach einer laserassistierten in situ Keratomilieusis (LASIK) messen kann [35].

Das OLCR-Pachymeter arbeitet mit einer Laserdiode (Laserklasse 1) mit 1300 nm Wellenlänge. Als Messbereich wird von Seiten des Herstellers 50  $\mu\text{m}$  bis 2 mm angegeben. Für ein angezeigtes Messergebnis werden intern zehn Messungen durchgeführt und Mittelwert und Standardabweichung der fünf bestübereinstimmenden Werte wiedergegeben. Die Auflösung beträgt 0,1  $\mu\text{m}$ .

Das Gerät wurde vor jeder Versuchsreihe mittels Prüfstab, dessen Dicke bekannt war, kalibriert. Die Schweinebulbi wurden zur Messung mit einem speziell angefertigten Halter (Abb. 11) vor das Pachymeter gespannt und dessen Lichtstrahl im 90°-Winkel zentral auf die zu untersuchende Hornhaut gerichtet. Es wurden jeweils drei Messungen zentral an der Kornea vorgenommen und deren Mittelwert gebildet.

Zur Feststellung der durchschnittlichen Ausgangsdicke der Hornhaut der Schweinebulbi und der verbliebenen Dicke nach Abrasio des Epithels wurden 90 Schweinebulbi je post enucleationem und post abrasio zweimal vermessen. Aus diesen Werten wurde die durchschnittlich abradierete Dicke des Epithels errechnet. Diese Ergebnisse wurden zur Kontrolle der initialen Gesamthornhaut- und Epitheldicke der für die Laserpräparation genutzten Schweinebulbi verwendet.

Zur Überprüfung der Abtraggenauigkeit des Lasers am Schweinebulbus wurden die Pachymetrieergebnisse 54 gemessener Augen der experimentellen Gruppen zwei bis fünf (Restdicke 50-400 µm) mit den rechnerisch erwarteten Restdicken verglichen.

## **2.4 Excimer – Laser – Ablation**

Zur Laserbehandlung der Hornhaut wurde der Excimer Laser ESIRIS<sup>®</sup> der Firma Schwind Deutschland verwendet. Dieser Laser bestand aus einem Argon-Fluor-Excimer Laser (ArF-Laser) als Arbeitslaser, zwei HeNe-Laser als Positionierlaser und einem Diodenlaser als Fixierhilfe. Die Positionierlaser arbeiteten mit einer Wellenlänge von 633 nm und dienten zur Fokussierung des Ablationsfeldes und Zentrierung auf der Korneaoberfläche. Der ArF-Laser arbeitete als gepulster UV-Hochleistungslaser (Laserklasse 4) bei einer Wellenlänge von 193 nm.

Vor jedem Behandlungstag wurde ein Gaswechsel und zur Überwachung der Laserausgangsenergie ein Fluence-Test durchgeführt. Bei diesem Test wurde die Leistungsdichte (Fluence) überprüft. Dazu wurde eine Gelatine-Folie (Kodak Wratten-Filter, 0,1 mm dick) bis zur Perforation mit Laserpulsen bestrahlt. Die Anzahl der ausgesendeten Pulse korrelierte dabei mit der abgegebenen Leistungsdichte (mJ/cm<sup>2</sup>) des Systems. Der Test ergab im Durchschnitt eine Laserenergie von 8,2 mJ je Puls, bei einer Pulsfrequenz von 30 Hz und einer Ablation pro Puls von 0,548 µm. Diese

Ablationsrate im Fluence-Test steht in einem festen Verhältnis mit der Ablationsrate an der menschlichen Hornhaut.

Vor der Ablation wurde der Laser über der Hornhaut mit dem Positionierlaser zentriert und fokussiert. Danach wurde mit dem Ablationsprogramm „Phototherapeutische Keratektomie“ (PTK) in einer optischen Zone von 8,75 mm Durchmesser die Ablation durchgeführt. Dabei wurde ausgehend vom pachymetrisch ermittelten Wert der Hornhautmittendicke nach Abrasio die gewünschte Restdicke (je nach Gruppenzugehörigkeit zw. 0-400 µm) subtrahiert und somit die Ablationstiefe, für jede Hornhaut individuell, ermittelt und in den Laser eingegeben.

Nach der Ablation erfolgte die Präparation der Korneoskleralscheibe und Trepanation der Hornhautlamelle wie unter 2.2 beschrieben.

## **2.5. Histologie**

Für die histologische Untersuchung wurden die Hornhautlenticel in Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und vier µm dicke Schnitte hergestellt. Nachdem die Schnitte entparaffiniert waren, erfolgte eine HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin). Dazu wurden die Präparate vier mal 15 min in Xylol gebettet und danach in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die erste Färbung mit Hämalaun wurde nach 10 min mit Leitungswasser gespült und danach für 3 min mit Eosin gefärbt. Dies wurde mit Wasser ausgewaschen und in Alkohol differenziert. Danach wurde das Präparat erneut in Xylol für 5 min eingebettet und anschließend auf einem Objektträger eingedeckt [36].

Mittels HE-Färbung werden alle basophilen Zell- und Gewebsstrukturen (z.B. Zellkerne und manche Zytoplasmabestandteile) blau und alle azidophilen Bestandteile (z.B. Zytoplasma und die meisten Interzellulärsubstanzen) in verschiedenen Tonabstufungen rot angefärbt. Diese Färbemethode ermöglicht eine gute Abgrenzbarkeit von Zellkern, Zytoplasma und Zellgrenzen bei der lichtmikroskopischen Untersuchung [37].

Zur Beurteilung der histologischen Schnitte wurde das Photolichtmikroskop Axiophot<sup>®</sup> der Firma Zeiss Deutschland verwendet. Die Präparate wurden bei einer 25-fachen und

400-fachen Vergrößerung beurteilt und mittels angeschlossener Kamera (Nikon Digital Camera DXM 1200<sup>®</sup>) und zugehörigem Softwareprogramm (Nikon ACT-1<sup>®</sup>) digital dokumentiert.

Untersucht wurden vier unbehandelte und je drei Hornhäute der vier definierten Ablationstiefengruppen (Gruppe 2 = 50-100  $\mu\text{m}$ , Gruppe 3 = 100-200  $\mu\text{m}$ , Gruppe 4 = 200-300  $\mu\text{m}$ , Gruppe 5 = 300-400  $\mu\text{m}$ ). Der unter dem Mikroskop beurteilte Sofortschaden und die Perforationsstelle in Gruppe 1 waren zu groß, um brauchbare histologische Präparate anzustellen.

## **2.6 Beurteilung der Endothelvitalität Alizarin-Rot-/Trypan-Blau-Doppelfärbung**

Zur Darstellung des Endothels wurde die Doppelfärbung mit Alizarinrot S und Trypanblau gewählt, die 1977 von Sperling etabliert wurde. Alizarinrot S ist ein Farbstoff der besondere Affinität zu Zellmembranen hat und somit vor allem Zell-Zell-Grenzen darstellt. Alizarinrot reagiert mit zellmembranständigem Calcium (sog. dye-lake reaction). Die Präzipitatbildung erfolgt nur bei einem pH-Optimum zwischen 4,1-4,3, sonst treten nicht zufriedenstellende Färbungen auf [38].

Trypanblau hingegen ist ein Farbstoff der besonders hohe Affinität zum Zellkern aufweist und diesen blau färbt. Der Farbstoff kann aber nur zum Zellkern vordringen und diesen färben, wenn die Zellmembran gestört ist, d.h die Zellen geschädigt sind. Somit lassen sich vitale von avitalen Zellen abgrenzen [39-41]. Bei völligem Verlust der Endothelzellen zeigt sich eine flächenhafte rote Färbung, welche der Descemetischen Lamelle entspricht [39].

Zur Färbung wurden folgende Lösungen in Anlehnung an Sperling verwendet [39]:

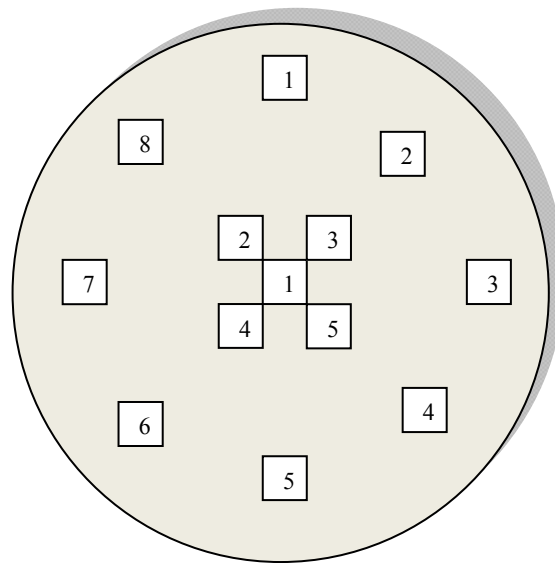
- 0,5 % Trypanblau Fertiglösung der Firma Biochrom AG,
- Alizarinrot S Pulver der Firma Roth, von dem zur Herstellung einer einprozentigen Lösung 0,5 g Alizarinrot S in 50 ml destilliertem Wasser gelöst wurden. In je 10 ml dieser Lösung wurde 1g Saccharose (D(+))Saccharose der Firma Carl Roth) gelöst [40].



Auf die mit dem Endothel nach oben zeigende Hornhautlamelle auf dem Objektträger wurde Trypanblau pipettiert, bis diese vollständig bedeckt war. Nach einer Minute Einwirkzeit wurde das Trypanblau mit PBS-Lösung abgespült und durch Alizarinrot S ersetzt. Nach einer weiteren Minute wurde auch diese Lösung mittels PBS abgespült und das Präparat durch PBS feucht gehalten. Um Manipulationen am Endothel zu vermeiden, wurde auf ein Deckglas zur mikroskopischen Untersuchung verzichtet.

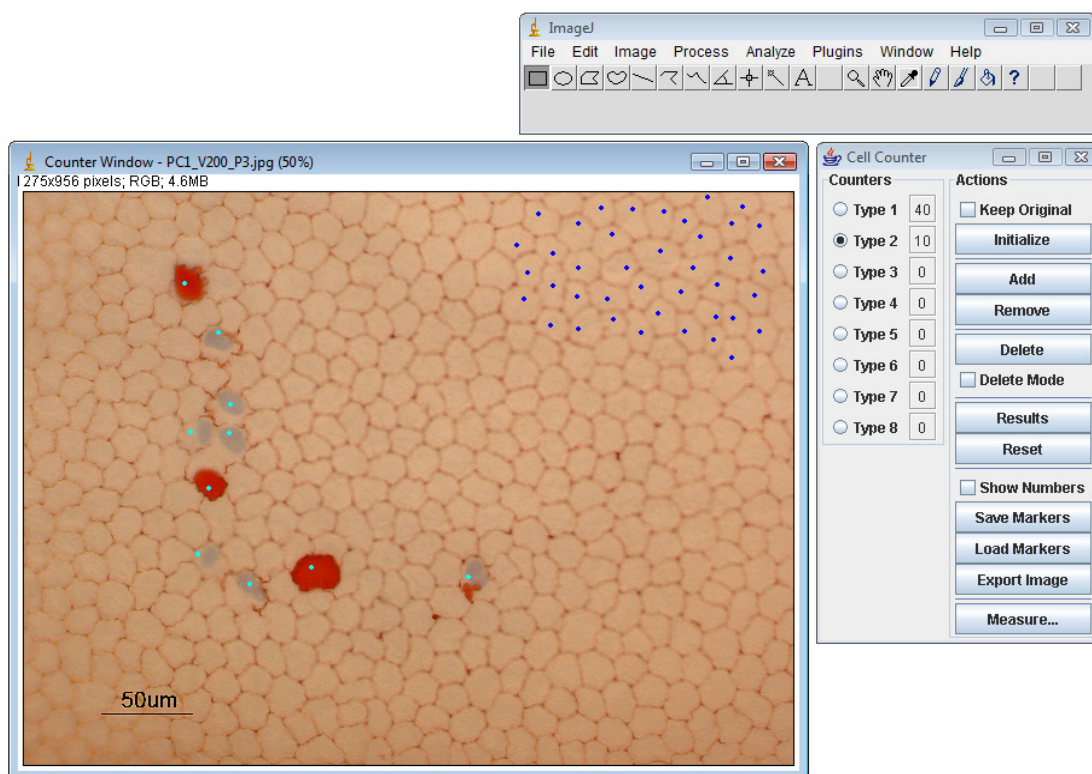
Um die Qualität des Hornhautendothels frisch enukleierter Augen zu bestimmen und einen laserunabhängigen, z.B. durch die Präparation der Korneoskleralscheibe entstandenen Schaden, zu erfassen, wurde eine Kontrollgruppe erstellt. Diese bestand aus zehn frischen Schweinebulbi. An jedem Bulbus wurde zuerst die Hornhautdicke gemessen. Danach wurde die Korneoskleralscheibe und der Lentikel, wie unter 2.1. beschrieben, präpariert. Das Endothel wurde mittels Alizarinrot-Trypanblau Doppelfärbung gefärbt (s. 2.4.3) und unter dem Lichtmikroskop (Photomikroskop Axiophot der Firma Zeiss Germany) bei 200-facher Vergrößerung digital nach dem in Abb. 12 gezeigtem Schema standardisiert mittels Nikon Digital Camera DXM 1200<sup>®</sup> fotografiert.

Jeweils fünf Aufnahmen wurden im Zentrum und acht in der Peripherie des Lentikels gemacht. Die peripheren Bildfelder wurden jeweils eine Bildbreite vom Lentikelrand (entspricht ca. 430  $\mu\text{m}$ ) entfernt erstellt, um den Stanzschaden unmittelbar am Rand nicht mit aufzunehmen, da unabhängig von der verwendeten lamellären Präparationstechnik (Mikrokeratom assistiert, manuell oder mittels Laser ) bei der Operation ein zirkulärer Schnitt mittels Flötentrepan angelegt wird, wie er auch bei dieser Arbeit verwendet wurde.



**Abb. 12** Schematische Darstellung des Hornhautlentikels mit den zentralen und peripheren Bildfeldern zur Aufnahme unter dem Lichtmikroskop.

Die Auswertung der digitalen Bilder erfolgte mit dem Softwareprogramm Image J<sup>®</sup>. Dieses enthält die Funktion „Cell Counter“ mit der Zellen manuell farbig markiert und gezählt werden (Abb. 13). Zunächst wurde bei jeder Aufnahme die Gesamtzellzahl pro Bild ermittelt. Zur Quantifizierung des Schadens wurden dann jeweils die avitalen Zellen pro Bild gezählt und der Schaden in Prozent zur Gesamtzellzahl ermittelt. Es wurde der Gesamt- (alle 13 Bilder), der periphere (acht periphere Aufnahmen) und der zentrale (fünf zentrale Aufnahmen) Schaden errechnet.



**Abb. 13** Programm Image J<sup>®</sup>. Dargestellt ist der „cell counter“ mit dem auf einer digitalen Aufnahme Zellen gezählt werden. Gesunde Zellen sind blau markiert (Type 1), hier 40 Stück und geschädigte Zellen sind grün markiert (Type 2), hier 10 Stück.

Für die Feststellung des entstandenen Schadens nach Laserbehandlung wurden 63 frische Schweinebulbi untersucht. Die Anzahl der untersuchten Augen verteilte sich wie in Tabelle 4 ersichtlich, auf die fünf unterschiedlichen Gruppen.

Gruppe	Restdicke	Anzahl (n) der untersuchten Lentikel
1	Perforation	9
2	50-100 µm	9
3	100-200µm	15
4	200-300µm	15
5	300-400µm	15

**Tab.4** Anzahl der präparierten Lentikel in den fünf anhand der Reststromadicke definierten Gruppen.

Um den unmittelbar nach Laserbehandlung bestehenden Schaden, d.h. eine Nekrose, von einem apoptotischen Spätschaden nach Lasereinwirkung am Endothel abzugrenzen, wurde eine Versuchsreihe mit Inkubation des Lentikels in Kulturmedium durchgeführt.

Hierzu wurden je fünf Hornhautlamellen der Gruppen 3 (Restdicke 100-200  $\mu\text{m}$ ) und 4 (Restdicke 200-300  $\mu\text{m}$ ) für 48 Std. mit dem Endothel nach oben in eine Petrischale (30 mm Durchmesser) und mit Kulturmedium (DMEM Ready Mix<sup>®</sup> PAA Laboratories Österreich) bei 37°C inkubiert. Nach 48 Std. wurden die Hornhautlenticel aus dem Kulturmedium entnommen, auf einen Objektträger gesetzt, das Medium mit PBS-Lösung abgespült und die Endothelzellvitalität wie unter 2.4.1 und 2.4.3 beschrieben untersucht.

Als Kontrollgruppe dienten Trepanate ganzer Hornhautdicke von acht unbehandelten Hornhäuten, die ebenfalls inkubiert wurden. Um eine mikrobielle Kontamination der Präparate und des Inkubators möglichst zu verhindern wurde der Arbeitsplatz und alle verwendeten Instrumente mit Sterillium<sup>®</sup> desinfiziert. Die Bulbi wurden vor der Laserbehandlung in Braunol<sup>®</sup> Povidon-Iod-Lösung 1%ig für 3 min gelegt und danach mit PBS abgespült [42]. Es besteht kein Hinweis, dass Povidon-Iod-Lösung in dieser Konzentration Schäden am Endothel verursacht, wenn das Endothel nicht direkt in Kontakt mit dem Iod tritt [43-45]. Narula et al. konnte zeigen, dass ein in DMEM kultiviertes Endothel weiterhin seine Pumpfunktion aufrechterhält und keinen Schaden nimmt [46, 47].

## **2.7 Rasterelektronenmikroskopie**

Zur Beurteilung der Oberflächenbeschaffenheit des Stromas nach Laserbehandlung wurde die Rasterelektronenmikroskopie gewählt. Es wurden je zwei Hornhäute der Gruppen 3 (Restdicke 100-200  $\mu\text{m}$ ), 4 (Restdicke 200-300  $\mu\text{m}$ ) und 5 (Restdicke 300-400  $\mu\text{m}$ ) untersucht. Gruppe 1 wurde wegen der Perforationsstelle und dem daraus resultierenden schlechten „Handling“ der sehr dünnen Hornhautlamelle nicht untersucht. Die Präparate der Gruppe 2 waren ebenfalls zu dünn, um sie ohne zusätzlichen präparatorischen Schaden zu untersuchen.

Alle Präparate wurden zunächst über Nacht mit 6,25% igem Glutaraldehyd in Sörensen-Puffer (Dinatriumhydrogenphosphat  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (wasserfrei), Kaliumdihydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (wasserfrei) und destilliertes Wasser) gereinigt und anschließend vom Biologischen Institut der Universität Würzburg in einer absteigenden Ethanolreihe entwässert und der Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen. Nach dem Einbringen des Präparates in die Druckkammer wurde diese hierzu mit flüssigem  $\text{CO}_2$  gefüllt und das

Ethanol ausgetauscht. Dies wurde solange wiederholt, bis kein Ethanol mehr in der Kammer enthalten war. Nach restlosem Austausch gegen CO<sub>2</sub> wurde die Kammer zu etwa dreiviertel mit flüssigem CO<sub>2</sub> gefüllt und bis über die kritische Temperatur von 31°C erwärmt. Bei Erreichen eines Druckes von 73,8 bar und einer Temperatur von 31°C geht flüssiges CO<sub>2</sub> ohne Phasengrenze in die Gasform über und die Probe ist trocken. Die getrockneten Präparate wurden auf Probenhalter geklebt und danach in einem Sputter Coater Gerät mit Gold beschichtet.

Die Begutachtung der Präparate erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop DSM 962 der Firma Zeiss Deutschland in drei verschiedenen Vergrößerungen, zwischen 33 bis 42-facher, bei 50-facher und 200-facher Vergrößerung. Die Proben wurden mit dem digitalen System analySIS ADDA II<sup>®</sup> und Softwareprogramm Scandium<sup>®</sup> fotografiert.

## 2.8 Statistische Methoden

Neben der Mittelwertbildung und Bestimmung der Standardabweichung waren für die Auswertung der Daten v.a. der t-Test, der Kruskal-Wallis-Test, der Wilcoxon-Test und der Man-Whitney-U-Test von Bedeutung [48-50]. Die statistische Auswertung erfolgte mit Beratung der studentischen Mitarbeiter des Lehrstuhls für Statistik der Universität Würzburg und mit dem Programm Statistica 7.1<sup>®</sup>.

Um eine statistische Auswertung vornehmen zu können mussten zunächst Hypothesen formuliert werden, die durch statistische Tests überprüft und dementsprechend bestätigt oder abgelehnt werden sollten. Der sog. Nullhypothese H<sub>0</sub>, die davon ausgeht, dass kein Unterschied zwischen zwei Gruppen (x und y) besteht, steht die Alternativhypothese H<sub>1</sub> gegenüber. Die statistische Signifikanz wurde in dieser Arbeit für alle Tests mit  $p < 0,05$  festgelegt.

$$H_0: \mu_x = \mu_y \quad (\mu = \text{Mittelwert})$$

$$H_1: \mu_x \neq \mu_y$$

Der t-Test diente zum Vergleich zwischen den gemessenen und erwarteten Restdicken nach Laserbehandlung. Der Test überprüft die Wahrscheinlichkeit mit der die Stichproben aus einer Gruppe stammen, also den gleichen Mittelwert haben. Die

Nullhypothese lautet also: „Es besteht kein Unterschied bezüglich der gemessenen und erwarteten Restdicke.“

Eine weitere wichtige Nullhypothese lautete: „Das Ausmaß des Sofortschadens weist gesamt, peripher und zentral keinen Unterschied bezüglich der Hornhautrestdicke auf.“ Diese Hypothese wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test überprüft, der untersucht, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben (Gruppen 1-5) hinsichtlich einer Variablen (Schaden) unterscheiden.

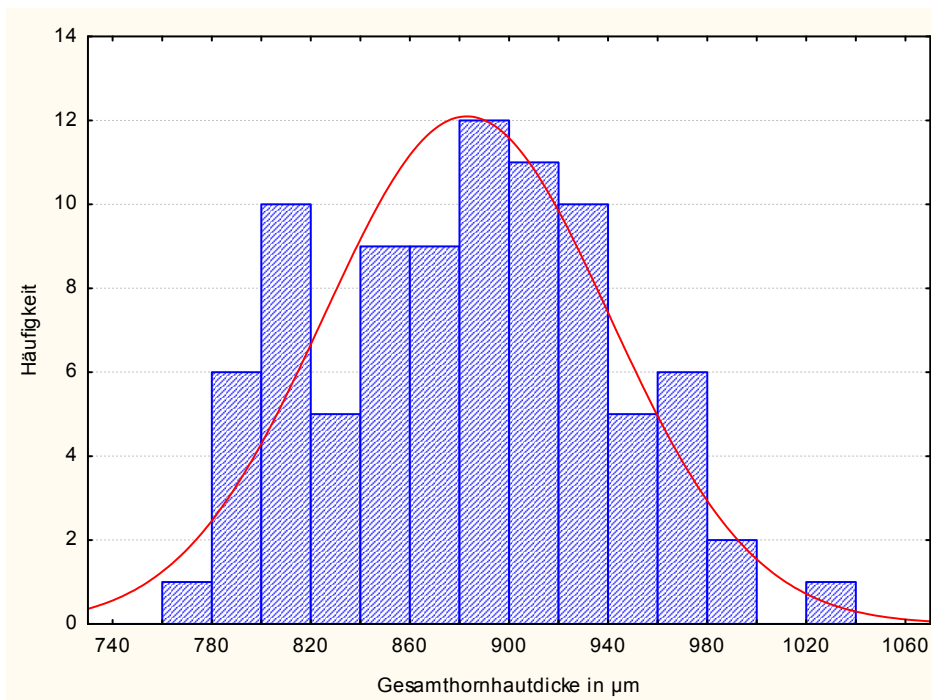
Der Wilcoxon-Test untersucht zwei voneinander abhängige Gruppen auf einen Unterschied bezüglich eines Merkmals. Er wurde verwendet, um die Nullhypothese „Der Sofortschaden nach Laserbehandlung innerhalb einer Gruppe weist peripher und zentral keine relevanten Unterschiede auf“ zu prüfen.

Anhand des Mann-Whitney U-Tests werden zwei unabhängige Stichproben verglichen. Er wurde verwendet um die Nullhypothese „Es besteht kein relevanter Unterschied zwischen dem Sofort- und Spätschaden der Kontrollgruppe verglichen mit der dazugehörigen Lasergruppe“ zu testen.

### 3. Ergebnisse

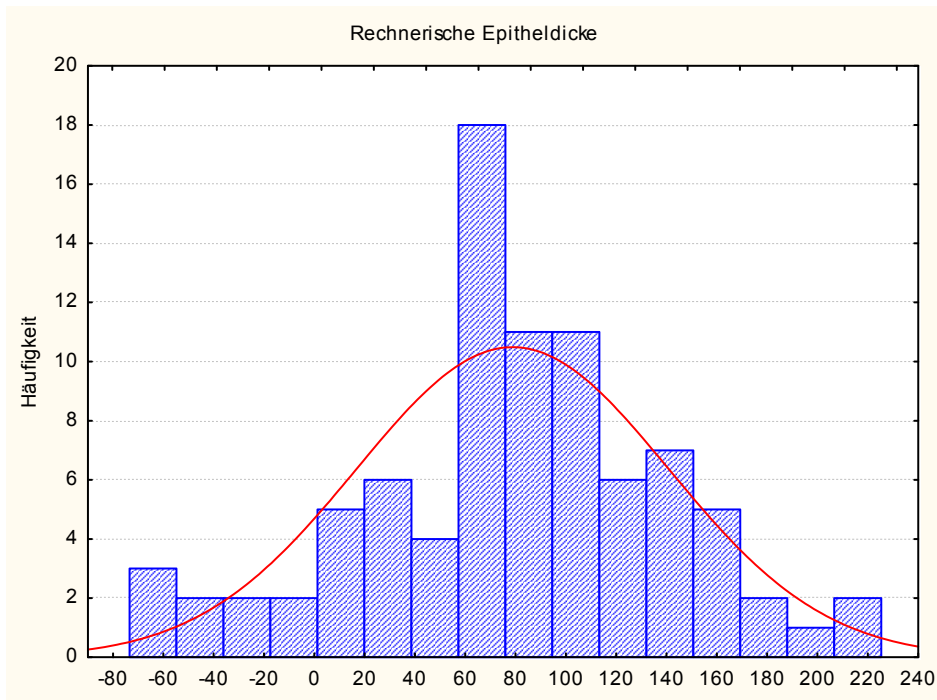
#### 3.1. Pachymetrie

Der Mittelwert der zentralen Hornhautdicke der 90 vermessenen Schweinehornhäute betrug  $882,2 \pm 57,4 \mu\text{m}$ . Die Dicke schwankte über einen Bereich von  $775,4 \mu\text{m}$  bis  $1021,1 \mu\text{m}$ . Die Hornhautdicken waren annähernd normalverteilt. (Abb. 14)



**Abb. 14** Verteilung der Hornhautdicke für 90 vermessene Hornhäute. Aufgetragen ist die Anzahl der Augen in  $20 \mu\text{m}$  breiten Intervallen der Hornhautdicke.

Nach erfolgter Abrasio waren die Hornhäute noch  $804,2 \pm 54,9 \mu\text{m}$  dick, woraus sich eine rechnerische Dicke des Epithels von  $78,0 \pm 61,8 \mu\text{m}$  (Min  $-73,5 \mu\text{m}$ ; Max  $225,4 \mu\text{m}$ ) ergab (Abb. 15).



**Abb. 15** Epitheldicke. Zeigt die Verteilung der durch Abrasio entfernten Epitheldicke von 90 Hornhäuten. Aufgetragen ist die Anzahl in 20 µm breiten Intervallen.

Der im Mittel gemessene Wert für die Restdicke der 54 Präparate der Gruppen 2 bis 5 betrug  $210,5 \pm 97,7 \mu\text{m}$  und unterschied sich nur gering vom erwarteten Wert,  $213,5 \pm 117,7 \mu\text{m}$ . Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,46$ ). Der erwartete Wert ist ein rein rechnerischer Wert, der sich aus der Differenz der ermittelten Dicken des Epithels nach Abrasio und der gewünschten Ablationstiefen ergab. In Tab.5 (s. Tabellenverzeichnis) sind die Durchschnittswerte für die gemessenen und rechnerisch erwarteten Restdicken der einzelnen Gruppen aufgelistet. Für Gruppe 1 (Ablation bis zur Perforation) war eine Pachymetrie nicht sinnvoll möglich.

Der Probenumfang wurde vor Anwendung des t-Tests auf Normalverteilung überprüft. Obwohl, wie im Histogramm (Abb. 16) erkennbar, die Werte nur annähernd normalverteilt waren, konnte wegen des ausreichend großen Stichprobenumfangs der t-Test zur Überprüfung auf Signifikanz der Unterschiede zwischen den Werten, angewendet werden. Der p-Wert für die Signifikanz betrug 0,46, d.h. es gibt keinen relevanten Unterschied zwischen den gemessenen und erwarteten Werten.



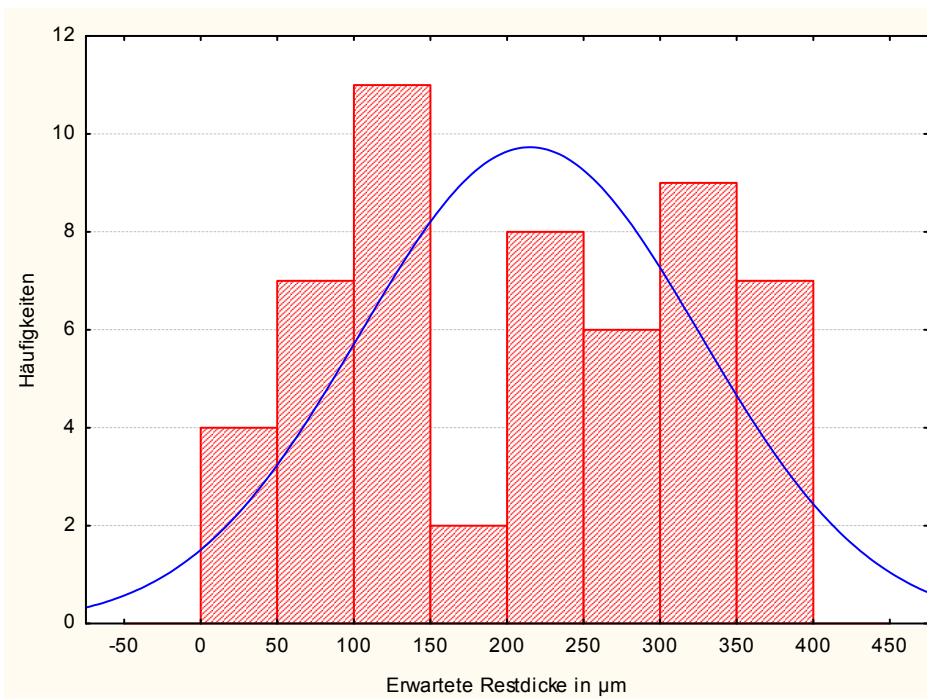
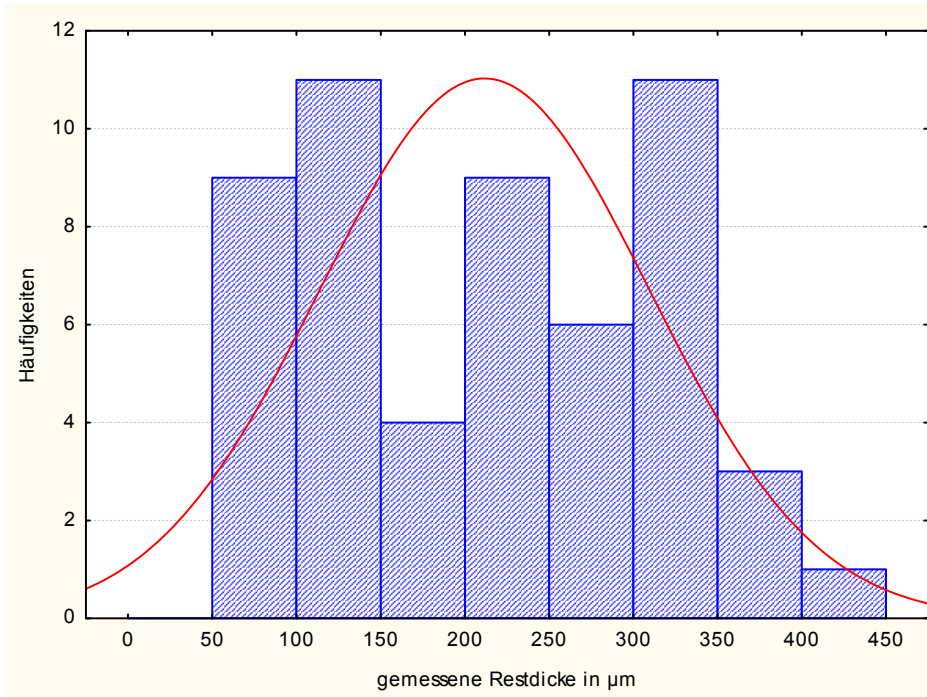
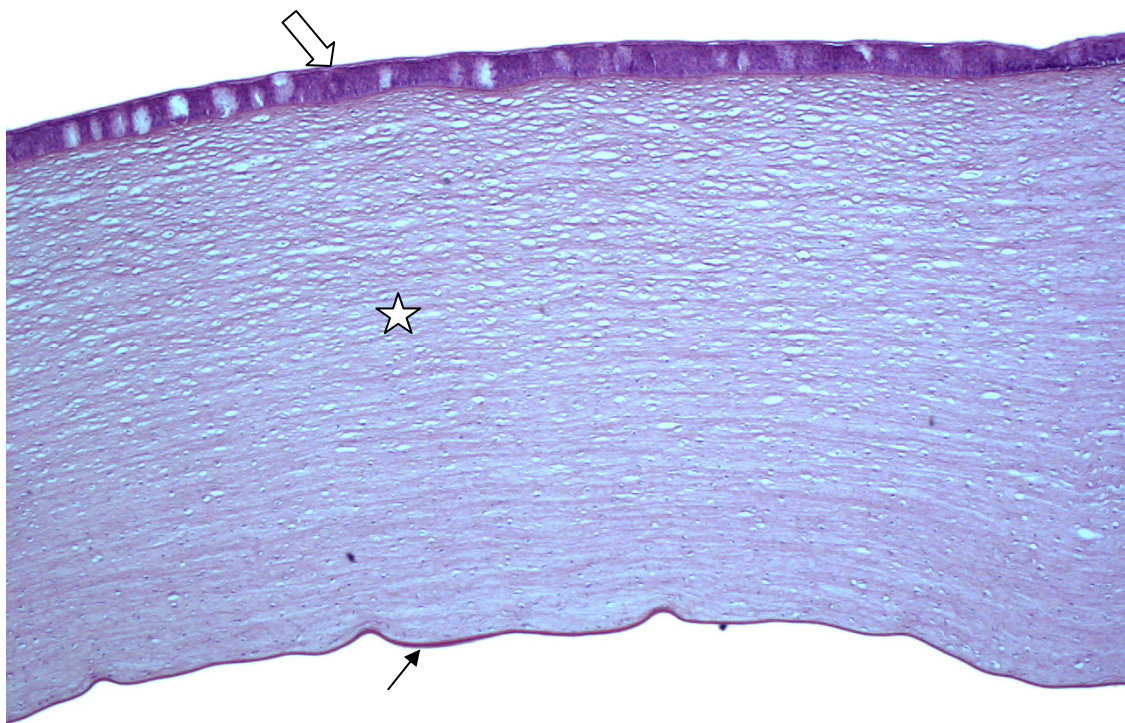


Abb. 16 Verteilung der gemessenen und erwarteten Restdicke [ $\mu\text{m}$ ].

### 3.2 Histologie

Die Hornhäute der unbehandelten Kontrollgruppe zeigten histologisch den typischen fünfschichtigen Aufbau. Dieser lies sich bei 25-facher Vergrößerung darstellen (Abb.17). Die Zellen des Epithels erschienen violett mit einem dunkelblauen Zellkern.

Darunter lag die Bowman-Lamelle, die dunkelrosa erschien, gefolgt vom Stroma. Dies zeigte eine regelmäßige Anordnung der rosa erscheinenden Kollagenfasern. Außerdem waren die Zellkerne der Keratozyten erkennbar. Das Stroma war apikal leicht aufgelockert, basal kompakter aufgebaut. Die Descemet-Lamelle war auch als dunkelrosa Struktur erkennbar. Das Endothel war bei dieser Vergrößerung nur als dünne dunkle Linie erkennbar und bei zwei der vier untersuchten Präparate von der Descemet-Lamelle abgelöst, was als Präparationsartefakt zu bewerten ist. Bei 400-facher Vergrößerung zeigten sich die einzelnen Zellen des Endothels violett angefärbt mit einem dunklen Zellkern. Es fanden sich keine Zeichen von Nekrose oder Apoptose. Insgesamt entsprach dies einem normalen histologischen Befund.



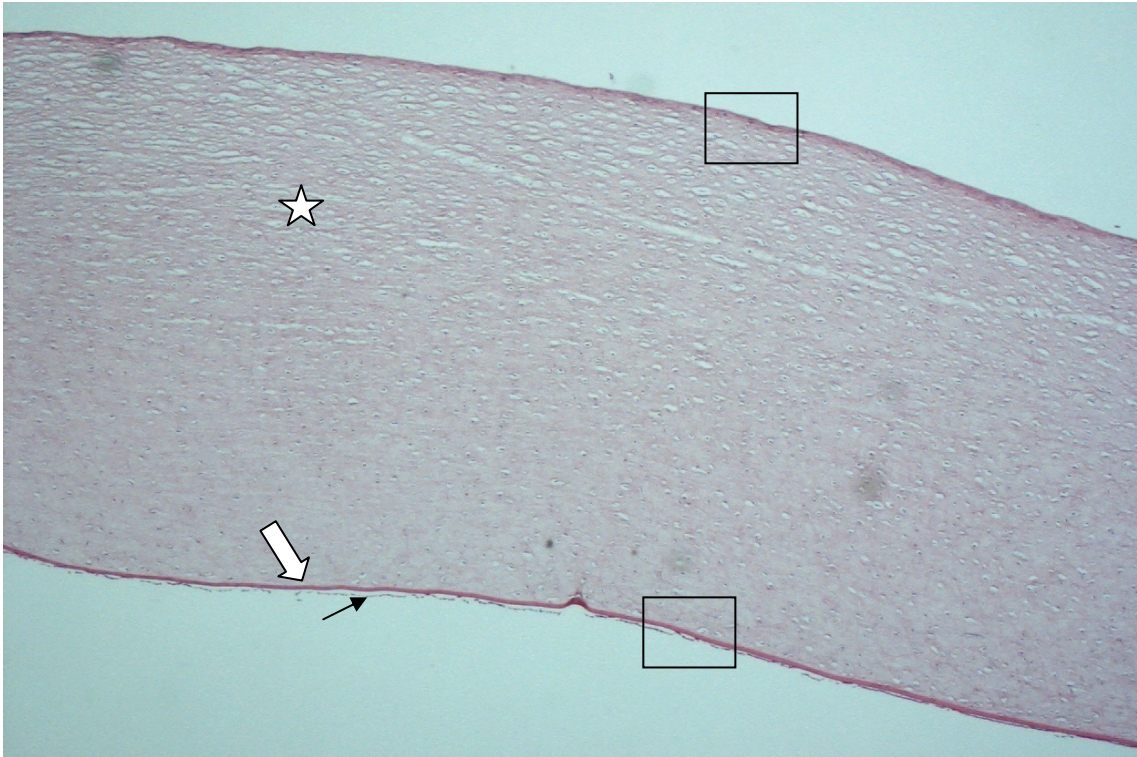
**Abb.17** Histologischer Schnitt einer unbehandelten Kornea in der HE-Färbung bei 25-facher Vergrößerung. Man erkennt das mehrschichtige Plattenepithel mit Bowman-Lamelle (  $\square \Rightarrow$  ), das Stroma (  $\star$  ) und die Descemet-Lamelle (  $\rightarrow$  ). Das Endothel ist nur als Linie unter der Descemet-Lamelle erkennbar. Im Stroma zeigt sich ein leichtes, oberflächliches Ödem.

Die Hornhäute, die vor Fixation einer Laserablation unterzogen worden waren, zeigten nur noch einen dreischichtigen Aufbau (Abb. 18). Das Stroma war wie bei der Kontrollgruppe rosa gefärbt und die Oberfläche glatt und regelmäßig abgetragen. Das

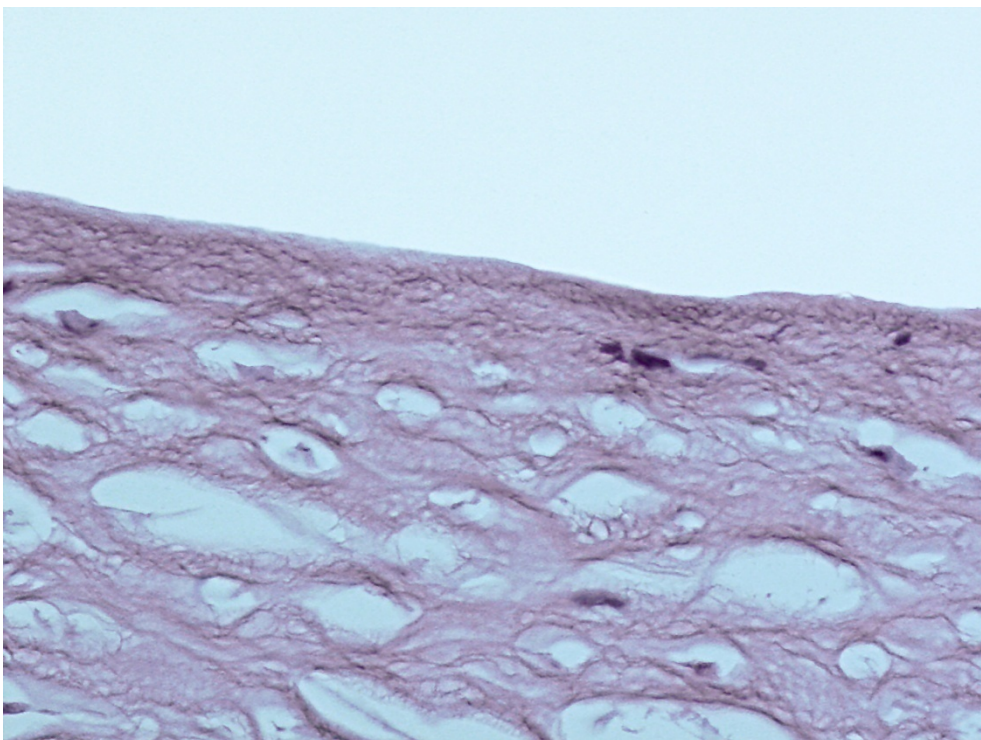
Stroma war oberflächlich ödematös. Es zeigten sich auch bei 400-facher Vergrößerung keine durch den Laserstrahl verursachten Nekrosen oder Apoptosen (Abb. 19). Die darunterliegende Descemet-Lamelle war dunkelrosa und das Endothel bei 400-facher Vergrößerung durch violette Zellen mit dunklem Zellkern abgrenzbar und vereinzelt an umschriebenen Stellen abgelöst (Abb. 20). Die insgesamt 12 Präparate der Gruppen 2 bis 5, mit unterschiedlicher Restdicke, zeigten keine auffälligen Differenzen in der histologischen Darstellung. Der unter dem Mikroskop beurteilte Sofortschaden und die Perforationsstelle in Gruppe 1 waren zu groß, um aus den sehr dünnen Lamellen brauchbare histologische Präparate herzustellen.

Da das Präparat in Abb. 18 nach Laserablation nur 220 µm dick war, es sich aber von der Dicke des Präparates in Abb. 17 (gleiche Vergrößerung) nicht stark unterscheidet, muss von einer Quellung der Präparate durch die histologische Aufbereitung ausgegangen werden.

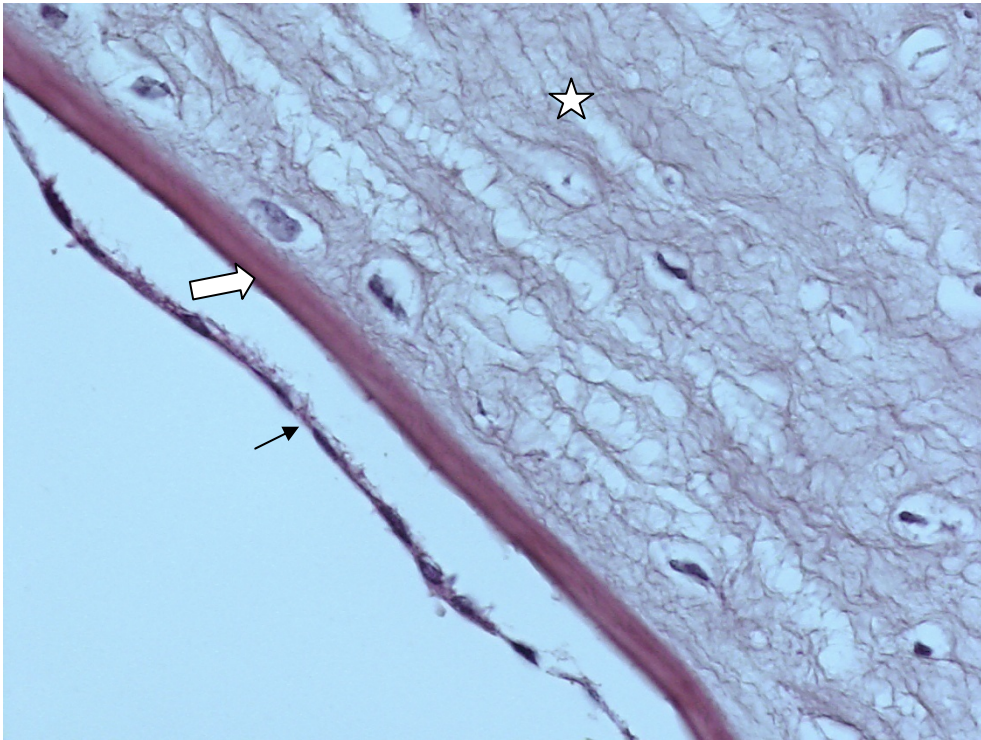
Bei zwei der vier Kontrollgruppenpräparate und bei sieben der zwölf Laserpräparate lies sich eine partielle Ablösung des Endothels feststellen. Auch hier muss die Ursache auf die histologische Aufbereitung zurückgeführt werden, da kein eindeutiger Trend feststellbar war.



**Abb.18** Histologischer Schnitt einer Hornhautlamelle in der HE-Färbung bei 25-facher Vergrößerung. Man erkennt das Stroma (☆) mit leichtem oberflächlichem Ödem, die Descemet-Lamelle (⇨) und das Endothel (→), das teilweise präparationsbedingt abgelöst ist. Die Restdicke des Präparates betrug 220µm, nach histologischer Präparation quoll die Lamelle aber auf. Ausschnitte s. Abb. 19 und 20.



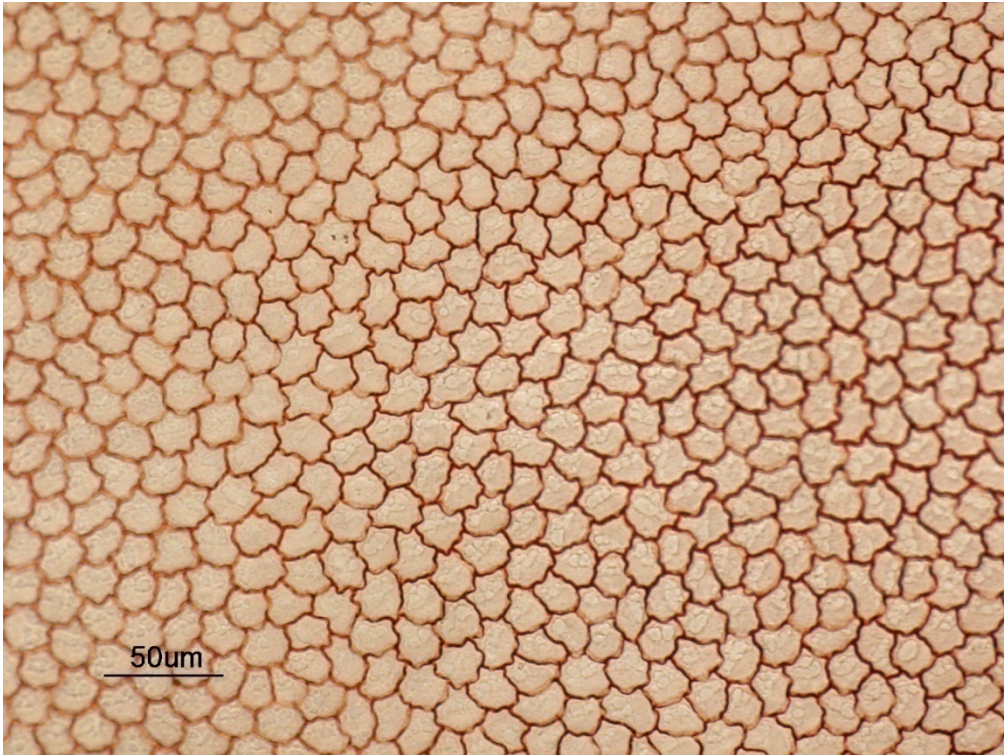
**Abb.19** Ausschnitt aus Abb.16 Dargestellt ist die Stromaoberfläche bei 400-facher Vergrößerung in HE-Färbung nach Laserablation.



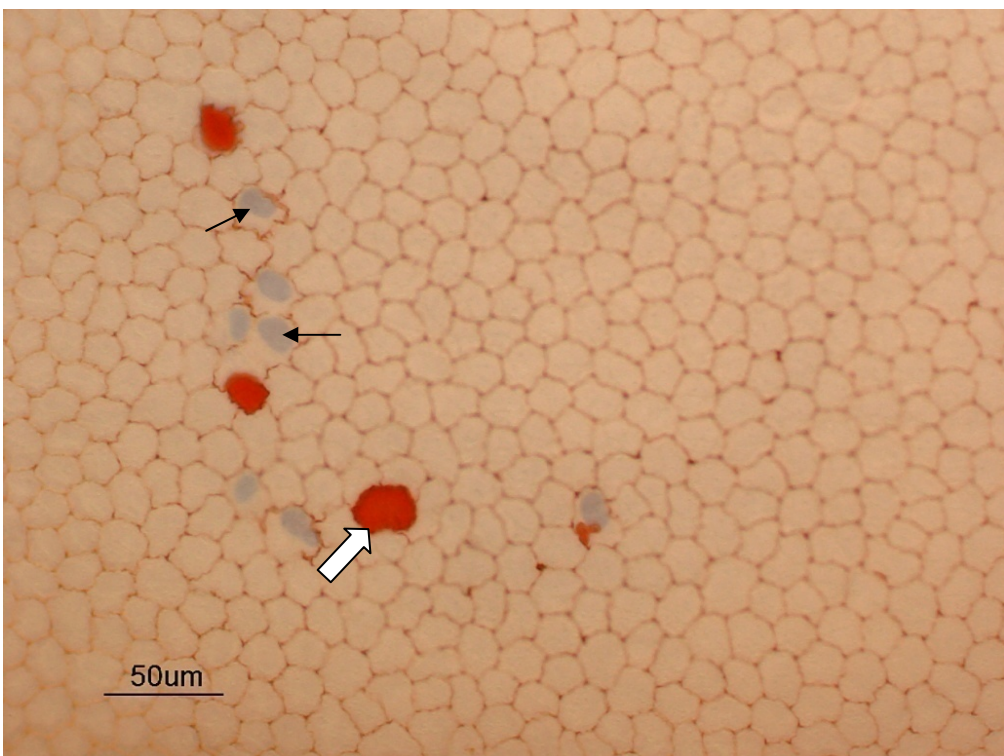
**Abb.20** Ausschnitt aus Abb.16 Dargestellt ist die basale Seite mit Endothel ( → ) bei 400-facher Vergrößerung in HE-Färbung. Das Endothel ist präparationsbedingt von der Descemet-Lamelle ( ⇨ ) gelöst. ☆ = Stroma

### 3.3 Endothelvitalität

Die Endothelfärbung ergab nach standardisierter Durchführung der Präparation und Färbemethode das gewünschte Bild der roten Zellgrenzen und blauen Zellkerne bei Schaden der Zellmembran. Die typische hexagonale Form der Endothelzellen war zu erkennen. Abb. 21 zeigt ein intaktes Endothel der unbehandelten Kontrollgruppe und Abb. 22 ein Endothel mit leichtem Schaden, d.h. blau gefärbten Zellkernen, nach Laserablation.



**Abb. 21** Intaktes Endothel nach Alizarinrot S-Trypanblau-Doppelfärbung bei 200-facher Vergrößerung. Die hexagonalen Zellen sind voneinander gut abgrenzbar.

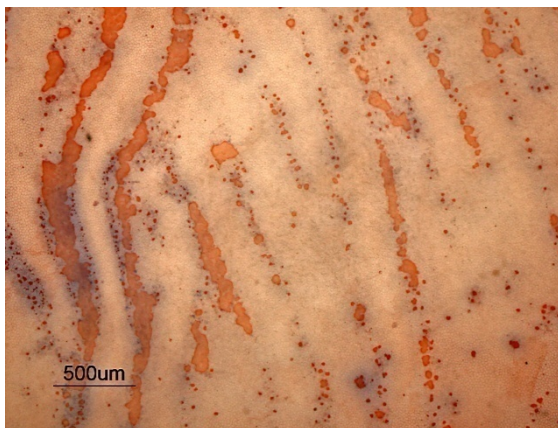


**Abb. 22** zeigt ein leicht geschädigtes Endothel mit Alizarinrot S-Trypanblau-Doppelfärbung nach Laserablation bei 200-facher Vergrößerung (Restdicke 213µm). Durch geschädigte Zellmembranen konnte der blaue Farbstoff eindringen und den Zellkern färben ( →) Die stark roten Flächen entsprechen freiliegender Descemet-Lamelle ( ⇨).

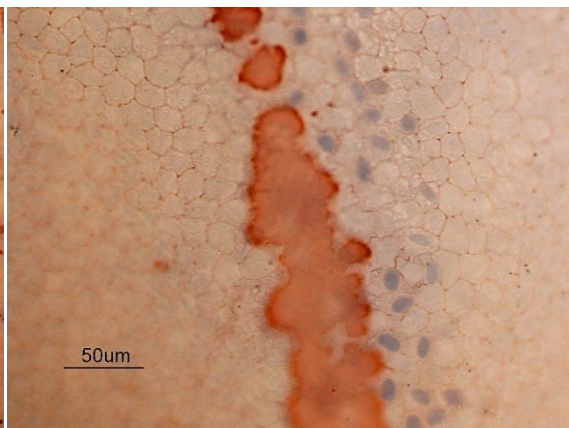
Das Ergebnis der Färbung konnte folgende Artefakte aufweisen, die durch vorsichtige Präparation vermeidbar waren.

**Stretch-Striae:** Diese streifenförmig erscheinenden Schäden am Endothel sind auf zu starken Zug während der Präparation der Lamelle zurückzuführen und wurden als solche sowohl von Grutzmacher [51] als auch von Nartey [52] bezeichnet. Im mikroskopischen Bild (Abb. 23) zeigen sich mehrere Streifen geschädigter, d.h. entweder blau gefärbter Zellreihen oder rot gefärbter freiliegender Descemet-Membran, die alle parallel ausgerichtet sind und der Richtung des Zuges entsprechen. Die Streifen waren unterschiedlich lang und breit (im Mittel sieben bis zehn Zellreihen). Je mehr Zug ausgeübt wurde, desto mehr Artefakte entstanden [51, 52]. Dieses Artefakt lässt sich vermeiden durch Ausschneiden der Korneoskleralscheibe und Ablösen intraokularer Strukturen ohne Zug, indem man mit der Pinzette rundherum nachfasst und abruptes Trennen von Geweben meidet.

**Freiliegender Descemet Membran:** Große, rot gefärbte Areale, die freiliegender Descemet-Membran entsprechen, entstanden durch Berühren des Endothels während der Präparation mit der Pinzette oder der Linse nach Eröffnung der Vorderkammer und Abfließen des Kammerwassers [52] (Abb. 24). Alle Hornhäute bei denen der Verdacht auf eine direkte Berührung des Hornhautendothels bei der Präparation bestand oder bei denen histologisch Stretch Striae vorhanden waren wurden daher verworfen.



**Abb. 23** Stretch-Striae. Entstandener Artefakt bei unvorsichtiger Präparation, charakterisiert durch mehrere Streifen geschädigter Zellen. 25-facher Vergrößerung.

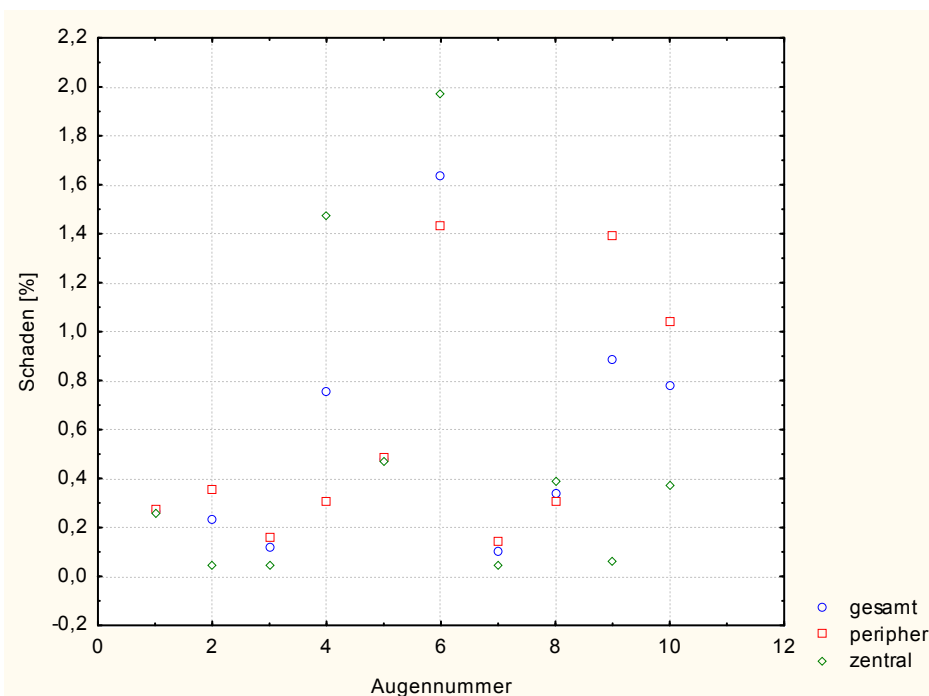


**Abb. 24** Ausschnitt aus Abb. 23 bei 200-facher Vergrößerung. Man erkennt die rote freiliegender Descemet-Lamelle und ca. 4 Zellreihen geschädigter Zellen.

### 3.3.1 Schaden unmittelbar nach Excimer-Laser-Ablation (Nekrose)

Die Ablationstiefe betrug zwischen 400 bis 840  $\mu\text{m}$  und die hierfür erforderliche Behandlungsdauer im Mittel  $1005 \text{ s} \pm 146$  (Min 889 s; Max 1352 s). Die Gesamtzellzahl einer digitalen Aufnahme bei 200-facher Vergrößerung betrug im Mittel  $533 \pm 17$  (Min 503; Max 549) Zellen ( $\cong 3438 \pm 11 \text{ Zellen/mm}^2$ )

Die Auswertung der zehn Präparate der unbehandelten Kontrollgruppe zeigen Tab.6 (s. Tabellenverzeichnis) und Abb. 25. Der Gesamtschaden an unbehandelten Präparaten lag immer unter 2 %. Im Mittel lag der Anteil geschädigter Endothelzellen bei  $90,10 \pm 76$  Zellen pro Präparat ( $\cong 19,25 \text{ Zellen/mm}^2$ ). Der periphere Schaden lag bei  $58,30 \pm 49,28$  Zellen ( $\cong 20,24 \text{ Zellen/mm}^2$ ), zentral bei  $31,80 \pm 41,23$  Zellen ( $\cong 17,66 \text{ Zellen/mm}^2$ ). Das Ausmaß des Schadens peripher und zentral war im Wilcoxon-Test nicht signifikant verschieden ( $p = 0,38$ ).



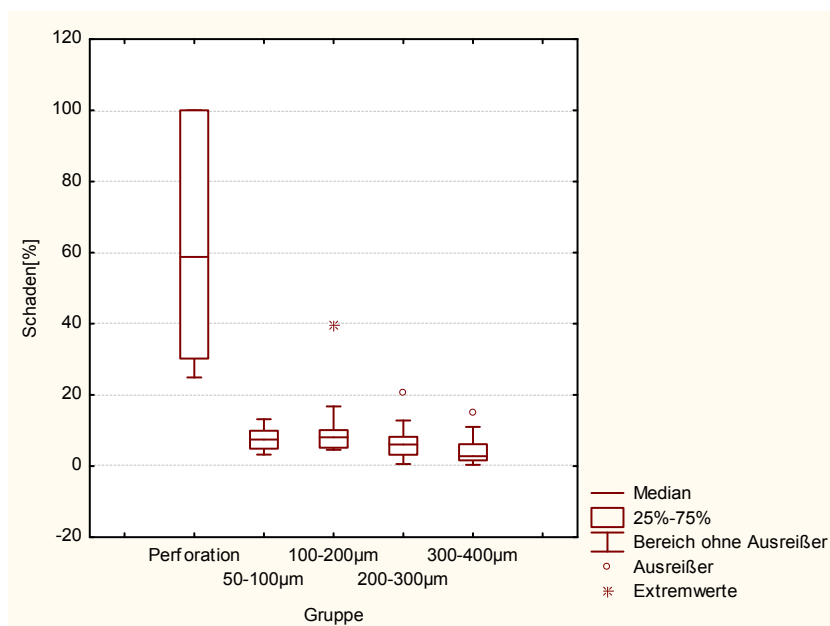
**Abb. 25** Schaden der Kontrollgruppe. Gezeigt ist der Schaden [%] am Endothel in je 13 Aufnahmen (peripher und zentral) von 10 unbehandelten frischen Schweineaugen.



Nach der Laserablation zeigten die fünf Untersuchungsgruppen einen unterschiedlich großen Gesamtschaden auf (Tab. 7 im Tabellenverzeichnis).

Um einen Zusammenhang zwischen den fünf Gruppen bezüglich des Schadens festzustellen wurden sie einem Kruskal-Wallis-Test unterzogen. Der p-Wert war  $<0,05$ , d.h. es lag ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor. Um diesen für die einzelnen Gruppen genauer zu bestimmen wurde der Post-Hoc-Test angewandt. Es zeigte sich, dass der Unterschied zw. Gruppe 1 und den anderen Gruppen signifikant war, da  $p < 0,05$ . Die anderen Gruppen wiesen untereinander keinen signifikanten Unterschied auf (Tab. 8 im Tabellenverzeichnis).

Dies wurde auch ersichtlich, als die Ergebnisse in einem Box-Whisker-Plot dargestellt wurden (Abb. 26). Die Mediane der Gruppen 2 bis 5 lagen alle nah beieinander in einem Bereich unter 10% und wichen nur von Gruppe 1 ab.

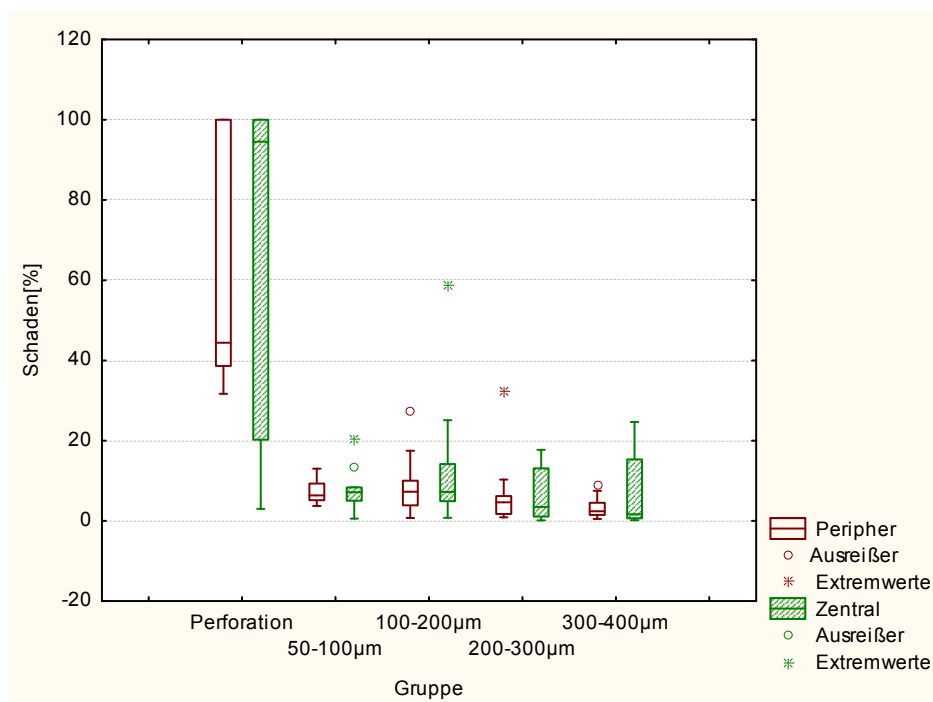


**Abb. 26** Gesamtschaden [%] des Endothels nach erfolgter Laserapplikation der fünf unterteilten Gruppen.

Die fünf Gruppen wiesen nach der Laserbehandlung auch einen unterschiedlich großen peripheren (Tab. 9 im Tabellenverzeichnis) und zentralen (Tab. 10 im Tabellenverzeichnis) Schaden auf. Bei den relativ hohen Maximalwerten der Gruppen 1, 3 und 4 peripher und der Gruppen 1, 3 und 5 zentral kann ein Berührungs- oder Druckschaden während der Präparation nicht ausgeschlossen werden. Der Maximalwert

von 100% in Gruppe 1 zentral ist am ehesten verständlich, da die Perforation des Gewebes meist dort entstand.

Auch für die Analyse des peripheren und zentralen Schadens wurde, um die fünf Gruppen bezüglich des Schadens zu vergleichen, der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Für die peripheren und die zentralen Daten war der p-Wert  $< 0,05$ . Im Post-Hoc-Test zeigte sich für die peripheren Werte, dass der Unterschied zw. Gruppe 1 und den Gruppen 3, 4 und 5 signifikant war. (Tab. 11 im Tabellenverzeichnis) Die anderen Gruppen wiesen untereinander keinen signifikanten Unterschied auf. Für die zentralen Werte ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und den Gruppen 4 und 5 (Tab. 12 im Tabellenverzeichnis). Abb. 27 gibt die Ergebnisse in einem Box-Whisker-Plot wieder.



**Abb.27** Peripherer und zentraler Endothelschaden [%] des Endothels der fünf unterteilten Gruppen.

Zwischen dem Ausmaß des peripheren und des zentralen Schadens innerhalb einer Gruppe fand sich im Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,37$  bis  $0,82$ ).

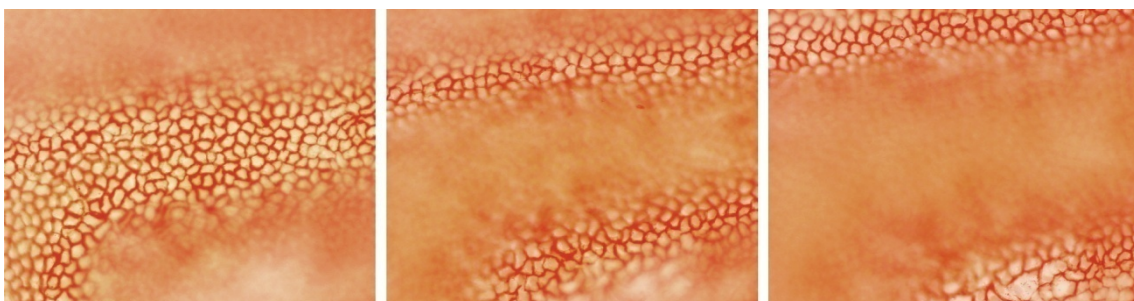
Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde der Gesamtschaden der 10 Kontrollbulbi mit dem Gesamtschaden der jeweiligen Gruppen 2 bis 5 verglichen. Der p-Wert war

<0,05. Die Rangwerte mit denen der Test arbeitete wurden für die Kontrollgruppe mit 69 und für die Lasergruppe mit 2011 angegeben, d.h. es lag ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

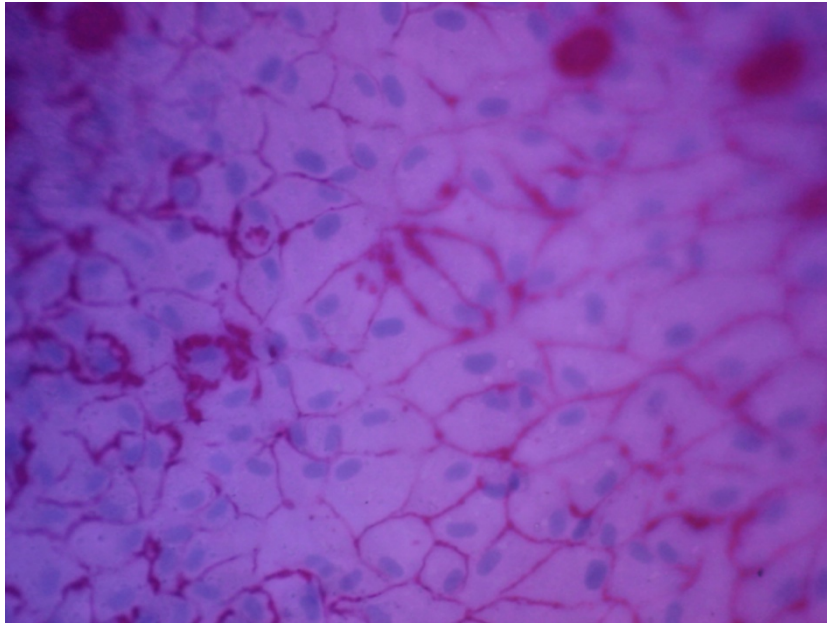
### 3.3.2 Schaden nach 48-stündiger Inkubation (Apoptose)

Die Endothelzellbewertung der für zwei Tage kultivierten Präparate erwies sich als schwierig, da diese während der Inkubationsphase um ein vielfaches aufgequollen waren.

1. Da sich das Bild nicht in einem Bildausschnitt vollständig scharf stellen lies, mussten bei 200-facher Vergrößerung mehrere Aufnahmen einer Stelle gemacht werden. Dies geschah indem ich durchfokussierte und an jeder Stelle eine Aufnahme machte bis der gesamte Bildausschnitt komplett scharf abgebildet worden war. Zur Auswertung wurden dann jeweils die fokussierten Anteile einer Aufnahme ausgewertet und die Zahlenwerte aller Ausschnitte am Schluss addiert. Abb. 28 zeigt hierzu illustrierend eine Reihe von Aufnahmen eines solchen Bildausschnittes mit unterschiedlichem Fokus.
2. Nach Inkubation schien sich die Kern-Plasma-Relation, sowohl der Kontroll- als auch der Lasergruppe, im Vergleich zu nicht inkubierten Präparaten zu Gunsten des Plasmas verschoben zu haben. Die Zellen waren teilweise stark vergrößert und hatten ihre hexagonale Form verloren. Die Gesamtzellzahl pro Bild wich daher stark vom errechneten Mittelwert der nicht inkubierten Präparate der Kontroll- und Lasergruppe ( $533 \pm 17$  Zellen;  $539 \pm 16$  Zellen) ab. (Abb. 29)



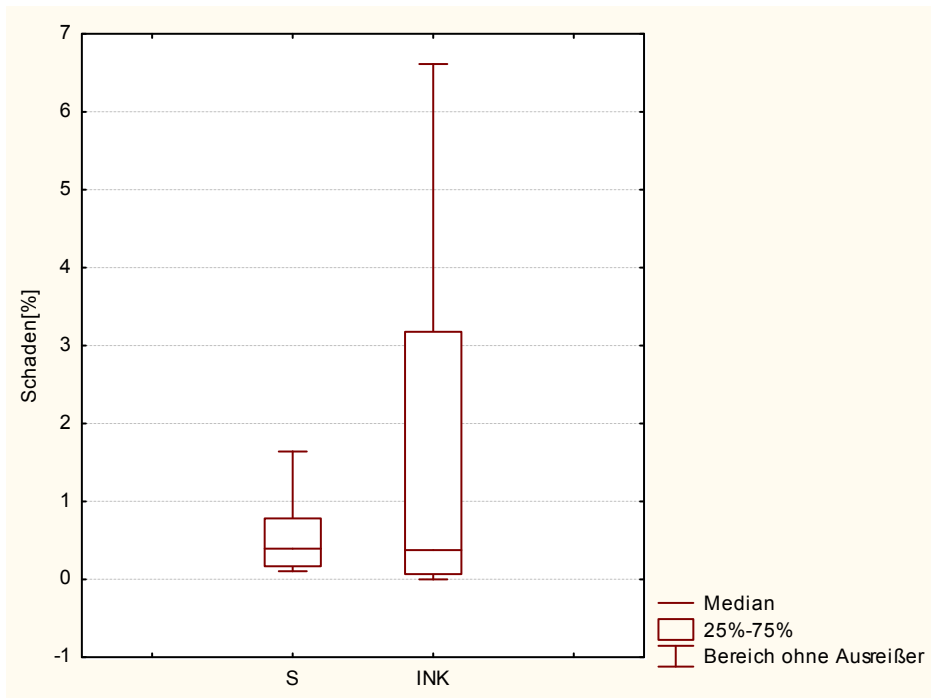
**Abb.28** Aufnahmesequenz bei 200-facher Vergrößerung. An einer Stelle des Präparates wurde solange durchfokussiert und Aufnahmen gemacht, bis das ganze Bild abgedeckt war.



**Abb. 29** Laserpräparat nach Inkubation bei 400-facher Vergrößerung. Die Zellen scheinen gequollen zu sein, mit einem größeren Plasmaanteil und ihre hexagonale Form verloren zu haben.

Der ermittelte Schaden der acht in Kulturmedium gelegenen Präparate der Kontrollgruppe betrug im Mittel  $1,73 \pm 2,68$  % ( $\cong 62,91$  Zellen/  $\text{mm}^2$ ) und schwankte zwischen 0 - 6,61 % ( $\cong 0 - 240,36$  Zellen/  $\text{mm}^2$ ). (Tab. 13 im Tabellenverzeichnis)

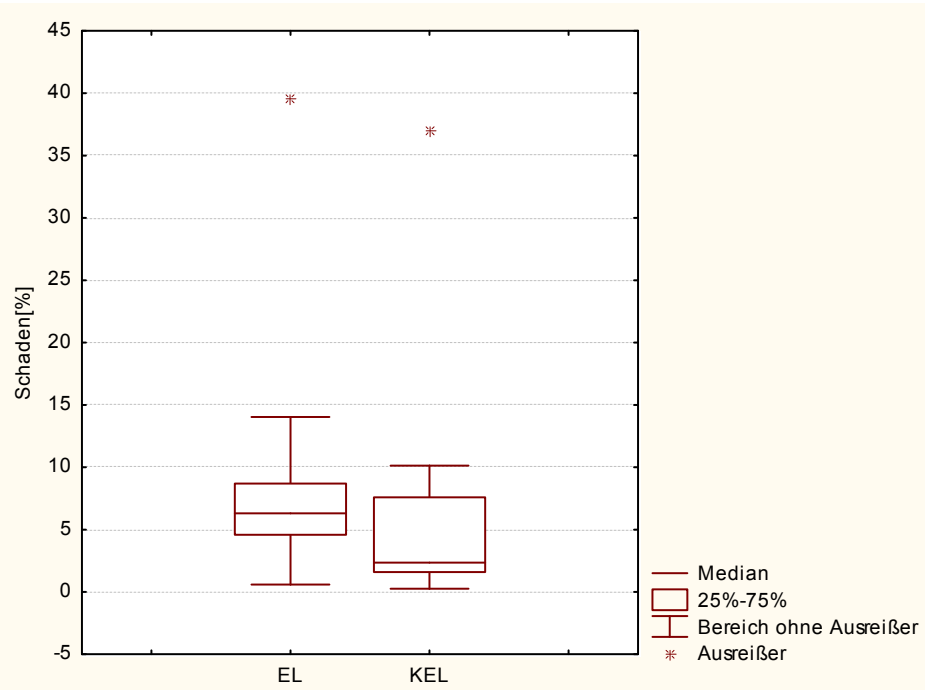
Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich mit  $p = 0,558$  kein signifikanter Unterschied in der Endothelzellzahl frischer und für 48 Std. inkubierter ungelaserter Hornhäute (Kontrollgruppe) (Abb.30).



**Abb. 30** Endothelschaden frischer (S) und für 48 Std. inkubierter (INK) Hornhäute (Kontrollgruppe).

Der Gesamtschaden der lediglich für Gruppe 3 und 4 ausgewerteten je fünf laserbehandelten Präparate betrug im Mittel  $9,6 \pm 11,1$  % ( $\cong 350,18$  Zellen/  $\text{mm}^2$ ) und schwankte zwischen 0,3-36,7 % ( $\cong 10,91 - 1334,54$  Zellen/  $\text{mm}^2$ ). Allerdings war dieser letztgenannte hohe Wert ein Ausreißer, der sich nur einmal finden lies. Die Werte für den peripheren Schaden betragen im Mittel  $12,3 \pm 12,1$  % (Min 0,2 %, Max 41,4 %) ( $\cong$  im im Mittel  $445,45$  Zellen/  $\text{mm}^2$ ) bzw.  $8,6 \pm 9,2$  % (Min 0,3, Max 29,8 %) ( $\cong$  im Mittel  $314,18$  Zellen/  $\text{mm}^2$ ) zentral.

Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich mit  $p = 0,0597$  kein signifikanter Unterschied (jedoch fast signifikant) in der Endothelzellzahl sofort untersuchter Hornhäute und für 48 Std. inkubierter, gelasertes Lentikeln der beiden Gruppen 3 und 4. Jedoch ist der Wert mit  $p=0,0597$  fast signifikant. Es fiel allerdings auf, dass die Medianwerte des Schadens nach Inkubation geringer waren als vor Inkubation (Abb. 31).



**Abb. 31** Endothelschaden von Lentikeln vor und nach 48 stündiger Inkubation. Die Gruppen enthalten ausschließlich die Ergebnisse der Lasergruppen 3 und 4. EL = Lasergruppe, KEL= Lasergruppe mit Inkubation

Der Vergleich zwischen dem Gesamtschaden der unbehandelt inkubierten Hornhäute ( $1,7 \pm 2,7 \% \triangleq 62,91 \text{ Zellen/ mm}^2$ ) mit den inkubierten, laserbehandelten Lentikeln ( $9,6 \pm 11,1 \% \triangleq 350,18 \text{ Zellen/ mm}^2$ ) ergab im Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,0128$ . Der Schaden der laserbehandelten, inkubierten Hornhäute ist signifikant größer als der, der unbehandelt inkubierten Hornhäute.

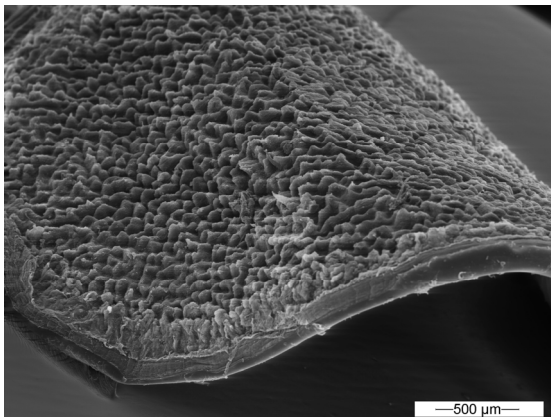
### 3.4 Oberflächenstruktur der Spenderlentikel

Die sechs Hornhautlentikel, die rasterelektronenmikroskopisch untersucht wurden, wiesen nach dem Trockenvorgang für die Herstellung der Präparate eine unterschiedlich starke Wölbung und „Faltung“ der Präparate auf. In Abbildung 32 lässt sich eine solche Wölbung erkennen. Dies beeinträchtigte die Darstellung unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) nur insofern, als nicht alle Bereiche gleich scharf und mit demselben Kontrast fotografiert werden konnten.

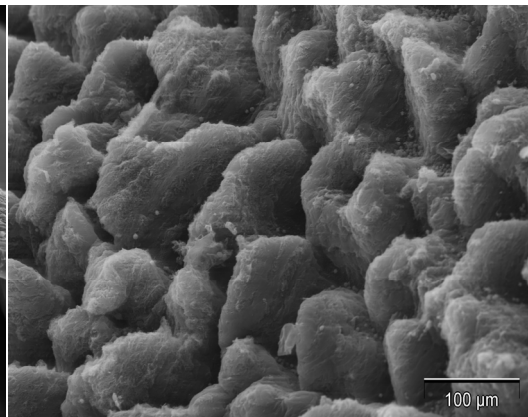
Bei kleinster Vergrößerung ergab sich eine gute Übersicht über die Oberflächenbeschaffung des gesamten Präparates. Wie auf der Aufnahme der Abb. 32 bei 34-facher Vergrößerung zu sehen, war fast das komplette Präparat darzustellen. Die

Beschaffenheit der Oberfläche wies eine homogene, leicht raue Struktur des Stromas vor. Diese bestand aus einer durch regelmäßige Furchen geprägten „Hügellandschaft“. (Abb. 32) Diese waren ca. 60-100  $\mu\text{m}$  breit und ca. 60  $\mu\text{m}$  tief.

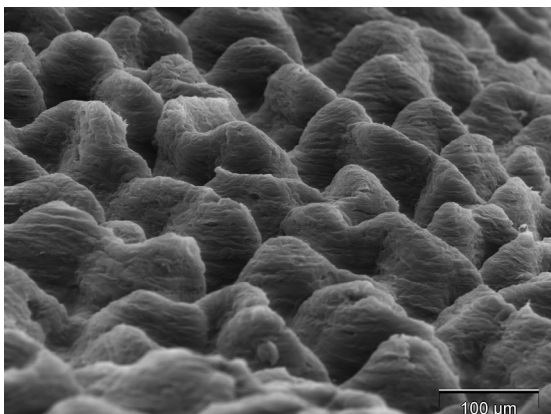
Bei 200-facher Vergrößerung zeigte sich eine „lamellär“ abgestufte Schichtung der Erhabenheit, die scharf und glatt begrenzt war (vgl. Abb. 33-35). Die Beschaffenheit der einzelnen Präparate war gleich. Es lag kein offensichtlicher Unterschied bei verschiedenen Restdicken vor. Es ließ sich keine Veränderung der Oberflächenstruktur zwischen der dünnsten (134,1  $\mu\text{m}$ ) und der dicksten (365,8  $\mu\text{m}$ ) Lamelle nachweisen.



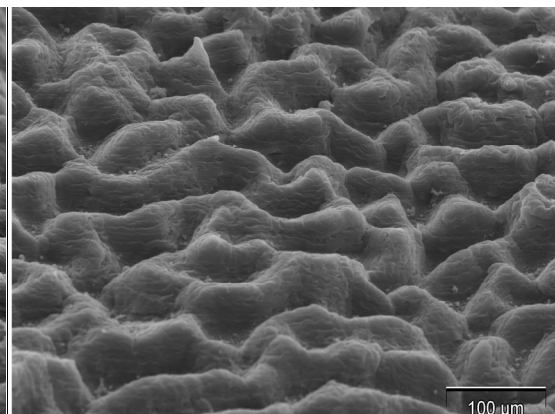
**Abb. 32** REM Übersicht des Stromas des Hornhautlentikels bei 34-facher Vergrößerung. Durch den Trockenvorgang ist das Präparat gewölbt. Restdicke des Präparates 134  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 33** REM Stroma von der Seite bei 200-facher Vergrößerung. Restdicke 134  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 34** REM Stroma von der Seite bei 200-facher Vergrößerung. Restdicke 217  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 35** REM Stroma von der Seite bei 200-facher Vergrößerung. Restdicke 365  $\mu\text{m}$ .

### **3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse:**

Die Hornhautlentikel, die mittels Excimer-Laser-Ablation präpariert worden waren, zeigten im Vergleich zu nichtbehandelten Kontrollhornhäuten keine histologischen Unterschiede. Bei beiden Untersuchungsgruppen war ein oberflächliches Stromaödem zu finden.

Die Beurteilung der Endothelvitalität ergab, dass der Gesamtschaden der gelaserten Lentikel der Restdicken 50 bis 400  $\mu\text{m}$  ( $n = 54$ ) untereinander nicht signifikant unterschiedlich war ( $p > 0,05$ ). Das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ) wurde allerdings erreicht bei bis zur Perforation behandelten Lentikeln, bei denen ein erheblicher Schaden zu finden war.

Der Schaden der Kontrollgruppe war kleiner als der Schaden der Lasergruppe ( $p < 0,05$ ). Bei der Bewertung des zentralen und des peripheren Schadens getrennt, ergaben sich zwischen den fünf Gruppen mit verschiedenen Restdicken keine Unterschiede. Der Schaden war zentral nicht größer als peripher und vice versa. Nur bei Präparation bis zur Perforation (Gruppe 1) kam es peripher und zentral zu einem stärkeren Endothelschaden als bei den anderen Gruppen ( $p < 0,05$ ).

Die Endothelvitalität von laserpräparierten inkubierten und nicht inkubierten Lentikeln bzw. von unbehandelten inkubierten und nicht inkubierten Hornhäuten wies keinen signifikanten Unterschied auf ( $p > 0,05$ ). Es fiel auf, dass der Schaden der inkubierten Lentikel sogar geringer war als der der unmittelbar begutachteten Lentikel. Allerdings ergab sich eine signifikante Differenz im Vergleich der inkubierten Kontrollgruppe mit der inkubierten Lasergruppe. Der Schaden der inkubierten Lasergruppe war signifikant größer.

Die Oberflächenbeschaffenheit des Stromas stellte sich im Rasterelektronenmikroskop relativ rau dar. Diese Struktur war jedoch unabhängig von der Tiefe der Laserablation.



## **4. Diskussion**

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden mit Ergebnissen aus anderen wissenschaftlichen Arbeiten verglichen und diskutiert. Bisher wurden Transplantate für eine posteriore lamelläre Keratoplastik v.a. manuell oder mittels Mikrokeratom hergestellt. Die Laser-Präparation könnte eine weitere, ggf. schonendere Möglichkeit darstellen, Präparate für eine posteriore lamelläre Keratoplastik individualisiert für den jeweiligen Patienten herzustellen.

### **4.1 Pachymetrie**

Die per OLCR-Pachymeter zentral gemessenen Hornhautdicken der Schweinebulbi von  $882 \pm 57 \mu\text{m}$  entsprachen ungefähr den von Tüngler gemessenen Werten mit  $844 \pm 21 \mu\text{m}$  [40]. Tüngler verwendete ein Ultraschallpachymeter für die Messungen, welches ein Grund für die leicht abweichenden Ergebnisse sein könnte.

Die Dicke des Epithels war mit  $78 \pm 61 \mu\text{m}$  etwas größer als die von Kohlhaas et al. gemessene, die im Mittel  $68,9 \mu\text{m}$  betrug [53]. Die Epitheldicke sollte aber keinen Einfluss auf die Restdicke der Laserablation gehabt haben, da das Epithel abradert wurde, die Hornhautrestdicke nach Abrasio erneut gemessen und nur dieser Wert für die Ablation berücksichtigt wurde. Die in der Literatur gefundenen Werte für die menschliche Hornhautepitheldicke von  $50 \mu\text{m}$  weichen von denen der Schweinebulbi ab, sollten aber für eine eventuelle klinische Anwendung der Methodik keine Rolle spielen, da auch dann eine Abrasio durchgeführt würde, um den operativen Aufwand zu minimieren und mögliche epitheliale Störfaktoren zu eliminieren [3, 4].

Bei einigen Augen wurden für die abraderte Dicke negative Werte gemessen (vgl. Abb. 14). Dies würde nahelegen, dass das Hornhautstroma im Zeitraum der Abrasio akut, z.B. ödembedingt, an Dicke zunahm oder eine methodische Ungenauigkeit bei der Pachymetrie vorlag. Böhnke und Mitarbeiter untersuchten die Dicke von unbefeuchteten Schweinehornhäuten kontinuierlich gemessen über den Zeitraum von einer Stunde bei intaktem Epithel, nach Abrasio und nach  $90 \mu\text{m}$  Excimer-Laser Keratektomien. Sie stellten eine Verdünnung der Hornhaut bei allen Methoden fest. [54]. Da eine Stromadickenzunahme im kurzen Zeitraum der Abrasio von höchstens fünf Minuten nicht zu erwarten ist, muss bei den hier vorliegenden negativen Werten

von Messfehlern ausgegangen werden. Diese Auffälligkeit sollte aber, wie oben schon erwähnt, keinen Einfluss auf die Restdicke nach der Laserablation gehabt haben, da die Hornhautdicke vor der Laserablation und sofort nach Beendigung der Behandlung erneut gemessen wurden.

Die Restdicke des Hornhautlenticels nach Laserablation entsprach rechnerisch dem erwarteten Wert. Der Einsatz des OLCR-Pachymeters ist also eine zuverlässige, genaue Methode zur Messung von Hornhautdicken und die Ergebnisse vorausgegangener Studien wurden bestätigt [32-34]. Weitere Vorteile gegenüber einem Ultraschall-Pachymeter sind außerdem, dass die Messungen ohne direkten Kontakt zur Kornea erfolgen und zweitens keine gehaltene Messsonde die Genauigkeit der Ergebnisse beeinflusst [34, 55]. Eine Manipulation an der Hornhaut und deren mögliche Folgen sind somit für die Ergebnisse auszuschließen.

## **4.2 Histologie**

Im histologischen Bild ergaben sich keine Differenzen zwischen dem Restgewebe nach Excimer-Laser Ablation und den entsprechenden Gewebsschnitten unbehandelter Kontrollgewebe. Bei beiden war ein leichtes Stromaödem an der Oberfläche bzw. dem oberflächlichen Reststroma zu finden.

Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien. Koch et al. stellten in einer Studie zur kornealen Wundheilung an Kaninchenaugen nach Excimer-Laser-Ablation fest, dass die histologischen Charakteristika einer nicht perforierenden Keratektomie ein bis sechs Std. postoperativ, gerade, glatte und annähernd parallel verlaufende Schnittkanten sind [56].

Taylor fand histologisch beim Menschen sowohl eine normale Descemet-Lamelle als auch ein normales Endothel nach lamellären Keratektomien mittels Laser mit einem Durchmesser zwischen 3 und 5,2 mm bis zu 113  $\mu\text{m}$  Restdicke [26].

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen erstmals die Möglichkeit mit dem Laser saubere, kontrollierte Ablationen bis 8,75 mm Durchmesser ohne in der Histologie nachweisbaren Schaden durchzuführen, so dass aus diesen 8 mm große lamelläre

Transplantate für eine posteriore lamelläre Keratoplastik trepaniert werden können. Selbst bei einer Restdicke unter 100 µm blieben dabei histologische Schäden aus.

### **4.3 Endothelvitalität**

#### **4.3.1 Schaden unmittelbar nach Excimer-Laser-Ablation (Nekrose)**

Die Beurteilung der Endothelvitalität ergab, dass der Gesamtschaden der gelaserten Lentikel der Restdicken 50 bis 400µm (n=54) nicht signifikant untereinander verschieden war und im Mittel bei 7,1% lag. Erst bei einer Perforation der Spenderlamelle stieg dieser Wert auf über 60% an.

Koch et al. kamen bei Verwendung des Excimer-Lasers zur Durchführung von Hornhautinzisionen - also nicht flächigen Ablationen – zu ähnlichen Ergebnissen. An Kaninchenaugen mit einer Schnitttiefe von 70-80% waren keine Endothelalterationen zu finden. Bei einer Schnitttiefe von 90% fanden sich verstreute Endothelschäden in Form von Einzelzellverlusten oder Verbreiterung der Interzellularräume. Der Schaden vergrößerte sich und zeigte, wie auch bei den vorliegenden Untersuchungen großflächige Verluste bei perforierenden Keratektomien [56].

Marshall et al. zeigten in früheren Studien an Kaninchenaugen, dass am Endothel nur ein Schaden entsteht, wenn die Ablation näher als 40 µm zur Descemet-Lamelle erfolgt [57, 58]. Allerdings hatten sie eine zu kleine Untersuchungsgruppe, um eine genaue Grenze festlegen zu können.

Diskrepanzen bezüglich des Gesamtschadens ( $p < 0,05$ ) wurden auch zwischen der Kontrollgruppe und der Lasergruppe beobachtet, d.h. der Schaden der laserbehandelten Hornhäute war größer.

Diese Ergebnisse stehen in Kontrast mit denen von Frueh et al., die in einer Studie die Endothelzellmorphologie nach 200 und 400µm tiefen und perforierten Keratektomien ebenfalls mit einer Doppelfärbung untersuchten. Sie fanden keine signifikante Differenz bezüglich des Schadens zwischen Kontrollbulbi und den tiefen Keratektomien. Die Perforationen variierten stark in ihrem Ausmaß und verursachten in jeder untersuchten Hornhaut Endothelzellverluste [59]. In dieser Arbeit erfolgten jedoch sehr viel

größflächigere Gewebsabtragungen. Im Fall einer Perforation sind daher auch sehr viel größere Schäden an Descemet-Lamelle und Endothel zu erwarten.

Aus den hier genannten und oben beschriebenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Schaden nach Laserablation zwar größer ist als bei Kontrollbulbi, aber nicht von der Ablationstiefe abhängt. Der Schaden innerhalb der verschiedenen Gruppen (2 bis 5) beläuft sich immer auf unter 10%, so dass nicht mehr Schaden bei tieferen Ablationen und somit Nähe zum Endothel entsteht. Bei großflächigen Ablationen an Schweineaugen stellten Zabel et al. allerdings einen Zusammenhang zwischen der Ablationstiefe und dem entstehenden Schaden her. Initial beschrieben sie Zelljunctionslösungen, danach kam es zu Zellentleerung und anschließend zum Ablösen von Zellen [60]. Dies kann aus der vorgelegten Untersuchung nicht bestätigt werden, da kein Zusammenhang mit der Ablationstiefe festgestellt wurde.

Der trotzdem signifikante Schaden im Vergleich zur Kontrollgruppe entstand eventuell durch Manipulationen während der Präparation der Hornhautlenticel, welche nach Laserablation um ein Vielfaches dünner und flexibler waren.

Während des Photoablationsprozesses am Hornhautgewebe trifft ein Laserpuls auf und schon währenddessen wird das Gewebe in den gasförmigen oder Plasmazustand überführt und entweicht als Gas von der bestrahlten Oberfläche. Theoretisch wären zwei Nebenwirkungen möglich: thermische Effekte und mechanische Nebenwirkungen.

Thermische Effekte entstehen prinzipiell durch Wärmeleitung und unterschwellige Bestrahlung mit Laserlicht während des Ablationsprozesses. Allerdings ist die Wärmeleitung im Hornhautgewebe relativ langsam ( $1\mu\text{m}/ >5\mu\text{s}$ ). Das Gas ist bereits nach ein bis zwei  $\mu\text{s}$  entwichen, so dass ein Großteil der entstehenden thermischen Energie in die Luft abtransportiert wird, bevor das umliegende Gewebe erreicht wird. Da die Schäden durch direkte Aufwärmung des Gewebes unter der Ablationszone nicht akkumulieren, sondern vom nächsten Laserimpuls abladiert werden, spielt auch die unterschwellige Bestrahlung keine wesentliche Rolle [25, 61]. Während der Photoablation kommt es zu einem stromalen Temperaturanstieg von drei bis vier  $^{\circ}\text{C}$ , der allerdings so gering ist, dass keine thermische Denaturierung des Gewebes entsteht, die in der Hornhaut bei Temperaturen über  $50^{\circ}\text{C}$  einsetzt [25].

Zu den möglichen mechanischen Nebenwirkungen der großflächigen Excimer-Laser-Ablation zählen akustische Schockwellen und resonanz-induzierte Effekte [62].

Durch den Photoablationsprozess entstehen Rückstoßkräfte, die zu Stresswellen führen und durch das Auge geleitet werden. Durch entstehende Druckamplituden ist eine Schädigung des Endothels vorstellbar und wurde in Form von ödematöser Schwellung nachgewiesen [25].

Özler et al. fanden heraus dass bei Frequenzen  $> 20$  Hz der Schaden am Endothel und der Descemet-Lamelle des Kaninchens auf Grund von Schockwellen oder Sekundärstrahlung deutlich anstieg. Bei Energiedichten pro Impuls unter  $100\text{mJ}/\text{cm}^2$  zeigte sich nur eine geringe oder keine Gewebsablation. [62].

Des Weiteren wurde an Kaninchenaugen gezeigt, dass nach einer PRK die Konzentrationen von Wasserstoffperoxid und oxidiertem Glutathion in der Vorderkammer steigt, während die der Ascorbinsäure in Proportion zum abgestrahlten ultravioletten Licht sinkt. Diese Veränderungen stellen eine mögliche Ursache für den endothelialen Schaden dar [63].

Kim und Arbeitsgruppe untersuchten den Effekt des Excimer-Lasers auf die Permeabilität des Endothels an Kaninchenaugen. Sie fanden drei Tage nach der Behandlung bei Restdicken von  $175\ \mu\text{m}$  und  $150\ \mu\text{m}$  eine beeinträchtigte Barrierefunktion des Endothels. Bei  $200\ \mu\text{m}$  Restdicke war die Permeabilität noch unverändert [64].

Hoch energetisches UV-Licht kann Mutationen in der DNA verursachen. Eine direkte Zytotoxizität für Strahlung bei  $193\text{nm}$  wurde jedoch bislang nicht nachgewiesen, da die Eindringtiefe des Laserstrahls mit einem  $\mu\text{m}$  zu gering ist um bis zum Zellkern vorzudringen. Der mögliche Schaden durch Sekundärstrahlung liegt zudem unter der Kapazitätsgrenze der Reparaturenzyme. Diese besitzen die Fähigkeit mehr Schaden zu reparieren, als hier anfällt, so dass dieser sofort beseitigt wird. [25].

Bei der Begutachtung des zentralen und des peripheren Schadens ergaben sich innerhalb der fünf Gruppen mit verschiedenen Restdicken keine relevanten Parallelen bzgl. des entstandenen Schadens. Somit ist die obige Vermutung, dass der unterschiedliche Dickenverlauf einen Einfluss auf den Schaden haben könnte, widerlegt. Denn es wurde

nicht festgestellt, dass peripher ein größerer Defekt entsteht als zentral, obwohl die Lamelle dort dünner sein müsste.

Lambert et al. wiesen ebenfalls keine Signifikanz zwischen peripherer und zentraler Endothelzellichte nach Excimer-Laser Ablationen mit einer Restdicke von 150µm nach [65].

Allerdings war der periphere Schaden der perforierten Gruppe im Vergleich mit den Gruppen 3, 4 und 5 und der zentrale Schaden mit den Gruppen 4 und 5 signifikant ( $p < 0,05$ ).

Diese Ergebnisse waren aber fraglich, da sie aus der Darstellung in einem Box-Whisker-Plot nicht ersichtlich wurden. (Abb. 27) Hier zeigte sich eine relativ konstante Verteilung der Mediane der Gruppen 2 bis 5 zwischen 0 und 10 % Schaden, sowohl peripher als auch zentral, so dass lediglich eine Abweichung zur Gruppe 1, deren Mediane weit über 40% lagen, gegeben sein müsste.

Der Grund, warum die p-Werte nicht den Bildern entsprachen, war wohl, dass der Post-Hoc-Test nach Kruskal Wallis Ränge verwendete. D.h. dass der Test zum Vergleich der Datensätze den einzelnen Daten eine Rangnummer zuordnete und sie an Hand dieser verglich.

Zum Beispiel betrug der mittlere Rang für die peripheren Daten 58,9 für Gruppe 1, 37,1 für Gruppe 2, 33,9 für Gruppe 3, 24,7 für Gruppe 4 und 17,9 für Gruppe 5. Vergleicht man die Gruppen anhand dieser Werte, so unterscheidet sich tatsächlich die erste Gruppe von der zweiten Gruppe am wenigsten. Die mittleren Ränge der Gruppen 3, 4 und 5 liegen weiter von dem Wert der ersten Gruppe weg. Das entspricht dem Ergebnis der p-Werte. (vgl. Tab. 11.1 ) Gleiches gilt für die zentralen Daten. Im Boxplot sieht man das leider nicht, weil dort keine Ränge angegeben sind, sondern die Mediane.

Da der Boxplot aber zeigt, dass sich Gruppe 1 so deutlich von den anderen abhebt, kann man an Hand der Graphik trotzdem auf eine Signifikanz schließen.

### 4.3.2 Schaden nach 48-stündiger Inkubation (Apoptose)

Quellung, Pleomorphismus und Variabilität der Zellgrößen organkultivierter Hornhautlamellen sind ein bekanntes Phänomen, das in dieser Arbeit festgestellt wurde, sowohl an laserpräparierten Lentikeln als auch an Kontrollhornhäuten ohne Laserablation. Kohlhaas et al. und Lambert et al. beschrieben einen zunehmenden Polymegathismus und Zellpleomorphismus mit teilweiser Verdickung der Zellgrenzen [53, 65]. Böhnke et al. stellten nach 8-tägiger Konservierung von Hornhautlamellen in Kulturmedien ohne osmotische Zusätze eine starke Quellung des Stromas bis zu vier mm fest. Das Endothel war vital, aber in einigen Zellen wurden Vakuolen und somit eine Zellvergrößerung beobachtet [66]. Mc Dermott et al. bestätigten sowohl eine Gesamtschwellung menschlicher Korneae mittels Pachymetrie, als auch eine Schwellung der Endothelzellen im REM [67].

Obwohl von Narula et al. nachgewiesen wurde, dass ein in DMEM kultiviertes Endothel weiterhin seine Pumpfunktion aufrecht erhält und keinen Schaden nimmt, konnte dies hier nicht bestätigt werden [46]. Sowohl die Kontrollpräparate als auch die Laserpräparate waren um ein vielfaches gequollen und wiesen Veränderungen im Sinne einer Zunahme der Plasma-Kern-Relation am Endothel auf, was auf eine Störung der Endothelfunktion und -barriere hinweist, die aber nicht gemessen wurde. Wahrscheinlicher ist aber ein zelluläres Ödem, das durch schlechte osmotische Verhältnisse zwischen dem Kulturmedium und den Endothelzellen entsteht. Eine Entquellung kann durch Zugabe von Dextran oder Hyaluronsäure erreicht werden [66] oder durch Verwendung eines anderen Kulturmediums.

Nach 48-stündiger Inkubation ließ sich sowohl für eine unbehandelte Kontrollgruppe als auch für laserpräparierte Lentikel kein signifikanter Unterschied des Endothelschadens im Vergleich zu entsprechend umgehend untersuchten Vergleichsgeweben nachweisen. Es fiel auf, dass der Endothelschaden der Lentikel nach Inkubation sogar geringer war als bei unmittelbar begutachteten Lentikeln.

Die bisherigen Studien, die sich mit dem Einfluss des Excimer-Lasers auf das Hornhautendothel befasst haben, ließen noch keinen definitiven Schluss über eine mögliche Endothelschädigung zu, da ihre Ergebnisse zum Teil widersprüchlich waren.

Kohlhaas et al. beobachteten bei Ablationen bis zu 300µm Restdicke an Schweinebulbi eine signifikante Endothelzellabnahme vom ersten bis zum fünften postoperativen Tag. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied festgestellt werden [53]. Erklärt wurde die Zunahme des Schadens durch den Verbrauch des Kulturmediums und die Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte.

Brunette und Shi wiesen bei kultivierten humanen Hornhäuten einen Zellverlust nach, der bei Ablationen bis 25 dpt direkt proportional zur Ablationstiefe oder zur Anzahl der Impulse war [68]. Kent et al. fanden einen Endothelzellverlust nach hochdioptrischer myopischer PRK und LASIK-Behandlung in frisch enukleierten humanen Spenderbulbi. Sie fanden jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Hornhäuten nach 7-tägiger Organkultivierung. Die Qualität des Spendermaterials oder die Zeit vom Tod bis zur Gewebekonservierung im Kulturmedium waren entscheidender für die Entstehung eines Endothelzellschaden als die Ablationstiefe [69].

Im Gegensatz dazu beobachteten Lambert et al. nach ebenfalls 7-tägiger Konservierung von um 150 µm abladierten humanen Hornhautlamellen in serumfreiem Kulturmedium einen signifikanten Unterschied der Endothelzellichte zu nicht behandelten Kontrollaugen [65].

Die publizierten Daten experimenteller Studien variieren jedoch in Material und Methode. Dabei ist zu berücksichtigen, ob die Hornhaut von Schweine-, Kaninchen- oder Humanbulbi stammt, welches Kulturmedium verwendet, wie lange inkubiert und welche Einstellungen des Excimer-Lasers verwendet wurden.

Mehrere klinische Studien haben keinen Effekt des Excimer-Lasers am Endothel nach PRK nachweisen können.[70-73] Die Arbeitsgruppe von Mardelli untersuchte Patienten bis 55 Monate nach der Behandlung und stellte keine signifikante Änderung der Endothelzellichte fest. Da bei PRK nur die Oberfläche der Kornea abladiert wird, scheint der Schaden am Endothel vernachlässigbar zu sein.

Jones und Mitarbeiter fanden keinen signifikanten Wechsel der Zelldichte und Zellgröße, zwei und 12 Wochen nach einer LASIK-Behandlung bei Patienten mit einer Myopiekorrektur von bis zu 14,5 Dioptrien, d.h. Ablationstiefen bis zu 200 µm unter der Hornhautoberfläche [74].



Perez-Santonja et al. beobachteten auch keinen Schaden am zentralen Endothel nach LASIK-Behandlung, sondern sogar eine Verbesserung der Zelldichte, welche sie mit dem wegfallenden Gebrauch von Kontaktlinsen nach der Behandlung erklärten [75].

In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen umgehend beurteilten und für zwei Tage inkubierten, laserabladierten Hornhautlentikeln festgestellt werden. Zudem ist der Gesamtschaden mit  $9,6 \pm 11,1$  % zwar gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höher, aber in Betracht der Vitalität des Endothels immer noch akzeptabel.

#### **4.4 Oberflächenstruktur der Spenderlentikel**

Die Oberflächenbeschaffenheit des Stromas nach der hier durchgeführten Laserablation mit 30 Hz stellte sich im Rasterelektronenmikroskop (REM) stark strukturiert mit einem regelmäßigen Wechsel zwischen Furchen und Erhabenheiten von bis zu 100  $\mu\text{m}$  dar. Diese Strukturen ließen die abladierte Stromaoberfläche rau erscheinen und wurden schon früher beschrieben [61, 76-79].

Das Bild der Rauigkeit wurde bei allen Präparaten vorgefunden, unabhängig von der Ablationstiefe, die bei 134  $\mu\text{m}$  Restdicke ihren tiefsten Punkt erreichte. Diese Befunde stehen im starken Widerspruch zu anderen Arbeiten. Dehm et al. beobachteten bei Ablationstiefen bis zu 90% der Ursprungsdicke keine stromalen Auffälligkeiten.

Die Arbeitsgruppe von Kerr-Miur untersuchte die Oberfläche des Stromas an humanen Spenderbulbi nach Laserablation im Vergleich zu manuell durchgeführten Keratektomien mittels REM. Sie stellten mittels Laserablation eine verdichtete glatte Oberfläche ohne exponierte Zellelemente im REM fest, deren Unebenheiten im Submikrometerbereich lagen. Bei manueller Exzision bestand die präparierte Oberfläche hingegen aus gequetschten und zerrissenen Kollagenlamellen und Zellelementen, die jedoch lediglich einige Mikrometer erhaben waren [31].

Liang et al. untersuchten den Effekt von Excimer-Laser-Ablationen auf die Oberflächenbeschaffenheit bei unterschiedlichen Frequenzen (fünf, zehn, 15 und 20 Hz) an Kaninchenkornea. Die Oberflächenstruktur wurde als Rauigkeit beschrieben und war unabhängig von der angewandten Frequenz. Es fanden sich keine begleitenden Stromaverletzungen bei der Verwendung höherer Frequenzen. Allerdings wurde bei

dieser Arbeit ein Laser mit Gaslüfter verwendet, um möglichst entstehende Ablagerungen von ablatiertem Gewebe zu verhindern [78].

Frueh und Mitarbeiter untersuchten die Oberflächenstruktur nach erfolgter LASIK Behandlung mittels REM [79]. Die veröffentlichten und beschriebenen Aufnahmen zeigten unter Verwendung eines Schwind Excimer-Lasers ohne Lüfter eine gleichmäßig, leicht rau strukturierte Stromaoberfläche..

Campos et al. stellten fest, dass das Stroma nach Ablation umso rauer erschien, je dehydrierter die Kornea war. Dehydratation des Gewebes erreichten sie, indem sie die Hornhaut nach Ablation eine Minute unter dem Licht des Operationsmikroskops stehen ließen [76]. Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen Stickstoffgas während des Laservorgangs über das Gewebe zu blasen, um es zu hydrieren. Dies resultierte jedoch in einer noch raueren Oberfläche des Stromas als ohne Gas [61]. Erst bei Verwendung eines Gases mit Wasseranteil erhielt man eine glattere Oberfläche [77].

Der hier verwendete Schwind Excimer-Laser arbeitete ebenfalls ohne Gaslüfter. Allerdings könnte Dehydratation der Grund für die erhaltene raue Oberfläche sein. Die Dehydratation könnte zum einen durch die sehr lange Behandlungsdauer, die zum Erreichen der gewünschten Ablationtiefe nötig war (im Mittel 1005 s) und zum anderen durch die vergangene Zeit von mindestens einer Minute zwischen dem Abschluß der Ablation und dem Vermessen der Restdicke am Pachymeter zu erklären sein. In dieser Zeit wurde keine Kochsalzlösung o.ä. zur Hydratation verwendet, um die bei vorherigen Probeversuchen beobachtete Quellung und somit Verfälschung der Messungen der tatsächlichen Restdicke auszuschließen.

Neuere Untersuchungen mit einem Femtosekundenlaser, ein sehr kurz gepulster Laser, ergaben eine sehr glatte, regelmäßige Oberfläche mit rechteckigen Kanten der herausgeschnittenen Lamelle. Mit diesem Laser ist es möglich sowohl das Empfängerbett als auch die Spenderlamelle aus der Kornea für eine PLKP oder die Flaps der LASIK zu schneiden [80, 81].

Über die Auswirkung der raueren Stromaseite auf den klinischen Einsatz der durch Laser präparierten Lamelle als Transplantat einer PLKP kann nur spekuliert werden, da dies noch nicht klinisch getestet wurde. Auf der einen Seite könnte die leichte Rauigkeit für

eine bessere Adhäsion des Lentikels im Empfängerbett sorgen [12]. Andererseits könnte es durch eine erhöhte Rauigkeit zu vermehrten Vernarbungen in der optischen Achse und somit Sehbeeinträchtigung kommen, wie es als sog. „Interface-Problematik“ bereits für andere lamelläre Keratoplastiken beschrieben wurde [1]. Die Rauigkeit der Oberfläche könnte verringert werden, wenn die Hornhaut während der Behandlung ausreichend hydriert wird. Dies würde allerdings den Ablationsprozess verlängern, der jedoch an der dünneren menschlichen Hornhaut kürzer sein sollte. Dies sind nur Vermutungen, die in weiteren Studien überprüft werden müssten.

#### **4.5 Antworten auf Fragestellungen**

1. Es ist möglich mit dem 193nm-Excimer-Laser an korneoskleralen Spenderscheiben tiefe, großflächige Ablationen bis kurz vor das Niveau der Descemet-Lamelle durchzuführen ohne nachweisbaren Stromaschaden zu induzieren. Aus den so präparierten Spenderscheiben können Lentikel für eine posteriore lamelläre Keratoplastik gestanzt werden. Das leichte Stromaödem müsste nach Transplantation bei intakter Endothelfunktion reversibel sein
2. Der Endothelschaden dieser Lentikel ist nach Laserablation zwar größer als bei Transplantaten für die perforierende Keratoplastik, liegt aber im Mittel aller Lentikeldicken mit 7,13 % noch in einem akzeptablen Bereich. Auch nach 48-stündiger Inkubation sind keine signifikanten Schäden am Endothel zu beobachten.
3. Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen Ausmaß des Endothelschadens und Ablationstiefe. Der Schaden innerhalb der verschiedenen Gruppen (2 bis 5) beträgt immer unter 10%. Bei tieferen Ablationen und somit kleinerer Entfernung zum Endothel entsteht also kein erhöhter Schaden. Daher ist davon auszugehen, dass der entstehende Schaden nicht durch den Laser verursacht wird, sondern beispielsweise eher durch Manipulation an der Lamelle während der Präparation.

4. Das Stroma erscheint nach Laserablation zwar gleichmäßig strukturiert, aber verstärkt aufgeraut. Dieser Effekt ist unabhängig von der Ablationstiefe und könnte, wenn er kein Präparationsartefakt ist, eine vermehrte Narbenbildung im Interface verursachen, andererseits jedoch evtl. durch eine intraoperative Hydratation vermieden werden.

Zusammenfassend erscheint es aus diesen ex-vivo-Ergebnissen am Modell des Schweineauges möglich Spenderlentikel für eine posteriore lamelläre Keratoplastik zu präparieren.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Tauglichkeit des Excimer-Lasers zur Präparation von Spendertransplantaten für die posteriore lamelläre Keratoplastik ex vivo untersucht. Das Resultat der Transplantation hängt vor allem von der Qualität des Spendertransplantates ab. Von besonderem Interesse war daher der Effekt des Lasers auf die stromale Oberflächenbeschaffenheit und das Endothel des Transplantates.

### Material und Methoden:

Zur Untersuchung wurden frisch enukleierte Schweinebulbi zunächst vor und nach einer Epithelabrasio mittel OLCR pachymetrisch vermessen. Die Korneae der Bulbi wurden dann unter standardisierten Bedingungen einer Excimer-Laserablation unterzogen und nach erneuter pachymetrischer Vermessung einer der Untersuchungsgruppen zugeordnet. Die Untersuchungsgruppen waren unterteilt nach den Restdicken der Korneae in fünf verschiedene (Gruppe 1 Perforation; Gruppe 2 50 - 100  $\mu\text{m}$ ; Gruppe 3 100 – 200  $\mu\text{m}$ ; Gruppe 4 200 – 300  $\mu\text{m}$  und Gruppe 5 300 – 400  $\mu\text{m}$ ). Nach Präparation eines Hornhautlentikels, wie für eine posteriore lamelläre Transplantation erfolgte für 63 Präparate eine Alizarinrot-Trypanblau-Doppelfärbung, um den Sofortschaden am Endothel feststellen zu können, für 10 Präparate eine Inkubation für 48 Std. in Kulturmedium, um danach mittels Alizarinrot-Trypanblau-Doppelfärbung einen Spätschaden beurteilen zu können, für 12 Präparate eine Fixation für die histologische bzw. für 6 Präparate eine Fixation für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.

### Ergebnisse:

Die Beurteilung der Endothelvitalität ergab, dass der Schaden der gelaserten Lentikel der Restdicken 50 bis 400  $\mu\text{m}$  ( $n = 54$ ) mit im Mittel 7,1% untereinander nicht signifikant unterschiedlich war ( $p > 0,05$ ). Bei bis zur Perforation behandelten Lentikeln wurde das Signifikanzniveau mit im Mittel 62,8 % Schaden ( $p < 0,05$ ) allerdings erreicht, da eine erhebliche Endothelschädigung zu finden war. Die Endothelvitalität der Restdicken 50 bis 400  $\mu\text{m}$  war am Präparat zentral und peripher gleichermaßen gegeben ( $p > 0,05$ ). Das Signifikanzniveau mit  $p < 0,05$  wurde erreicht beim Vergleich der gelaserten Lentikel (7,1% Schaden) mit der unbehandelten Kontrollgruppe (0,6% Schaden).

Ebenfalls bei der Beurteilung des Spätschadens der Endothelvitalität zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Lasergruppe ( $p < 0,05$ ). Allerdings war der Spätschaden der Lasergruppe im Vergleich mit dem Sofortschaden der Lasergruppe nicht signifikant größer ( $p > 0,05$ ).

Es zeigten sich keine histologischen Unterschiede zwischen den Hornhautlenticeln die mittels Excimer-Laser-Ablation präpariert worden waren und den nichtbehandelten Kontrollhornhäuten. Die Oberflächenbeschaffenheit des Stromas stellte sich im Rasterelektronenmikroskop unabhängig von der Tiefe der Laserablation einheitlich dar.

#### Diskussion:

Die Laser-Präparation könnte im Vergleich zu den herkömmlich Methoden eine weitere, ggf. schonendere Möglichkeit darstellen, Präparate für eine posteriore lamelläre Keratoplastik herzustellen. Die Vorteile eines solchen Vorgehens lägen in einer besonders präzisen/kontrollierten Präparationstechnik, die eine exakte Wahl der Spenderlenticeldicke ermöglichen würde.

Die Ergebnisse belegen die Möglichkeit mit dem Laser saubere, kontrollierte Ablationen bis 8,75 mm Durchmesser ohne in der Histologie oder Oberflächenbeschaffenheit nachweisbaren Schaden durchzuführen, so dass aus diesen 8 mm große lamelläre Transplantate für eine posteriore lamelläre Keratoplastik trepaniert werden können. Selbst bei einer Restdicke deutlich unter 100  $\mu\text{m}$  blieben dabei Schäden aus. Auch die Endothelvitalität nach Laserablation war von der Ablationstiefe unabhängig und lag mit 7,1 % noch in einem akzeptablen Bereich.

## Literaturverzeichnis

1. Seitz, B. and G. Geerling, *Lamellierende oder perforierende Keratoplastik*. Ophthalmologe, 2005. **102**(12): p. 1126-1127.
2. Geerling, G., et al., [*Lamellar keratoplasty. Back to the future?!*]. Ophthalmologe, 2005. **102**(12): p. 1140-8, 1150-1.
3. Benninghoff, A., *Anatomie*, ed. Elsevier. Vol. 16. 2004. 667-670.
4. Krachmer, J., *Cornea*. Elsevier MOSBY ed. Vol. 1. 2005. 3-23.
5. Smolin, T., *The Cornea*. Little Brown and Company ed. Vol. 2. 1987. 3-15; 543-547.
6. Tuft, S.J. and D.J. Coster, *The corneal endothelium*. Eye, 1990. **4** ( Pt 3): p. 389-424.
7. Kauffman, H., *The Cornea*. Churchill Livingstone Inc. ed. 1988. 19-22.
8. Daus, W. and H.E. Volcker, [*Corneal endothelium. Anatomy, physiology, biomicroscopy, clinical aspects and pathology*]. Ophthalmologe, 1992. **89**(2): p. W15-26.
9. Seitz, B., A. Langenbacher, and G.O. Naumann, [*The penetrating keratoplasty. A 100-year success story*]. Ophthalmologe, 2005. **102**(12): p. 1128-36, 1138-9.
10. Seitz, B. *Möglichkeiten und Grenzen der Hornhaut-Transplantation heute*. 1999 [cited; Available from: <http://www.onjoph.com/english/artikel/hhtrans-body.html>].
11. Polack, F., *Queratoplastia lamelar posterior*. Rev Peru Oftalmol., 1965. **2**: p. 62-64.
12. Terry, M.A., *Endothelial keratoplasty: history, current state, and future directions*. Cornea, 2006. **25**(8): p. 873-8.
13. Terry, M.A., *Deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK): pursuing the ideal goals of endothelial replacement*. Eye, 2003. **17**(8): p. 982-8.
14. Melles, G.R., et al., *Posterior lamellar keratoplasty for a case of pseudophakic bullous keratopathy*. Am J Ophthalmol, 1999. **127**(3): p. 340-1.
15. Melles, G.R., et al., *A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty*. Cornea, 1998. **17**(6): p. 618-26.
16. Melles, G.R., F. Lander, and C. Nieuwendaal, *Sutureless, posterior lamellar keratoplasty: a case report of a modified technique*. Cornea, 2002. **21**(3): p. 325-7.
17. Melles, G.R. and N. Kamminga, [*Techniques for posterior lamellar keratoplasty through a scleral incision*]. Ophthalmologe, 2003. **100**(9): p. 689-95.
18. Melles, G.R., R.H. Wijdh, and C.P. Nieuwendaal, *A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis)*. Cornea, 2004. **23**(3): p. 286-8.
19. Melles, G.R., *Posterior lamellar keratoplasty: DLEK to DSEK to DMEK*. Cornea, 2006. **25**(8): p. 879-81.
20. Eichler, J., *Laser Bauformen, Strahlenführung, Anwendungen*. Springer ed. Vol. 5. 2003. 1-49, 120-127.
21. Jesse, K., *Laser - Grundlagen und moderne Trends*. VDE Verlag ed. 1999. 15-23; .
22. Metev, S. and G. Sepold, *Excimer Lasers and New Trends in Laser Microtechnology*. Meisenbach ed. 1993. 3-9.

23. Elliot, D., *Ultraviolet Laser Technology and Applications*. Academic Press Inc. ed. 1995. 67-75.
24. Salz, J., *Corneal Laser Surgery*. 1995: Mosby. 11-39.
25. Seiler, T., *Refraktive Chirurgie der Hornhaut*. Enke Verlag Thieme ed. Vol. 1. 2000. 8-12, 150-156.
26. Taylor, D.M., et al., *Human excimer laser lamellar keratectomy. A clinical study*. *Ophthalmology*, 1989. **96**(5): p. 654-64.
27. Trokel, S.L., R. Srinivasan, and B. Braren, *Excimer laser surgery of the cornea*. *Am J Ophthalmol*, 1983. **96**(6): p. 710-5.
28. Seitz, B., et al., *Nonmechanical corneal trephination with the excimer laser improves outcome after penetrating keratoplasty*. *Ophthalmology*, 1999. **106**(6): p. 1156-64; discussion 1165.
29. Lang, G.K., et al., [*Configuration of corneal incisions with the excimer laser: an experimental study*]. *Fortschr Ophthalmol*, 1989. **86**(5): p. 437-42.
30. Lang, G.K., et al., *Excimer laser keratoplasty. Part 1: Basic concepts*. *Ophthalmic Surg*, 1989. **20**(4): p. 262-7.
31. Kerr-Muir, M.G., et al., *Ultrastructural comparison of conventional surgical and argon fluoride excimer laser keratectomy*. *Am J Ophthalmol*, 1987. **103**(3 Pt 2): p. 448-53.
32. Gillis, A. and T. Zeyen, *Comparison of optical coherence reflectometry and ultrasound central corneal pachymetry*. *Bull Soc Belge Ophthalmol*, 2004. **292**: p. 71-75.
33. Wälti, R., M. Böhnke, and R. Gianotti, *Rapid and precise in vivo measurement of human corneal thickness with optical low coherence reflectometry in normal human eyes*. *J Biomed Opt*, 1998. **3**: p. 253-258.
34. Gaujoux, T. and et al., *Comparison of Optical Low-Coherence Reflectometry and Ultrasound Pachymetry in Measuring Corneal Graft Thickness*. *Cornea*, 2007. **26**(2): p. 185-189.
35. Genth, U., et al., *Optical low coherence reflectometry for noncontact measurements of flap thickness during laser in situ keratomileusis*. *Ophthalmology*, 2002. **109**(5): p. 973-8.
36. Romeis, B., *Mikroskopische Technik*. Urban&Schwarzenberg ed. Vol. 17. 1989. 8+9.
37. Junqueira, L., *Histologie*. Springer ed. Vol. 6. 2004.
38. Taylor, M.J. and C.J. Hunt, *Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction*. *Br J Ophthalmol*, 1981. **65**(12): p. 815-9.
39. Sperling, S., *Combined staining of corneal endothelium by alizarine red and trypane blue*. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 1977. **55**(4): p. 573-80.
40. Tüngler, A., *Akuter Hornhautendothelschaden nach Dioden-Laserthermokeratoplastik: Eine experimentelle Untersuchung an Schweineaugen*. 2001: Doktorarbeit an der medizinischen Universität zu Lübeck.
41. Meltendorf, C., *Vitrifikation von Hornhautlamellen*. 2001, Doktorarbeit an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.
42. Mindrup, E.A., P.A. Dubbel, and D.J. Doughman, *Betadine decontamination of donor globes*. *Cornea*, 1993. **12**(4): p. 324-9.



43. Nash, R.W., T.D. Lindquist, and R.E. Kalina, *An evaluation of saline irrigation and comparison of povidone-iodine and antibiotic in the surface decontamination of donor eyes*. Arch Ophthalmol, 1991. **109**(6): p. 869-72.
44. Mac Rae, S.M., B. Brown, and H.F. Edelhauser, *The corneal toxicity of presurgical skin antiseptics*. Am J Ophthalmol, 1984. **97**(2): p. 221-32.
45. Wille, H., *Assessment of possible toxic effects of polyvinylpyrrolidone-iodine upon the human eye in conjunction with cataract extraction. An endothelial specular microscope study*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1982. **60**(6): p. 955-60.
46. Narula, P., et al., *Fluid transport across cultured bovine corneal endothelial cell monolayers*. Am J Physiol, 1992. **262**(1 Pt 1): p. C98-103.
47. Kloss, A. and M. Bohnke, *[In vitro study of endothelial tolerance of 10 culture media with special reference to the pump and barrier function]*. Fortschr Ophthalmol, 1991. **88**(6): p. 781-5.
48. Bortz, J., *Statistik*, ed. Springer. Vol. 6. Auflage. 2005.
49. Weiß, C., *Basiswissen medizinische Statistik*. Springer ed. Vol. 2. 2002. 204-233.
50. Lienert, G., *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung*, ed. Springer. Vol. 2. 2003.
51. Grutzmacher, R.D., et al., *Donor corneal endothelial striae*. Am J Ophthalmol, 1986. **102**(4): p. 508-15.
52. Nartey, I.N., E.S. Sherrard, and A.D. Steele, *Manipulative damage to the endothelium of infant and adult donor corneas*. Br J Ophthalmol, 1990. **74**(5): p. 261-4.
53. Kohlhaas, M., J. Carstens, and G. Richard, *[Effect of various ablation levels on endothelial density in the enucleated pig eye. Experimental study with the 193 nm Excimer laser]*. Ophthalmologie, 1997. **94**(7): p. 475-80.
54. Bohnke, M., et al., *Continuous non-contact corneal pachymetry with a high speed reflectometer*. J Refract Surg, 1998. **14**(2): p. 140-6.
55. Much, M. and W. Haigis, *Ultrasound and Partial Coherence Interferometry with Measurement of Central Corneal Thickness*. Journal of Refractive Surgery, 2006. **22**: p. 665-670.
56. Koch, J.W., et al., *[Corneal wound healing after perforating and non-perforating excimer laser keratectomy. An experimental study]*. Fortschr Ophthalmol, 1990. **87**(6): p. 615-22.
57. Marshall, J., et al., *An ultrastructural study of corneal incisions induced by an excimer laser at 193 nm*. Ophthalmology, 1985. **92**(6): p. 749-58.
58. Marshall, J., et al., *A comparative study of corneal incisions induced by diamond and steel knives and two ultraviolet radiations from an excimer laser*. Br J Ophthalmol, 1986. **70**(7): p. 482-501.
59. Frueh, B.E. and M. Bohnke, *Endothelial cell morphology after phototherapeutic keratectomy*. Ger J Ophthalmol, 1995. **4**(2): p. 86-90.
60. Zabel, R., S. Tuft, and J. Marshall, *Excimer laser photorefractive keratectomy: endothelial morphology following area ablation of the cornea*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988. **29**(suppl): p. 390.
61. Krueger and Binder, *Effects of Excimer Laser Photoablation on the Cornea*. 11-39.
62. Ozler, S.A., et al., *Acute ultrastructural changes of cornea after excimer laser ablation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992. **33**(3): p. 540-6.

63. Costagliola, C., et al., *ArF 193 nm excimer laser corneal surgery as a possible risk factor in cataractogenesis*. *Exp Eye Res*, 1994. **58**(4): p. 453-7.
64. K Kim et al., *Corneal endothelial permeability after deep excimer laser ablation*. *ARVO abstracts Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996. **37** (3 suppl): p. 84.
65. Lambert, R.W., et al., *Excimer laser effects on human corneal endothelium. Modulation by serum factor(s)*. *Arch Ophthalmol*, 1996. **114**(12): p. 1499-505.
66. Bohnke, M., M. Hagenah, and J. Draeger, [*New osmotic additives to culture media for corneal preservation*]. *Fortschr Ophthalmol*, 1991. **88**(2): p. 113-7.
67. McDermott, M., et al., *Effects of intraocular irrigants on the preserved human corneal endothelium*. *Cornea*, 1991. **10**(5): p. 402-7.
68. Brunette, I. and Z. Shi, *Dose related corneal endothelial cell toxicity of excimer laser photorefractive keratectomy*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996. **37**: p. 73.
69. Kent, D.G., et al., *Effect of surface photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis on the corneal endothelium*. *J Cataract Refract Surg*, 1997. **23**(3): p. 386-97.
70. Sher, N.A., et al., *The use of the 193-nm excimer laser for myopic photorefractive keratectomy in sighted eyes. A multicenter study*. *Arch Ophthalmol*, 1991. **109**(11): p. 1525-30.
71. Amano, S. and K. Shimizu, *Corneal endothelial changes after excimer laser photorefractive keratectomy*. *Am J Ophthalmol*, 1993. **116**(6): p. 692-4.
72. Carones, F., et al., *The corneal endothelium after myopic excimer laser photorefractive keratectomy*. *Arch Ophthalmol*, 1994. **112**(7): p. 920-4.
73. Mardelli, P.G., et al., *Corneal endothelial status 12 to 55 months after excimer laser photorefractive keratectomy*. *Ophthalmology*, 1995. **102**(4): p. 544-9; discussion 548-9.
74. Jones, S.S., et al., *Effects of laser in situ keratomileusis (LASIK) on the corneal endothelium*. *Am J Ophthalmol*, 1998. **125**(4): p. 465-71.
75. Perez-Santonja, J.J., et al., *Corneal endothelial changes after laser in situ keratomileusis*. *J Cataract Refract Surg*, 1997. **23**(2): p. 177-83.
76. Campos, M., S.L. Trokel, and P.J. McDonnell, *Surface morphology following photorefractive keratectomy*. *Ophthalmic Surg*, 1993. **24**(12): p. 822-5.
77. Krueger, R.R., et al., *Corneal surface morphology following excimer laser ablation with humidified gases*. *Arch Ophthalmol*, 1993. **111**(8): p. 1131-7.
78. Liang, F.Q., et al., *Surface quality of excimer laser corneal ablation with different frequencies*. *Cornea*, 1993. **12**(6): p. 500-6.
79. Frueh, B.E., P. Eggl, and M. Bohnke, *Morphology of the stromal surface and endothelium using two different microkeratomes*. *J Refract Surg*, 2001. **17**(4): p. 428-32.
80. Seitz, B., et al., *Nonmechanical posterior lamellar keratoplasty using the femtosecond laser (femto-plak) for corneal endothelial decompensation*. *Am J Ophthalmol*, 2003. **136**(4): p. 769-72.
81. Holzer, M.P., T.M. Rabsilber, and G.U. Auffarth, *Femtosecond laser-assisted corneal flap cuts: morphology, accuracy, and histopathology*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. **47**(7): p. 2828-31.

## Tabellenverzeichnis aus Ergebnisteil

	Gruppe 2 Restdicke - 100µm		Gruppe 3 Restdicke 100-200µm		Gruppe 4 Restdicke 200-300µm		Gruppe 5 Restdicke 300-400µm	
	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet
Mittelwert	80,9	67,9	134,1	131,1	243,8	248,1	331,5	348,7
Standard- abweichung	13,3	36,3	21,1	34,6	27,6	43,1	29,4	28,8
Min	55,4	26,3	105,4	86,6	204,4	192,9	303	294,4
Max	95,7	126,5	167,4	219,8	295,7	339,3	401	395,1
n	9	9	15	15	15	15	15	15

**Tab.5** Angestrebte Restdicke. Die Tabelle gibt die gemessenen im Vergleich zu den erwarteten Restdicken [µm] wieder. Gruppe 1 war nicht vermessen.

	<b>Gesamtschaden</b> Zellzahl absolut und in (%)	<b>Peripherer Schaden</b> Zellzahl absolut und in (%)	<b>Zentraler Schaden</b> Zellzahl absolut und in (%)
Mittelwert	90,10 (0,56)	58,30 (0,59)	31,80 (0,51)
Standardabweichung	76 (0,47)	49,28 (0,50)	41,23 (0,67)
Max	264 (1,64)	142 (1,43)	122 (1,97)
Min	17 (0,11)	14 (0,14)	3 (0,05)
n	10	10	10

**Tab. 6** Prozentualer Anteil geschädigter Endothelzellen in der Kontrollgruppe. Gibt den Schaden Absolutzellzahl und (%) des Endothels der 10 Hornhäute der Kontrollgruppe, getrennt in Gesamt-, Peripher- und Zentralschaden wieder.

	Gruppe 1 Perforation	Gruppe 2 50-100µm	Gruppe 3 100-200µm	Gruppe 4 200-300µm	Gruppe 5 300-400µm	Kontroll- gruppe
Mittelwert	62,80	7,64	10,08	6,42	4,39	0,56
Standardabweichung	31,16	3,31	8,87	5,16	4,21	0,47
Min	24,92	3,23	4,59	0,59	0,36	0,11
Max	100,00	13,18	39,54	20,51	15,08	1,64
n	9	9	15	15	15	10

**Tab. 7** Gesamtschaden nach Laserablation in Prozent der Endothelzellen.

Gruppen	1	2	3	4	5
1		<b>0,027932</b>	<b>0,026462</b>	<b>0,000188</b>	<b>0,000002</b>
2			1,000000	1,000000	0,630464
3				1,000000	0,112486
4					1,000000

**Tab. 8** P-Werte des Post-Hoc-Test (p<0,05 fett gedruckt)

Peripher	Gruppe 1 Perforation	Gruppe 2 50-100µm	Gruppe 3 100-200µm	Gruppe 4 200-300µm	Gruppe 5 300-400µm	Kontroll- gruppe
Mittelwert	59,60	7,59	8,35	6,21	3,31	0,59
Standardabweichung	30,56	3,09	6,84	7,71	2,47	0,50
Min	31,68	3,71	0,73	0,89	0,47	0,14
Max	100,00	13,02	27,49	32,11	9,10	1,43
n	9	9	15	15	15	10

**Tab. 9** Peripherer Endothelschaden [%] nach Laserapplikation

Zentral	Gruppe 1 Perforation	Gruppe 2 50-100µm	Gruppe 3 100- 200µm	Gruppe 4 200- 300µm	Gruppe 5 300-400µm	Kontroll- gruppe
Mittelwert	67,92	7,84	12,36	6,18	7,15	0,51
Standardabweichung	43,92	6,01	14,82	6,33	8,97	0,67
Min	3,00	0,56	0,75	0,11	0,19	0,05
Max	100,00	20,56	58,84	17,71	24,65	0,97
n	9	9	15	15	15	10

**Tab. 10** Zentraler Endothelschaden [%] nach Laserapplikation.

	Gruppe 1 Perforation	Gruppe 2 50-100µm	Gruppe 3 100-200µm	Gruppe 4 200-300µm	Gruppe 5 300-400µm
Gruppe 1 Perforation		0,117259	<b>0,012239</b>	<b>0,000114</b>	<b>0,000001</b>
Gruppe 2 50-100µm			1,000000	1,000000	0,130882
Gruppe 3 100-200µm				1,000000	0,170570
Gruppe 4 200-300µm					1,000000

**Tab. 11** P-Werte des Post-Hoc-Test bei der Auswertung des peripheren Endothelschadens (p<0,05 fett gedruckt)

	Gruppe 1 Perforation	Gruppe 2 50-100µm	Gruppe 3 100-200µm	Gruppe 4 200-300µm	Gruppe 5 300-400µm
Gruppe 1 Perforation		0,161919	0,251015	<b>0,000114</b>	<b>0,003149</b>
Gruppe 2 50-100µm			1,000000	1,000000	1,000000
Gruppe 3 100-200µm				1,000000	1,000000
Gruppe 4 200-300µm					1,000000

**Tab. 12** P-Werte des Post-Hoc-Test bei der Auswertung des zentralen Schadens (p<0,05 fett gedruckt)

	Gesamtschaden in %	Peripherer Schaden in %	Zentraler Schaden in %
Mittelwert	1,73	2,81	0,56
Standardabweichung	2,68	4,52	1,14
Min	0,00	0,00	0,00
Max	6,61	11,29	3,37
n	8	8	8

**Tab.13** Schaden [%] des Endothels der 8 Hornhäute der Kontrollgruppe, die 48 Stunden kultiviert wurden, getrennt in Gesamt-, Peripher- und Zentralschaden wieder.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. G. Geerling danke ich für die Themenstellung, Einarbeitung in diese und die gute Betreuung, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Vielen Dank

Herrn Prof. Dr. Dr. Grehn danke ich für die freundliche Aufnahme und zur Verfügungstellung der Räumlichkeiten und Untersuchungsgeräte für die Durchführung der Dissertation in seiner Klinik.

Priv.-Doz. Dr. G. Schlunck danke ich für die gute Zusammenarbeit. Er stand mir sowohl in theoretischen als auch praktischen Anliegen zur Seite.

Den Oberärzten und Assistenzärzten der Augenklinik danke ich für die Unterstützung und anregenden Diskussionen.

Den Mitarbeitern der Augenklinik, v.a. Fr. Herkersdorf danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung im histologischen Labor.

Den Mitarbeitern des biologischen Instituts der Universität Würzburg danke ich für die Nutzung des Rasterelektronenmikroskops und die Unterstützung bei der Herstellung und Interpretation der Präparate.

Den Mitarbeitern des Schlachthofs Südfleisch GmbH Würzburg danke ich für die Bereitstellung der Schweineaugen, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern und meinem Freund danke ich für die liebevolle Unterstützung und Motivation während des Studiums sowie zur Durchführung und Fertigstellung dieser Dissertation.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

<i>Name</i>	<b>Widmann</b>
<i>Vorname</i>	<b>Maren</b>
<i>Geburtsdatum</i>	02.07.1982
<i>Geburtsort / Land</i>	Ludwigsburg / Deutschland
<i>Staatsangehörigkeit</i>	deutsch
<i>Familienstand</i>	ledig

### Beruf

<i>Seit 07.2009</i>	<b>Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe Klinikum Weiden</b>
---------------------	---

### Studium

<i>05.2009</i>	<b>Approbation als Ärztin</b>
<i>04.2003 – 05.2009</i>	<b>Julius-Maximilians Universität, Würzburg</b> Studium der Humanmedizin Physikum <i>03.2005</i> 2. Ärztliche Prüfung <i>05.2009</i>
<i>10.2002 - 03.2003</i>	<b>Karl-Eberhardts Universität, Tübingen</b> Studium der Biologie

### Schulausbildung

<i>08.1996 - 06-2002</i>	<b>Deutsche Schule Alexander von Humboldt, Mexiko-Stadt</b> Schulbesuch, Abschluss: allgemeine Hochschulreife
<i>09.1993 - 07.1996</i>	<b>Gymnasium Oscar-Paret-Schule, Freiberg/Neckar</b> Schulbesuch