

**Auswirkung des Crosslinking der Kornea mittels UV-A-
Strahlung und Riboflavin auf den intraokularen Druck und
die Ultrastruktur am Vorderkammermodell des Schweins**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Ottmann, Oliver

2015

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter:

Professor Dr. P. Szurman

2. Berichtstatter:

Professor Dr. F. Schaeffel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen	5
1.1.1 Die Kornea	5
1.1.2 Die Kammern des Auges	8
1.1.3 Der Kammerwasserfluss	12
1.2 Der Keratokonus	14
1.2.1 Definition	14
1.2.2 Epidemiologie und Ätiologie	15
1.2.3 Klinik und Diagnostik des Keratokonus	17
1.2.4 Therapieoptionen bei Keratokonus	19
1.3 Crosslinking	20
1.3.1 Definition	20
1.3.2 Funktion und Grundlagen	21
1.3.3 Datenlage, Stand der Forschung	22
1.4 Ziel und Fragestellung der Arbeit	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Reagenzien	26
2.1.2 Geräte	27
2.1.3 Instrumente und Verbrauchsmaterial	28
2.1.4 Software	29
2.1.5 Nährmedien	30
2.1.6 Lösungen	31
2.1.7 Schweineaugen	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Druckmessung Vorderkammermodell	32
2.2.2 Zellkultur Trabekelmaschenwerk	42
2.2.3 Ultrastrukturelle Analyse von Vorderkammerschnitten mittels Elektronenmikroskopie	47
3 Ergebnisse	49

3.1	Druckmessung der Vorderkammer	49
3.1.1	Interventions-Kohorte 1	49
3.1.2	Interventions-Kohorte 2	53
3.1.3	Interventions-Kohorte 3	56
3.1.4	Interventions-Kohorte 4	59
3.1.5	Interventions-Kohorten Gesamt	63
3.1.6	Kontroll-Kohorte 1	64
3.1.7	Kontroll-Kohorte 2	66
3.1.8	Kontroll-Kohorte 3	68
3.1.9	Kontroll-Kohorten Gesamt	70
3.2	Zellkulturen der Vorderkammer	71
3.2.1	Zellkultur aus Trabekelmaschenwerkzellen aus der Druckmessung	71
3.2.2	Zellkultur aus Trabekelmaschenwerkzellen ohne Druckmessung	71
3.3	TUNEL-Färbung	74
3.4	Ultrastrukturelle Analyse und Beschreibung der Vorderkammerschnitte	74
4	Diskussion	78
4.1	Diskussion der Ergebnisse der Methodenvvalidation	78
4.2	Diskussion der Ergebnisse der Druckmessung	79
4.3	Beantwortung der Fragestellung	81
5	Zusammenfassung	82
6	Literaturverzeichnis	84
7	Erklärung zum Eigenanteil	96
8	Danksagungen	96
9	Anlagen	98

Abkürzungsverzeichnis

AAP	angular aqueous plexus; Kammerwasserplexus, Äquivalent des Schlemm'schen Kanals beim Schwein
Cxl	Crosslinking
DAPI-Färbung	4',6-Diamidin-2-phenylindol Färbung
DCT	Dynamic Contour Tonometrie (dynamische Konturtonometrie)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
dpt	Dioptrien (Maß der Brechkraft) $1 \text{ dpt} = 1 \text{ m}^{-1}$
EGF	Epidermal Growth Factor
EM	Elektronenmikroskop/-mikroskopie
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
GAP	Goldmann'sche Applanationstonometrie
ID	Identifikationsnummer
Ig (A)	Immunglobulin (A)
IL- (1)	Interleukin (1)
IS	Interventionssimulation
IOP	Intraocular Pressure (intraokularer Druck)
JCT	Juxtacanalicular Tissue (Juxtakanalikuläres Gewebe)
Kap.	Kapitel
LASIK	Laser-in-situ-Keratomileusis
LED	light-emitting Diode (Leuchtdiode)
Lsg.	Lösung
M	Mol(ar)
min	Minute
ml	Milliliter
mmH ₂ O	Millimeter Wassersäule
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
PBS	phosphate buffered saline

P-Medium	Medium zur Perfusion des Vorderkammermodells (vgl. Kap: 2.1.5.1)
POWG	Primäres Offenwinkel-Glaukom
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute (min^{-1}))
TBS	TRIS buffered saline
TdT	Terminal desoxynucleotidyl transferase
TM	Trabekelmaschenwerk
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL-Methode	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Z-Medium	Nährmedium der Trabekelmaschenwerkzell-Kulturen (vgl. Kap: 2.1.5.2)

1 Einleitung

1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

1.1.1 Die Kornea

Die Kornea ist der transparente, runde Anteil der äußeren Augenhaut. Die Form wird oft als Uhrglas beschrieben [1]. Der Durchmesser beträgt beim Erwachsenen vertikal durchschnittlich zwischen 10 mm bis 11,5 mm und horizontal durchschnittlich 11,5 bis 12 mm [2-5]. Die Kornea ist das stärkste lichtbrechende Medium im optischen Apparat. Die Brechkraft beträgt ca. 40 dpt. Dies entspricht etwa 70 % der Gesamtbrechkraft des Auges von etwa 65 dpt [1, 6]. Die Brechkraft der Kornea ist im Gegensatz zur Linse konstant [4]. Die Dicke der Kornea variiert je nach Lokalisation von ca. 550 µm in der Mitte bis ca. 700 µm in der Peripherie [2, 6]. Ebenso verhält es sich mit dem Krümmungsradius. In der zentralen, optischen Zone liegt der Krümmungsradius bei ca. 8 mm, zur Peripherie hin nimmt er zu [2]. Insgesamt ist die Kornea stärker gekrümmt als die Sklera, in die sie am Rand, dem Limbus cornae, übergeht [1, 4]. In der vertikalen Ebene ist sie stärker gekrümmt als in der horizontalen [1]. Diese Krümmungsradien stehen in direkter Beziehung zur Brechkraft, die sich mit sich änderndem Radius ebenso ändert [6]. Histologisch zeigt sich ein mehrschichtiger Aufbau aus 5 unterschiedlichen Schichten [2, 5]:

- Kornea-Epithel
- Bowman-Membran
- Stroma
- Descemet-Membran
- Kornea-Endothel

Zur Umwelt hin wird die Hornhaut vom Tränenfilm benetzt, zur Vorderkammer hin vom Kammerwasser [2, 3, 5].

Das Kornea-Epithel besteht aus unverhorntem, mehrschichtigem Plattenepithel. Auf der Basalmembran sitzen in einer einfachen Lage Säulenzellen, welche mit

der Basalmembran über Hemidesmosomen verbunden sind. Darauf folgen zwei bis drei Reihen Stachelzellen und zwei Reihen oberflächliche Plattenepithelzellen. Letztere sind mit Mikrovilli und Mikrofalten versehen um die Anlagefläche für die Muzine des Tränenfilms zu vergrößern [5]. Die Zellen sind untereinander mit Desmosomen bzw. tight-junctions verbunden. Dies bildet eine wirksame Barriere gegen das Eindringen von chemischen oder biologischen Noxen [3, 7]. Die obersten Zellen werden am Ende ihrer Lebenszeit durch den Tränenfilm und den Lidschlag abgeschilfert und weggeschwemmt [5]. Die Stammzellen für die Erneuerung des Epithels liegen vermutlich im Limbus, dem Rand der Kornea. Diese spielen auch eine wichtige Rolle wenn es darum geht, ein Einwachsen von Konjunktiva auf die Kornea zu verhindern [5].

Die Bowman-Membran ist eine azelluläre Schicht. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen des Typs I und IV sowie aus Proteoglykanen [1, 2]. Die Vorderfläche bildet die Basalmembran des Epithels [2]. Insgesamt ist die Bowman-Membran aber auch die oberflächlichste Schicht des Stromas [5, 6]. Verletzungen in diesem Bereich heilen nur unter Narbenbildung ab, da diese Schicht keine Regenerationsfähigkeit besitzt [2, 3, 5].

Das Hornhaut-Stroma ist eine ca. 500 µm dicke Schicht aus dicht gepackten Kollagenfasern. Hier findet man die Kollagentypen I, III, V und VII [1]. Die Fasern sind streng parallel angeordnet [1, 6]. In den Zwischenräumen finden sich Grundmatrix und vereinzelt Fibroblasten. Die Fibroblasten sorgen für Nachschub an Kollagenmolekülen, aus denen sich wiederum Kollagenfibrillen und -fasern zusammenlagern [2, 5, 6]. Die Dicke der einzelnen Fibrillen bzw. Fasern beträgt 22,5 nm bis 35 nm und ist sehr gleichmäßig [8]. Die Anordnung der Fibrillen und deren Abstand zueinander sind entscheidend für die hohe Transparenz. Die Grundmatrix aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat sorgt für den Abstand der Fasern, der ca. 41,4 nm ($\pm 0,5$ nm) beträgt [2, 3, 5, 6]. Die Kollagenfasern organisieren sich in schichtförmigen Lamellen, von denen ca. 250-300 parallel zur Oberfläche von Limbus zu Limbus ziehen [1-3].

Die Descemet-Membran besteht vorwiegend aus einem feinen Gitterwerk aus Kollagenfibrillen des Typs IV [3, 5]. Sie besteht aus zwei Zonen: Die vordere, geordnete Zone entwickelt sich in utero. Die hintere, ungeordnete Zone wird zeitlebens von den darunter liegenden Endothelzellen gebildet [5]. Neben Kollagenfibrillen finden sich als weiterer Bestandteil dieser echten Membran noch Glykoproteine [1, 6].

Das Hornhaut-Endothel ist embryologisch betrachtet ein Mesothel, welches nicht regenerationsfähig ist [6]. Es besteht aus einer einlagigen Schicht hexagonaler Zellen. Durch den undichten Zellverband dringt passiv Kammerwasser in das Stroma ein, das zur Ernährung desselben dient [2, 3]. Die wichtigste Aufgabe des Endothels ist das Entquellen der Hornhaut und somit deren Transparenzerhalt durch aktiven Wassertransport aus dem Stroma heraus [4, 5]. Dies geschieht vor allem durch den aktiven Natrium-, Kalium- und Hydrogencarbonat-Transport [2-4]. Die Zelldichte beim Erwachsenen beträgt ca. 2500-3500 Zellen/mm²; da das Endothel nicht regenerationsfähig ist nehmen die verbleibenden Zellen durch Größenzunahme den Platz verlorener Zellen ein [5]. Pro Jahr nimmt die Zelldichte um ca. 0,6 % ab. Wenn zu viele Zellen verloren sind kommt es zu einer Transparenzminderung der Hornhaut durch ein Ödem [5].

Die Innervation der Kornea übernehmen Fasern der Nn. cilliales longi aus dem N. ophthalmicus, dem ersten Ast des V. Hirnnerven, dem N. trigeminus. Die Fasern verlaufen durch die Sklera und treten am Limbus in die Kornea über [1]. Hier existieren ein subepithelialer und ein stromaler Plexus. Die Kornea zählt zu den am dichtesten innervierten Gebieten des menschlichen Körpers [5].

Die Ernährung der völlig gefäßfreien Kornea erfolgt einerseits über das Kammerwasser auf der Innenseite, andererseits über die Schlingennetze skleraler und episkleraler Blutgefäße [1]. Das Kornea-Epithel ist befähigt Sauerstoff aus der Luft [1] bzw. dem mit Sauerstoff gesättigten Tränenfilm aufzunehmen [2, 3].

Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Ernährung, beim Schutz gegen Dehydrierung und der Immunabwehr des Auges bzw. der Kornea. Er wirkt auch mit beim Erhalt der glatten Oberfläche [2, 5]. Der Tränenfilm besteht aus drei Phasen (Lipidschicht, wässrige Schicht, Muzinschicht), die an unterschiedlichen Orten des Tränenapparates gebildet werden [1, 2].

1.1.2 Die Kammern des Auges

Das Innere des Bulbus wird anatomisch in drei Bereiche eingeteilt [1, 5]:

- Vorderkammer
- Hinterkammer
- Glaskörperraum

Die Vorderkammer wird ventral von der Kornea begrenzt, nach dorsal von der Iris bzw. dem Vorderpol der Linse. Die seitliche Begrenzung ist der Kammerwinkel [1].

Die Hinterkammer-Begrenzung nach ventral wird von der Rückseite der Iris gebildet und dorsal von der Grenzmembran des Glaskörpers. Mediale Grenzstruktur ist der Seitenrand der Linse. Seitlich wird die Hinterkammer vom Corpus ziliare begrenzt [1].

Der Glaskörperraum wird, wie der Name suggeriert, vom Glaskörper ausgefüllt. Die dorsale und laterale Begrenzung bildet die Retina. Die ventrale Begrenzung wird durch die Region um den hinteren Linsenpol bzw. durch den Corpus ciliare gebildet [1].

1.1.2.1 Der Kammerwinkel (Angulus iridocornealis)

Der Kammerwinkel ist ein Teil der vorderen Augenkammer, welcher eine große Rolle beim Abfluss des Kammerwassers spielt. Gebildet wird er im spitzen Winkel von der Kornea bzw. dem Limbus und der Iriswurzel [1, 4]. In diesem Winkel liegt stark aufgeflochtenes Bindegewebe, das Trabekelmaschenwerk (TM). Die „freien“ Räume zwischen den Trabekeln nennt man „Fontana-Räume“ [1, 4, 9]. Hinter der Spitze des Winkels liegt der Schlemm'sche Kanal, ein gefäßähnlicher Sammelkanal, der ebenfalls ringförmig in der Sklera um die

Vorderkammer zieht [1, 4, 9]. Der Schlemm'sche Kanal steht über ca. 30 Sammelkanäle mit den Kammerwasservenen in Verbindung [1, 10].

Das Trabekelmaschenwerk lässt sich in drei Regionen einteilen; das innere uveale, das korneosklerale und das äußere endotheliale oder juxtakanalikuläre Maschenwerk [5, 9-12]. Letzteres wird von manchen Autoren auch als cribriformes Maschenwerk bezeichnet [13, 14]. Dieses schließt direkt an das Endothel der inneren Wand des Schlemm'schen Kanals an [5, 9, 11, 12]. Im Bereich der Schwalbe-Linie hat das Trabekelmaschenwerk keinen Anschluss an den Schlemm'schen Kanal. Das dort befindliche Maschenwerk scheint als Nische für stamm- oder progenitorzell- ähnliche Zellen zu dienen, die bei Verletzungen den filtrierenden Teil des TM ersetzen können [15].

Das uveale Maschenwerk reicht vom anterioren Anteil des Ziliarkörpers bzw. der Iriswurzel zur Schwalbe-Linie, dem Übergang zwischen Kornea-Endothel bzw. Descemet-Membran und Sklera. Es besteht aus bis zu drei Lagen Trabekelstrahlen bzw. Lamellen [9]. Das korneosklerale Maschenwerk seinerseits zieht vom Sklerasporn zur Schwalbe-Linie und bildet den größten Teil des Trabekelmaschenwerks [5, 9]. Es bildet ca. 8-15 Trabekellamellen, die insgesamt dicker sind als die des uvealen Maschenwerks [9]. Beide Teile sind ähnlich aufgebaut. Die Trabekelstrahlen bestehen aus einem Kern aus fibrillärem, extrazellulärem Material, welcher mit flachen Trabekelmaschenwerkzellen bedeckt ist [11]. Diese Zellen sitzen auf einer typischen Basalmembran [16, 17] mit den Hauptbestandteilen Laminin und Kollagen Typ IV [18, 19]. Das extrazelluläre Material des Kerns besteht vor allem aus Kollagen Typ I, III [18] sowie elastischen Fasern [20, 21]. Diese Strukturen bilden ein poröses Geflecht, dessen Porengröße im uvealen Teil 25-27 µm und im korneoskleralen Anteil 2-15 µm beträgt [10, 11]. Ein dreidimensionales Geflecht entsteht vor allem dadurch, dass TM-Zellen die intertrabekulären Räume überbrücken und somit zwei Strahlen bzw. Trabekel miteinander verbinden. Erwähnenswert ist ebenfalls, dass die Trabekelmaschenwerkzellen zur Phagozytose fähig sind [22-24]. Naheliegender ist die Vermutung, dass dies eine wichtige Funktion der Selbstreinigung ist [9,

24] um die tieferliegenden kleineren Poren vor Zelldebris und ähnlichem zu schützen [12]. Untermauert wird diese Vermutung dadurch dass im Bereich von Sammelgefäßen vermehrt Pigment in den TM-Zellen zu finden ist. Dies stützt somit die Hypothese, dass es bevorzugte Wege für den Kammerwasserabfluss gibt [25] (vgl. Kap. 1.1.3). Mathematische Berechnungen und experimentelle Studien zeigten, dass der Bereich des uvealen und korneoskleralen Maschenwerks weder für die Generierung noch für eine signifikante Erhöhung des IOP verantwortlich ist [26, 27], da hier kein nennenswerter Widerstand herrscht.

Das juxtakanalikuläre Maschenwerk verbindet das korneosklerale Maschenwerk letztlich mit dem Endothel der inneren Wand des Schlemm'schen Kanals und ist ca. 2-20 µm dick [9]. Juxtakanalikuläres Maschenwerk, Endothel und dessen Basalmembran werden auch als „inner wall region“ (Innenwandbereich) bezeichnet; nicht nur weil das Maschenwerk direkten Kontakt zum Endothel hat, sondern weil diese eine funktionelle Einheit bilden. In diesem Bereich wird der Abfluß des Kammerwassers am stärksten reguliert. [9-12]. Die TM-Zellen des juxtakanalikulären Maschenwerks (JCT) liegen in einer Extrazellulärmatrix (EZM) aus Kollagen Typ I, III, IV, V, VI [18, 28, 29] und weiteren typischen Substanzen wie Laminin, Elastin, Fibronectin und Glykosaminoglykanen wie Hyaluron, Chondroitinsulfat und Keratansulfat [12, 21, 29, 30]. Die TM-Zellen selbst bilden lange Fortsätze durch die sie mit anderen TM-Zellen, der EZM oder dem Endothel des Schlemm'schen Kanals in Verbindung stehen [9, 11]. Ob eine Basalmembran bzw. Basallamina vorhanden ist, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen [12]. Einerseits spricht man ihnen fibroblastenartige Eigenschaften zu, andererseits wurden Bestandteile einer Basallamina (Kollagen Typ IV und Laminin) im JCT entdeckt [12, 29, 31]. Das JCT bildet, im Gegensatz zu dem eher geordneten Trabekelmaschenwerk der anderen Anteile, ein ungeordnetes Netzwerk [9]. Charakteristischer Bestandteil ist das Netzwerk aus elastischen Fasern. Diese sehen ultrastrukturell ebenso aus wie die elastischen Fasern der anderen Teile des TM. Sie besitzen einen Kern aus dichtem Material sowie einen Mantel aus gebändertem Material [14, 20, 21]. Diese Fasern sind tangential zum Endothel

des Schlemm'schen Kanals angeordnet. [32]. Der Mantel der Fasern scheint mit dem Alter dicker zu werden, außerdem findet man in der EZM mit zunehmendem Alter Strukturen, welche als „Plaque“ bezeichnet werden [9, 10, 20]. In der EZM sind auch eine Reihe amorpher Substanzen enthalten wie z.B. Myocillin, das innerhalb des TM sehr häufig vorkommt und dessen Funktion aber noch unklar ist [9, 33].

Der Schlemm'sche Kanal ist ein gefäßähnlicher Kanal, der sich perilimbal um die gesamte Zirkumferenz zieht; einem Gefäß ähnlich vor allem wegen der Endothelzellen, die insbesondere an der Innenwand, einige Charakteristika von Gefäßendothelzellen zeigen [5, 9, 10, 34-36]. Diese Zellen sind längliche, flache, spindelförmige Zellen mit einer zentralen Ausweitung, in welcher der Nukleus liegt und deren Enden abgerundet sind. Die Längsachse der Zellen verläuft parallel zum Kanal. Die Länge beträgt ca. 40-100 µm und die Breite 5-15 µm [10, 35, 36]. Untereinander sind die Zellen mittels tight junctions verbunden [17, 37]. Die Endothelzellen haben keine durchgehende Basalmembran, welches einen entscheidenden Unterschied zum klassischem Gefäßendothel darstellt, das eine durchgehende Endothelschicht mit durchgehender Basalmembran hat [30]. Charakteristisches Merkmal des Endothels des Schlemm'schen Kanals sind die zellulären Ausstülpungen, auch Riesen-Vakuolen genannt [9]. Zwar wirken diese gelegentlich wie intrazelluläre Strukturen, sind aber tatsächlich Ausstülpungen, die ihre Ursache im Druckgradienten im Zusammenhang mit dem Kammerwasserfluss haben [9, 10]. Sie entstehen wenn Kammerwasser an die basale Seite des Schlemm'schen Kanals drückt [38]. In diesem Zusammenhang treten intrazelluläre Poren auf [39]. Befinden sich die Poren an beiden Enden (luminal und abluminal) entsteht ein transzellulärer Kanal. Meist jedoch liegt die Pore nur auf der abluminalen Seite, also der Seite des Trabekelmaschenwerks [10, 40]. Auch werden parazelluläre Poren beschrieben, die sehr wahrscheinlich einen parazellulären Fluss ermöglichen, der bereits von Epstein et al. beschrieben wurde [41]. Außerhalb davon beschränken aber die tight junctions diesen Fluss [42]. Diese Poren lassen Partikel in der Größe 200-500 nm passieren [43]. Nach Johnson et al. hat das Endothel die höchste Wasserleitfähigkeit,

vergleichbar nur mit fenestriertem Endothel [10]. Die Außenwand des Schlemm'schen Kanals ist durch flaches Endothel ausgekleidet, das Öffnungen für die Sammelkanäle enthält. Über diese Sammelkanäle hat der Schlemm'sche Kanal Anschluss an die Kammerwasservenen bzw. die intra- und episkleralen Venen, in die letztlich das Kammerwasser resorbiert wird [5].

1.1.3 Der Kammerwasserfluss

1.1.3.1 Bildung des Kammerwassers, der Ziliarkörper

Bildungsort des Kammerwassers ist der Ziliarkörper. Er besteht aus dem Ziliarmuskel und den Ziliarzotten und hat als weitere Funktion noch die Akkommodation [4]. Weiter wird er in Pars plana und Pars plicata eingeteilt [5]. Der Ziliarkörper dehnt sich von der Ora serrata bis zur Iriswurzel hin aus und verläuft um die gesamte Zirkumferenz. Die Pars plicata enthält nach innen in Richtung Zentrum des Bulbus entspringenden Fortsätze, die Ziliarzotten. Jede dieser Zotten wird begrenzt von zwei Epithelschichten; einer Pigmentepithelschicht, die in das retinale Pigmentepithel übergeht und einer nicht-pigmentierten Epithelschicht, welche sich im Neuroepithel fortsetzt [5]. Die Zotten sind reich an Blutgefäßen; sie enthalten jeweils eine zentrale Arteriole sowie reich verzweigte Kapillarnetze. Diese haben ein fenestriertes Endothel damit Makromoleküle hindurchtreten können [4, 5]. Das pigmentierte Epithel sitzt dem Zottenstroma auf und besitzt hier eine Basalmembran. In Richtung Hinterkammer folgt dann das nicht-pigmentierte Epithel, dessen Basalmembran an der Grenze zur Hinterkammer liegt. Hier strahlen auch die Zonulafasern der Linsenkapsel ein [4]. Die Zellen des nicht-pigmentierten Epithels sind mit tight junctions verbunden und bilden so die Blut-Kammerwasser-Schranke [5]. Neuere Konzepte scheinen dies zu bestätigen, denn es findet sich manchmal ein Proteinprofil im Kammerwasser, das anders nicht erklärbar wäre. Zusätzlich gibt es aber Hinweise darauf, dass die Proteine über Anteile der Iris ins Kammerwasser gelangen und nicht über einen Zusammenbruch der Blut-Kammerwasser-Schranke [44].

Die Produktion des Kammerwassers erfolgt in zwei Schritten [5, 45]:

- Bildung eines Plasmafiltrats im Zottenstroma in Abhängigkeit vom Blutfluss
- Bildung des eigentlichen Kammerwassers durch die Blut-Kammerwasser-Schranke hindurch

Der Mechanismus ist überwiegend ein aktiver Transport durch das nicht-pigmentierte Epithel. Hier spielen v. a. Carboanhydrasen und Na^+/K^+ -ATPasen eine Rolle. Durch den aktiven Na^+ Transport z. B. folgt Wasser aus dem Stroma in die Hinterkammer. Es kommt auch zu passiven Transporten durch Diffusion und Ultrafiltration, was jedoch kaum eine Rolle spielt. Der aktive Transport ist dabei nicht vom IOP abhängig [5, 45]. Der Zufluss beträgt ca. 2 $\mu\text{l}/\text{min}$; bei einem Gesamtvolumen von ca. 300 μl wird also der Gesamteinhalt der beiden Kammern alle 2-3 h getauscht [1, 45]. Dies unterliegt aber auch einer zirkadianen Rhythmik bei der am Morgen mehr und gegen Abend bzw. nachts weniger Kammerwasser produziert wird [45]. Im Gegensatz zur Tränenflüssigkeit enthält das Kammerwasser keine Laktoferrine oder ähnliches. Der Glukosegehalt liegt bei ca. 2,42 mmol/l und dient der Ernährung der Linse, des Kornea-Endothels und Teilen des Stromas. Die im Kammerwasser enthaltenen Elektrolyte sind plasmaisoton. [6]

1.1.3.2 Kammerwasserfluss durch die Kammern

Nach Sekretion des Kammerwassers in die Hinterkammer fließt dieses an den Zonulafasern vorbei durch die Pupille in die Vorderkammer. Der Abfluss geschieht über zwei Wege:

- trabekulärer Weg
- uveoskleraler Weg

Über den trabekulären Weg werden in Abhängigkeit vom Alter ca. 85-90 % des Kammerwassers abgeleitet, über den uveoskleralen ca. 10-15 %. Beim uveoskleralen Weg wird das Kammerwasser über die Uvea resorbiert; dieser Weg hat aber auf den IOP, außer bei der Behandlung des Glaukoms, kaum

einen nennenswerten Effekt, [9, 10]. Die weitaus wichtigere Rolle in der Regulation des IOP spielt der trabekuläre Weg. Hier wird letztlich das Gleichgewicht zwischen Kammerwasserproduktion und Abfluss geregelt und darüber auch der IOP. Hauptsächlich scheint hierfür der Bereich der Innenwand des Schlemm'schen Kanals dessen Basalmembran zusammen mit dem juxtakanalikulären Gewebe verantwortlich zu sein [10-14, 30, 41]. Im gesunden Auge stehen, wie schon erwähnt, Produktion und Abfluss im Gleichgewicht und der Abfluss geschieht aufgrund eines Druckgradienten [9-11]. Im Alter und bei bestimmten Glaukom-Formen (Offenwinkelglaukom) steigt der Abflusswiderstand innerhalb des Trabekelmaschenwerkes und somit der IOP [46-48]. Die Produktion von Kammerwasser jedoch wird kaum beeinflusst, außer durch die Einwirkung von Medikamenten oder zyklodestruktiven Methoden als Therapieansatz beim Glaukom, sowie bei Erkrankungen wie Entzündung. Bei allen der genannten Situationen kommt es zu einer Reduktion der Kammerwasserproduktion [5, 45].

1.2 Der Keratokonus

1.2.1 Definition

Der Keratokonus ist eine meist bilaterale, nicht-entzündliche Ektasie der Kornea [49]. Gekennzeichnet ist diese Erkrankung durch eine kegelförmige Vorwölbung der Kornea und Ausdünnungen im Stroma [49-51]. Die Erkrankung ist häufig progredient, irreversibel und meist asymmetrisch [52, 53]. Der hierdurch entstehende irreguläre Astigmatismus und die Myopie führen im Verlauf der Erkrankung zu einer vorschreitenden Sehverschlechterung, die meist als sehr einschränkend auf die Lebensqualität empfunden wird [54, 55]. Durch Einrisse in der Descemet-Membran und dadurch folgender Endothelschädigung kann es zu Hornhautödemen mit entsprechender weiterer Sehverschlechterung und Schmerzen kommen. Diesen Zustand wird auch akuter Keratokonus genannt [56]. Das Endstadium der Erkrankung, die Hornhaut- bzw. Bulbusperforation ist nur in Einzelfällen bekannt [57-59]. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der Progress der Erkrankung mit zunehmendem Alter nachlässt und ab dem vierten Lebensjahrzehnt meist stagniert [49, 60, 61]. Insgesamt verläuft die Erkrankung

sehr variabel und reicht von geringstem Astigmatismus bis zu maximaler Seheinschränkung, teilweise auch mit Schmerzen [54, 62].

1.2.2 Epidemiologie und Ätiologie

Betroffen sind zumeist jüngere Patienten. Manifestationsalter ist meist das zweite Lebensjahrzehnt, der Beginn scheint in der Pubertät zu liegen. Die Altersangaben des Erkrankungs-Gipfels in der Literatur schwanken zwischen dem 17. und 49. Lebensjahr, aber auch von deutlich jüngeren und älteren Fällen ist berichtet [49, 50, 52, 62]. Die Erkrankung ist meist bis in das vierte Lebensjahrzehnt progredient und stabilisiert sich dann häufig [49]. Die Inzidenz wird mit 1 zu 2000 in der Normalbevölkerung angegeben [49, 63]. Die Prävalenz wird mit 54,5 pro 100000 beziffert [49]. Beide Geschlechter sind gleichhäufig betroffen [52]. Aber auch eine erhöhte Prävalenz jeweils für Frauen [64] oder Männer [65] ist je nach Studie beschrieben.

Bezüglich der Ätiologie werden verschiedene Aspekte diskutiert, letztlich ist diese aber nicht geklärt. In Betracht kommen unter anderem genetische, biochemische sowie biomechanische Aspekte und die Assoziation mit anderen Erkrankungen.

So wurden bei Untersuchungen der Strukturelemente, Kollagenen und Proteoglykanen Unterschiede und Verminderungen zwischen normaler Kornea und derjenigen bei Keratokonus entdeckt. [51, 62, 66, 67]. Weiter wird bei den biochemischen Faktoren eine Enzymveränderung bzw. eine Veränderung der Aktivität proteolytischer und lysozymaler Enzyme [68-71], sowie ein Mangel an Proteinase-Inhibitoren diskutiert [68, 69, 71]. Gegenstand von Diskussion ist auch die Tatsache, dass die Keratinozyten der Kornea bei Keratokonus mehr Interleukin-1 Rezeptoren besitzen. Interleukin-1 (IL-1) regelt v. a. die Proliferation und Apoptose sowie die Differenzierung der Keratinozyten. Da bei Mikrotraumen vermehrt IL-1 freigesetzt wird, wird die Entstehung des Keratokonus auch mit vermehrtem Augenreiben z. B. beim Tragen von Kontaktlinsen und atopischer Diathese in Verbindung gebracht [3, 72-74]. Letztlich ist aber unklar, ob dies lediglich die Manifestation bei Prädilektion beschleunigt oder tatsächlich ursächlich bzw. ein Risikofaktor ist. Ein weiterer

Faktor, insbesondere für das Fortschreiten der Erkrankung, ist die oxidative Schädigung. So weisen von Keratokonus befallene Korneae einen niedrigeren Spiegel an Superoxiddismutase und Aldehyddehydrogenase 3 auf. Das deutet darauf hin, dass oxidativer Stress im Gewebe nicht mehr richtig bewältigt werden kann [75, 76]. Ebenso wurden eine Reihe anderer Enzyme identifiziert, die erhöht bzw. erniedrigt sind und so oxidativen Stress erzeugen [77, 78].

In der Diskussion stehende biomechanische Faktoren sind u. a. durch die vorgenannten Veränderungen ebenfalls veränderten Kollagenlamellen der Kornea [79]. Insbesondere deren verminderte Dicke und veränderte Anordnung [51, 80] sowie die Degradation der Fibroblasten [81] werden als Vorstufe angesehen bzw. als Ursache für den weiteren Progress der Erkrankung [80]. So fiel auch der Arbeitsgruppe um Morishige et al. auf, dass beim Keratokonus weniger Verankerungen der Kollagenlamellen mit der Bowman-Membran sowie weniger Verflechtungen der Kollagenlamellen untereinander zu finden sind [82]. Ebenso wurde eine Veränderung an der Bowman-Membran selbst diskutiert [83], konnte hier aber nicht eindeutig als Ursache nachgewiesen werden. Der Gesamtkollagengehalt scheint beim Keratokonus nicht vermindert, die Festigkeit der Kornea jedoch ist um den Faktor 0,7 geringer [84, 85]. Die Reduzierung der Vernetzung in der Tertiär- und Quartärstruktur des Kollagens und zwischen den Kollagenmolekülen scheint also ein Hauptfaktor der Erkrankung zu sein [86].

Die Assoziation mit verschiedenen Erkrankungen wie Down-Syndrom, Ehlers-Danlos-Syndrom und auch Mitralklappenprolaps sowie weiteren Erkrankungen wurde herausgearbeitet [87-90]. So haben Patienten mit Down-Syndrom ein 10-300fach erhöhtes Risiko an einem Keratokonus zu erkranken [91].

Eine genetische Prädisposition wurde unter anderem von Wang et al. untersucht, der herausfand, dass Verwandte von Patienten mit Keratokonus eine bis zu 68fach höhere Prävalenz für einen Keratokonus haben; führend waren hier die Geschwister [92]. In vielen Studien wurden unterschiedliche mit dem Keratokonus assoziierte Genloci beschrieben [92-96]. Hier wurde nur ein Teil der zur Verfügung stehenden Quellen benannt, eine Suchanfrage mit dem

Begriff „keratoconus genetics“ bei PubMed erbrachte am 20.08.2014 359 Quellen.

Als protektiv zeigt sich aber das Vorhandensein eines Diabetes mellitus. Dieser führt durch Glykosilierung des Kollagens zu einer Stagnation bzw. zur Protektion vor einer Keratokonusentstehung [97-99].

1.2.3 Klinik und Diagnostik des Keratokonus

Die Symptome des Keratokonus hängen stark vom Stadium der Erkrankung ab und sind wie eingangs schon beschrieben sehr variabel. Im Frühstadium bemerken meist weder Patient noch Arzt den Keratokonus, es sei denn es wird eine Hornhauttopographie durchgeführt [100]. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer Sehverschlechterung durch Myopie und irregulären Astigmatismus, die mit Brille nur schlecht ausgleichbar ist [55].

Diagnostische Hinweise sind das „Charleux oil drop sign“ das bei der Spaltlampenuntersuchung im regredienten Licht sichtbar sein kann [49]. In der Skiaskopie kann das Auftreten des so genannten Scherenschattens ein Hinweis sein [101]. Bei fortgeschrittenen Fällen sieht man häufig den s.g. „Fleischer Ring“, eine Ablagerung von Hämosiderin die meist bogen- bzw. ringförmig um den Konus läuft [49]. Des Weiteren kommt es zum Auftreten von „Vogt-Linien“ als Zeichen von Stress und Überdehnung der Hornhaut. Dabei handelt es sich um feine Linien im tiefen Stroma und der Descemet-Lamelle. Diese verlaufen parallel zur Achse des Keratokonus. Auf Druck verschwinden die Linien [49, 64]; im weiteren Verlauf können Trübungen der Kornea und das Sichtbarwerden von Hornhautnerven auftreten [49, 64]. Typisches indirektes Zeichen ist das s.g. „Munson'sche Zeichen“. Dabei kommt es zu einer v-förmigen Auswölbung des Unterlids wenn der Patient mit Keratokonus herabschaut. Ein weiteres indirektes Zeichen ist das „Rizutti- Zeichen“: hier wird bei Beleuchtung von temporal, seitlich ein scharf begrenzter Lichtbalken auf den Bereich des nasalen Limbus projiziert. Je weiter der Keratokonus fortschreitet desto weiter entfernt vom Limbus ist der Lichtbalken sichtbar [49, 101]. Einen großen Stellenwert in der apparativen Diagnostik und der

Früherkennung hat die Hornhauttopographie. Diese wird meist mit Placidoscheiben-basierten Keratographen durchgeführt. Aber auch Verfahren wie die optische Kohärenz-Tomographie, die Scheimpflugphotographie bzw. -topographie oder die Wellenfrontanalyse haben einen diagnostischen Wert [49, 100-103]. Auf den Ergebnissen dieser Methoden, insbesondere der Videokeratographie wurden verschiedene Indizes entwickelt um die Erkrankung klassifizieren zu können. Häufig kommt der KISA%-Index zum Einsatz, welcher phänotypische Erscheinungen topographisch quantifizieren kann [104]. In vielen Studien wird als Maß des Keratokonus auch der K-Wert, die Korneabrechkraft, genutzt da diese wie schon erwähnt direkt mit der Krümmung zusammenhängt [5, 62]. Ebenso wird der inferior-superiore Brechwertindex (I-S-Wert) genutzt, bei dem aus der Differenz der gemittelten Brechwerte der unteren und oberen Kornea-Hemisphäre ein Wert gebildet wird [105]. Auch bei der Klassifizierung gibt es mehrere Möglichkeiten. Unter anderem das System nach Amsler, das nach Krumeich modifiziert wurde. Bei diesem geht der Grad der Hornhauttopographie, Myopie bzw. Astigmatismus, klinische Symptome, zentrale Korneanarben und die Hornhautdicke ein [106-109]. Ein international einheitliches Klassifikationssystem gibt es nicht, aber insbesondere die Krumeich-Klassifikation ist in Deutschland häufig genutzt [101, 107]:

- Stadium 1: exzentrische Versteilung der Hornhaut, induzierte Myopie bzw. Astigmatismus ≤ 5 dpt, Hornhautradien ≤ 48 dpt, Vogt-Linien, keine Narben
- Stadium 2: Induzierte Myopie bzw. Astigmatismus > 5 dpt ≤ 8 dpt, Hornhautradien ≤ 53 dpt, Hornhautdicke ≥ 400 μm , keine Narben
- Stadium 3: Induzierte Myopie bzw. Astigmatismus > 8 dpt ≤ 10 dpt, Hornhautradien > 53 dpt, Hornhautdicke 200-400 μm , keine Narben
- Stadium 4: Refraktion nicht messbar, Hornhautradien > 55 dpt, Hornhautdicke 200 μm , zentrale Narben

1.2.4 Therapieoptionen bei Keratokonus

Die Therapie des Keratokonus erfolgt abhängig vom Stadium in mehreren Stufen. Von der jeweiligen Stufe ist auch die Invasivität der Therapie abhängig. Vorrangiges Ziel ist der Erhalt bzw. die Wiederherstellung der Sehleistung bzw. in neuerer Zeit mit neuen Therapiemethoden auch der frühe Stopp der Progression [110].

Im Anfangsstadium der Erkrankung kann die Sehverschlechterung meist noch durch Brillen ausgeglichen werden. Wenn die Astigmatismuskomponente an Bedeutung gewinnt, ist eine der ersten Optionen der Einsatz von Kontaktlinsen. Diese gleichen den Astigmatismus aus und sind in mannigfaltigen Varianten erhältlich. Bei den niedrigen Stadien reichen meist weiche, torische Linsen. Bei fortschreitender Verformung kommen dann sauerstoffdurchlässige, starre Linsen oder Huckepacksysteme bei denen die harte Linse auf die weiche aufgesetzt werden, zum Einsatz [50, 108, 110].

Chirurgisch können, je nach Krankheitsstadium, mehrere Verfahren zum Einsatz kommen. Bei einem Teil der Patienten kann mit intrakornealen Ringsegmenten die Sehleistung bzw. die Akzeptanz der Kontaktlinsen verbessert oder aber die Zeit bis zur Keratoplastik hinausgezögert werden [106]. Diese Ringsegmente aus Polymethylmetacrylat werden in das Korneastroma implantiert und können die Form korrigieren. Ursprünglich wurden diese zur Therapie von extremer Myopie entwickelt [106, 111-113]. Aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen hat sich der Einsatz der „Intacs“ in Deutschland nicht durchgesetzt. Weitere Option ist das korneale Crosslinking mit Riboflavin und UV-A Licht, auf das im nächsten Kapitel näher eingegangen werden soll (vgl. Kap. 1.3). Dies ist die Therapieoption die, im Gegensatz zu den vorgenannten Optionen, den Progress der Erkrankung aufhalten kann. Invasivste Methode ist die Keratoplastik. Diese wird entweder als lamelläre oder als perforierende Keratoplastik durchgeführt, es existieren aber auch reichlich Modifikationen z. B. mit dem Femto-Sekunden Laser [110]. Die Keratoplastik gilt als letzte Option in der Behandlung des Keratokonus [112]; Unter anderem weil der Keratokonus meist jüngere Patienten trifft und die Transplantate von älteren Patienten mit veränderten Zelleigenschaften, insbesondere im

Endothelbereich, stammen und deren Lebenszeit begrenzt ist. Dies macht häufig weitere Transplantationen nötig [109]. Auch die postoperative Phase birgt bekanntermaßen Risiken, insbesondere von Infektionen, Wundheilungsstörungen, Astigmatismus, Transplantatabstoßung, etc. [62, 109, 110]. Ungefähr 19 % der Patienten mit Keratokonus benötigen eine Keratoplastik [52]. Hierbei gilt der Keratokonus als führende Indikation für eine perforierende Keratoplastik [114, 115]. Die 10-Jahres Überlebensrate des Transplantats liegt mit 92% erfreulich hoch, das Gesamtüberleben des Transplantates wird auf 20-25 Jahre geschätzt, in dieser Zeit sind noch 94 bzw. 86 % der Transplantate intakt [116]. Ein Wiederauftreten des Keratokonus in der transplantierten Kornea ist möglich und berichtet, insgesamt aber sehr selten [62, 108].

1.3 Crosslinking

1.3.1 Definition

Als Quervernetzung oder Crosslinking (Cxl) (auch X-linking) bezeichnet man ein Verfahren bzw. einen Vorgang bei dem zwischen spannungstragenden Molekülketten eines Gewebes neue Verbindungen geschaffen werden. Hierdurch ändern sich die biomechanischen und biochemischen Eigenschaften. Es kommt quasi zu einer Alterung des Gewebes. Der Mensch macht sich dies schon seit Jahrtausenden beim Gerben von Leder zu Nutze [117]. Auch im technischen und biologischen Bereich werden seit langem Verfahren der Polymerisation zur Festigung von Materialien eingesetzt. Aber auch im medizinischen Bereich, v. a. in der Zahnheilkunde und teilweise in der HNO, kommen solche Verfahren zum Einsatz [55, 117, 118]. Der medizinische Einsatz bezieht sich auf eine Verwendung an Bindegewebe und hier vor allem auf die Kollagenfasern. Die Quervernetzung kommt im Wesentlichen durch drei verschiedene Arten zustande: durch enzymatische bzw. chemische Vernetzung, durch natürliche Alterung und durch Oxidation bzw. Photo-Oxidation [55, 117, 119, 120].

1.3.2 Funktion und Grundlagen

1.3.2.1 Kollagenquervernetzung mit Riboflavin und UV-A Licht

Bei dieser Therapie wird das Auge mit UV-A Licht mit der Wellenlänge $\lambda = 370 \text{ nm}$ bestrahlt. Dies führt in Verbindung mit Riboflavin (Vitamin B2), einem nicht toxischen, wasserlöslichen Vitamin, zu einer photooxidativen Reaktion. Dabei entstehen Singulett-Sauerstoff und weitere freie Radikale. Insbesondere der Singulett-Sauerstoff reagiert mit Aminogruppen aus der Seitenkette des Kollagenmoleküls. Dies führt zu einer oxidativen Desaminierung. Hierdurch entstehen neue, sowohl intra- als auch interfibrilläre, zusätzliche Querverbindungen [121]. Diese Reaktion führt letztlich zu einer „Versteifung“ der Kornea, sprich zu einer erhöhten Festigkeit bzw. Biegefestigkeit und Erhöhung des Elastizitätsmoduls [108, 119, 121, 122].

Insbesondere das Riboflavin hat wichtige Aufgaben. Es erzeugt nicht nur den Singulett-Sauerstoff, sondern kann diesen auch wieder abfangen. In hoher Konzentration wirkt Riboflavin als Radikalfänger [119]. Des Weiteren ist die Absorption der UV-Strahlung ein weiterer wichtiger Faktor um Schäden an Linse, Glaskörper und Retina aber auch Kornea-Endothel zu verhindern. Nach dem 1. Gesetz der Photochemie wird Energie nur an der Stelle der Absorption abgegeben.

Damit das Riboflavin im Stroma der Kornea eine optimale Sättigung erreicht, hat sich eine zentrale Epithelabrasio und eine Einwirkzeit von 30 Minuten, wegen des Molekulargewichtes von Riboflavin von 376 g/mol , vor Beginn der Bestrahlung als günstig erwiesen. Die optimale Konzentration wird mit $0,1 \%$ Riboflavin angegeben. Ein erhöhter Riboflavinanteil bringt keine vermehrte Singulett-Sauerstoffproduktion. Die eigentliche Bestrahlungszeit ist im Dresdner Protokoll mit 30 Minuten angegeben [62]. Während der Bestrahlung wird in regelmäßigen Abständen Riboflavin nachgetropft. Die Bestrahlungsintensität liegt bei 3 mW/cm^2 bzw. die Gesamtstrahlung bei $5,4 \text{ J/cm}^2$. Bestrahlt wird hierbei der zentrale Bereich der Kornea [63, 108, 117, 119, 121]. Für das genaue Vorgehen während der Behandlung sei auf das Kapitel Methoden verwiesen (vgl. Kap. 2.2.1.3.3.1), in dem dies beschrieben ist. Es erfolgt bei der

Anwendung am Menschen eine Anästhesie, meist in Form einer Tropfanästhesie.

1.3.3 Datenlage, Stand der Forschung

1.3.3.1 Erfolgsraten und Sicherheit

Das Verfahren wird seit ca. 1998 angewendet. Seitdem haben sich schon reichliche Arbeiten und Studien mit der Thematik der Wirksamkeit und insbesondere der Sicherheit auseinandergesetzt. Vor allem die Frage nach der Wirksamkeit wird immer wieder untersucht. Die ersten Ergebnisse am Menschen wurden 2003 durch Wollensak et al. Veröffentlicht; hier konnte in allen Fällen ein Stopp der Progression und bei 70% der behandelten Patienten sogar eine Reduktion des Keratokonus erreicht werden [123, 124]. Weitere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen; auch wenn sich die jeweiligen Methoden und Kriterien der Studien unterscheiden zeigen sie alle, dass das Fortschreiten des Keratokonus aufgehalten und teilweise auch ein Rückgang der Ektasie erreicht werden konnte [125-130]. So haben Hoyer et al. 2009 eine Studie veröffentlicht in der die Ergebnisse in Dresden ausgewertet wurden. Hier konnte bei n=153 Augen von 111 Patienten ein Rückgang der Keratektasie gezeigt werden. Lediglich bei drei Patienten kam es zu einem Progress des Keratokonus [62].

Bevor das Verfahren am Menschen zur Anwendung kam wurden, insbesondere durch die Arbeitsgruppe um Wollensak et al., umfangreiche in-vitro und in-vivo Tests an humanen und tierischen Korneae durchgeführt. In mehreren Testreihen konnte die Wirkung der Behandlung und die darauf folgende Verfestigung der Kornea gezeigt werden. Da sich dies aber nicht durch Färbemethoden o. ä. direkt zeigen lässt wurden physikochemische Eigenschaften untersucht, die durch die Vernetzung beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass die behandelte Kornea um den Faktor 1,8 fester ist [122, 131]. Des Weiteren erhöhte sich die Schrumpfungstemperatur nach der Behandlung mit Riboflavin und UV-A [132]. Die Quellrate der Kornea war nach der Behandlung verringert. Das eröffnete weitere Therapieoptionen (vgl. Kap. 1.3.3.2) [133]. Bei Kaninchen-Korneae konnte eine Dickenzunahme der

Kollagenfasern gezeigt werden, die im anterioren Stroma ca. 12% betrug [134]. Ebenfalls konnte eine erhöhte Resistenz gegen enzymatische Abbauprozesse durch z. B. Kollagenasen gezeigt werden. Das führte auch zu einer längeren turn-over Zeit des Kollagens [135]. Nicht zuletzt konnte außerdem gezeigt werden, dass es zur Bildung von Molekülaggagaten mit einem erhöhten Molekulargewicht kommt. Das spricht für eine größere Vernetzung nach der Behandlung [136].

Bezüglich der Sicherheit, insbesondere der empfindlichen Strukturen wie Retina oder dem Kornea-Endothel, konnte gezeigt werden, dass mit der eingesetzten Riboflavinkonzentration und den entsprechenden Zeiten der Einwirkung und Bestrahlung keine Schäden an diesen Strukturen auftreten. So wird in einer 400 µm dicken, mit Riboflavin gesättigten Stromaschicht 94 % des eingestrahlten UV-A Lichtes resorbiert. Somit kommen am Endothel nur 0,18 mW/cm² Strahlung an. Das liegt weit unter der tierexperimentellen Schädigungsschwelle von 0,65 mW/cm² [137, 138]. Zwar gehen nach der Behandlung im Stroma die Keratinozyten zugrunde, aber nur bis in eine Tiefe von 300-350 µm. Dahinter erreicht das UV-A Licht bzw. der photooxidative Effekt keine zytotoxische Dosis mehr [139]. In einer Nachuntersuchung von behandelten Patienten konnten Mazzotta et al. herausfinden, dass das Stroma nach ca. 2-3 Monaten wieder von Keratinozyten besiedelt wird und nach ca. 6 Monaten wieder komplett hergestellt ist [140]. Eine Endothelschädigung konnte weder von Mazzotta et al. noch von Caporossi et al. festgestellt werden [141, 142]. Die Ausleuchtung muss gleichmäßig, homogen erfolgen um zum einen eine gleichmäßige Energieverteilung zu erhalten und zum anderen lokale Überbestrahlung durch so genannte „hot spots“ mit entsprechenden Schäden zu vermeiden [137]. Hierzu sind spezielle Lichtsysteme, meist mit LED-Technik, erhältlich, die dies ermöglichen.

1.3.3.2 Weitere Indikationen

Nicht nur im Rahmen des Keratokonus wurde das Cxl bereits untersucht, sondern auch bei anderen Keratoektasien wie z. B. bei der iatrogenen Keratektasie nach LASIK Behandlung [100, 143, 144]. Ein weiteres untersuchtes Anwendungsgebiet ist die bullöse Keratitis, bei der das Konzept

der veränderten Quellungseigenschaften nach Cxl zum Tragen kommt (vgl. Kap. 1.3.3.1) und somit ein Ödem vermindert werden kann [136, 145, 146]. Es existieren auch Berichte über den erfolgreichen Einsatz bei Keratitiden infektiöser Genese [147, 148] und entsprechende in-vitro Untersuchungen [145, 149, 150]. Hier sind aber noch weitere Untersuchungen nötig, insbesondere um zu klären, auf welchem Mechanismus die Wirkung beruht [61]. Ebenfalls erfolgreich wurde das Cxl bei einschmelzenden Korneaprozessen zum Einsatz gebracht [151]. Da das UV-Licht letztlich auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzt gibt es Untersuchungen und Überlegungen zu dessen Einsatz zur Vorbereitung von Spender-Korneas vor der Transplantation, um deren Überlebenschancen zu verbessern [152].

1.3.3.3 Kontraindikationen, Komplikationen und Risiken

Ausgehend von den Untersuchungen von Spörl et al. ist eine zentrale Korneadicke < 400 µm eine Kontraindikation für ein Cxl [137]. Da in fortgeschrittenen Stadien dies recht häufig vorkommt, versuchte Hafezi et al. dies mit Riboflavin in hypoosmolarer Lösung zu umgehen. Diese hypoosmolare Lösung ließ die Kornea quellen, so dass letztlich doch ein Cxl im sicheren Bereich durchgeführt werden konnte. Die 20 Patienten der Publikation konnten so ohne Komplikationen behandelt werden [153]. In mehreren Berichten kam es zu klinisch relevanten Korneatrübungen variabler Ausprägung, die jedoch meist reversibel waren, wenn dies auch bis zu einem Jahr gedauert hatte [129, 154, 155]. Die Fälle traten in Zusammenhang mit fortgeschrittenen Formen und großer Korneawölbung auf, so dass dies letztlich als Risikofaktor für das Auftreten der Trübung gesehen wird. Zu einer permanenten Sehverschlechterung kam es in dem Bericht von Koller et al. bei 2,9% der Patienten [156]. Als weitere Komplikation sind Keratitiden beschrieben, die aber wahrscheinlich postoperativ durch das eröffnete Epithel bzw. durch schlechte Hygiene der Verbandlinsen entstanden [157-159].

Kymionis et al. berichteten 2010 über eine Nachkontrolle bei Patienten nach Cxl, bei der eine signifikante Erhöhung des IOP nach 6 Monaten und 12 Monaten festgestellt wurde [160]. Auch Goldich et al. führten Nachkontrollen nach 1 Woche, 1 Monat, 3 Monaten und 6 Monaten postoperativ durch und

verglichen dabei noch verschiedene Messmethoden; auch hier zeigten die Messungen einen leicht erhöhten IOP nach CxI, der jedoch in der 6 Monats-Kontrolle an Signifikanz verlor [161]. In der Untersuchung von Sedagat et al. war der IOP anfangs erhöht, kehrte aber in der 6-Monats-Kontrolle auf die Baseline zurück [162]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen die Untersuchungen von Caporossi et al. und Raiskup-Wolf et al. [129, 163].

1.4 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Basierend auf der Tatsache, dass der Keratokonus meist junge Patienten trifft und diese nach momentaner Datenlage sehr von der Behandlung mit CxI profitieren, ist ein detailliertes Wissen über Probleme, Komplikationen und Folgen dieser Behandlung sehr wichtig. Ausgehend von den Ergebnissen von Kymionis et al. und der unklaren Studienlage bzw. differierenden Ergebnissen, sollte dies näher untersucht werden. Eine IOP Erhöhung im Langzeitverlauf kann zu Glaukom und Visusverlust führen. Bereits Kymionis et al. schlossen auf einen möglichen Messfehler der Applanationsmessung durch die veränderte Kornea [160]. Diesen Schluss lässt auch die Arbeit von Romppainen et al. zu [164].

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden ob sich tatsächlich eine Erhöhung des IOP nach CxI nachweisen lässt. Dafür wird der Druck direkt intraokular am validierten Perfusionsmodell nach Johnson und Tschumper gemessen [165, 166] und die Werte vor und nach CxI verglichen. Um beurteilen zu können ob es zu morphologischen Veränderungen kommt und um die Validität der Druckdaten beurteilen zu können, wird -wie auch von Pang et al. vorgeschlagen- [166] eine Analyse der Ultrastruktur aus einem Teil der Vorderkammern durchgeführt. Hierbei liegt die Aufmerksamkeit auf den wesentlichen Teilen des IOP Widerstandes, dem juxtakanalikulären Maschenwerk und dem inneren Endothel des Schlemm'schen Kanals. Zeitgleich werden mittels Zellkultur aus Trabekelmaschenwerkzellen und einer TUNEL-Färbung die Methode selbst überprüft. Die Untersuchungen werden am validierten Tiermodell Schwein durchgeführt [167, 168].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Absolutes Ethanol, Merck Darmstadt

Amphotericin B, Fa. Gibco Carlsbad USA

Bleicitrat, Fa. Merck Darmstadt

Braunol Polyvidon-Iod Lösung, Fa. B.Braun Melsungen

Cacodylatpuffer 0,1 M pH 7,4, Fa. Carl Roth Karlsruhe

Descosept AF, Fa. Dr.Schumacher GmbH Malsfeld-Beiseförth

Dextran 500 für die Biochemie, Fa. Carl Roth Karlsruhe

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), Fa. Gibco Carlsbad USA

Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS) 1x ohne Ca und Mg, Fa. PAA Pasching Österreich

Fötale Kälber Serum (FCS), Fa. Gibco Carlsbad USA

Gentamicin, Fa. Gibco Carlsbad USA

Glycidether 100 (Epon), Fa. Carl Roth Karlsruhe

Glutaraldehyd 25%; Fa. Carl Roth Karlsruhe

In-situ Cell Death Detection Kit TMR Red (TUNEL-Kit) Vers. April 2006, Fa. Roche Basel Schweiz

Osmiumtetroxid 1%, Fa. Carl Roth Karlsruhe

Penicillin-Streptomycin Liquid, Fa. Gibco Carlsbad USA

Propylenoxid, Fa. Merck Darmstadt

Riboflavin Pulver für die Biochemie, Fa. Carl Roth Karlsruhe

Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA), Fa. Gibco Carlsbad USA

Tris-bufferd saline (TBS), Fa. PAA Pasching Österreich

Uranylacetat, Fa. Carl Roth Karlsruhe

2.1.2 Geräte

Acryl-Kammer für Perfusionsschalen, feinmechanische Werkstatt der Universitäts-Augenklinik Tübingen

Biocenter 2001, Fa. Salvis Rotkreuz Schweiz

Biological safety cabinet, Fa. Thermo scientific/Kendro Waltham USA

Blende aus Karton, Eigenbau

Clean bench DVF6.12, Fa. Thermo scientific/BDK Waltham USA

Elektrische Pipettierhilfe „accu jet pro“, Fa. Brand Wertheim

Elektronenmikroskop Modell 902A, Fa. Carl Zeiss Jena

Fixationsring Edelstahl für Perfusionskammer, Feinwerkstatt der Universitäts-Augenklinik Tübingen

Fixationsschrauben Edelstahl für Perfusionsschale, Feinwerkstatt der Universitäts-Augenklinik Tübingen

Heraeus BBD 6220 Inkubator, Fa. Thermo scientific/Heraeus Waltham USA

Heraeus LUT 6050 Wärmeschrank, Thermo scientific/Heraeus Waltham USA

Kunststoff-Überlaufschale für Perfusionskammer, Feinwerkstatt der Universitäts-Augenklinik Tübingen

Laminar flow bench, Fa. Prettl Pfullingen

Magnetrührer Jenaway 1100, Fa. Keison Products Chelmsford UK

MicroSwitch 142PC01G Drucksensoren, Fa. Honeywell Morristown USA

Mikroskop Nikon TMS, Fa. Nikon Chioda Tokyo Japan

Mikroskop stemi SV11, Fa. Carl Zeiss Jena

Mikroskop Axioplan2 imaging, Fa. Carl Zeiss Jena

Neubauer-Zählkammer

Perfusor segura, B.Braun Melsungen

Perfusionsschalen nach Johnson und Tschumper [165], Feinmechanische Werkstatt Universitäts-Augenklinik Tübingen

Pipetten (200 µl, 1000 µl), Fa. Eppendorf Hamburg

Radiometer RM 12 + UV-A Sensor, Fa. Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH Ettlingen

Sellamed 1200/200 UV-A Strahler, Fa. Sellas medizinische Geräte GmbH Ennepetal

Valitec Data Ready AD128 Datalogger, Fa. Transcat Inc., Rochester USA

Waage AND EK600-H, Fa. Midland scientific Omaha USA

Waage LA 120-S OCE, Fa. Sartorius Göttingen

Wasserbad, Fa. GFL Burgwedel

Zentrifuge Multifuge 3 S-R, Fa. Heraeus Hanau

2.1.3 Instrumente und Verbrauchsmaterial

Anatomische Pinzette klein, Fa. Aesculap Tuttlingen

Chirurgische Pinzette klein, Fa. Aesculap Tuttlingen

Corning Costar Stripette serologische Pipette (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml), Fa. Sigma Aldrich St. Louis USA

Drei-Wege-Hahn B.Braun Discofix C, Fa. B.Braun Melsungen

Duran Labor Glas-Becher (20 ml, 50 ml, 100 ml), Fa. Schott AG Mainz

Filter Millex GS 0,22 µm, Fa. Millipore, Billerica USA

Gebogene Schere klein, Fa. Aesculap Tuttlingen

Gerade Schere klein, Fa. Aesculap Tuttlingen

Imbusschlüssel

Perfusor Spritzen 50 ml, Fa. B.Braun Melsungen

Petrischalen, Fa. Greiner bio-one Kremsmünster Österreich

Pipettenspitzen (20 µl, 100 µl, 1000 µl), Fa. Eppendorf Hamburg

PP-Röhrchen 20 ml und 50 ml, Fa. Greiner Bio-one Kremsmünster Österreich

Schlauch PE160 1,14 mm Innendurchmesser, Fa. Schubert Kunststoff GmbH München

Spritzen 10 ml und 20 ml, Fa. B.Braun Melsungen

Skalpell Fig. 11, Fa. B.Braun Melsungen

Splitterpinzette, Fa. Aesculap Tuttlingen

Vier-Wege-Hahn Ventil HV4-3, Fa. VWR International GmbH Darmstadt

Wescot Schere, Fa. Aesculap Tuttlingen

Well-Platten (6er, 24er), Fa. Greiner bio-one Kremsmünster Österreich

Zellkulturflaschen Cellstar, Fa. Greiner bio-one Kremsmünster Österreich

2.1.4 Software

JMP 9 Ver. 9.0.1, Fa. SAS Institute Inc. Cary USA

Openlab, Improvision, Tübingen

Microsoft Office Excel for Mac 2011, Fa. Microsoft Redmond USA

Microsoft Office Word for Mac 2011, Fa. Microsoft Redmond USA

Valitec Data Ready Configuration/Analysis Software 7, Ver. 6.3b2, Fa. Transcat
Rochester USA

2.1.5 Nährmedien

2.1.5.1 Herstellung Perfusionsmedium

Das Perfusionsmedium für das Vorderkammermodell (P-Medium) besteht aus folgenden Bestandteilen:

- Dulbecco's modified Eagle Medium 500 ml
- Penicillin/Streptomycin 5 ml
- Gentamicin 500 µl = 50 µg/ml
- Amphotericin B 5 ml = 2,5 µg/ml

Diese werden entsprechend unter der Sterilbank mit sterilen Pipettenspitzen gemischt, gekennzeichnet und zwischen den Verwendungen im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.5.2 Herstellung Zellkulturmedium

Das Nährmedium für die Trabekelmaschenwerk-Zellkultur (Z-Medium) wird nach folgendem Rezept gemischt:

- Dulbecco's modified Eagle Medium 500 ml
- Fötale Kälber Serum 25 ml
- Penicillin/Streptomycin 5 ml

Die Bestandteile werden unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank gemischt.

2.1.6 Lösungen

2.1.6.1 Herstellung Riboflavin Tropfen 0,1% zum Crosslinking

Die als Photosensitizer und Lichtschutz dienenden Riboflavin (Vitamin B₂) Tropfen 0,1% werden nach folgendem Rezept zu je 10 ml selbst hergestellt:

- 10 ml PBS
- 0,01 g Riboflavin
- 2 g Dextran 500

Das Rezept basiert auf der Fachinformation der Riboflavin-Tropfen „MedioCross“ der Firma Medio-Haus Medizinprodukte GmbH, Neudorf [169].

Die Zutaten werden mittels der Mikrowaage abgewogen. Anschließend wird das Riboflavin mit 10 ml PBS suspendiert und mit dem Magnetrührer vorsichtig auf kleiner Drehzahl vermischt. Das abgewogene Dextran wird dann portionsweise beigegeben. Danach wird mit handelsüblicher Aluminiumfolie ein Lichtschutz angebracht und das Gefäß mit Parafilm verschlossen; anschließend die Drehzahl des Rührens langsam erhöht und das Gemisch für 15 Minuten bei voller Drehzahl gerührt bis sich das Dextran vollständig gelöst hat. Dann wird die nun intensiv gelbe, visköse Lösung in eine 10 ml Spritze aufgezogen, mit einem Stopfen verschlossen und ebenfalls mit Aluminiumfolie lichtgeschützt.

2.1.7 Schweineaugen

Für die Versuche werden Augen von schlachtreifen Hausschweinen (*Sus scrofa domestica*) verwendet. Die Augen werden direkt nach der Schlachtung, während der Verarbeitung im Schlachthof Gärtringen, Baden Württemberg, von den dortigen Mitarbeitern enukleiert und gesammelt. Dort werden sie kurz nach der Schlachtung abgeholt und im Labor weiterverarbeitet. Dies aber erst nach Freigabe der Schlachttiere durch den zuständigen Veterinär (Fr. Dr. med. vet. Natalia Quindt). Der Transport erfolgt ungekühlt in einem Beutel. Zwischen Schlachtung und Verarbeitung liegen maximal 2 Stunden. Aufgrund der Sammlung in einem gemeinsamen Behälter und ca. 150-300 Schlachttieren täglich ist kein Rückschluss auf das individuelle Schwein möglich. Aus diesem Behälter werden 40 Augen entnommen und wie

beschrieben mit ins Labor genommen. Es werden pro Versuchstag im Labor 10 Augen vorbereitet, inspiziert und letztlich zwei in den Druckmessversuch übernommen (vgl. Kap.: 2.2.1.1) bzw. entsprechend weitere Augen zu den Zellkulturversuchen präpariert (vgl. Kap. 2.2.2.4 und 2.2.2.6.3).

2.2 Methoden

2.2.1 Druckmessung Vorderkammermodell

2.2.1.1 Vorbereitung und Präparation der Schweineaugen

Alle Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen unter dem Abzug. Die Instrumente sind nach extraokular und intraokular zu trennen und zwischen den Arbeitsschritten mit 70 % Ethanol zu reinigen und desinfizieren. Hierbei ist zu beachten, dass das Instrument zur Präparation wieder trocken sein muss um die Zellen mit dem Alkohol nicht zu beschädigen.

10 ml 7,4 % Jodlösung werden mit 70 ml PBS verdünnt. Die benötigten Bulbi werden aus dem Transportbehälter mit einer Pinzette entnommen und in der Lösung für ca. 5 Minuten eingelegt. Im Anschluss werden vorhandene Augenmuskeln, Gewebereste des periokulären Gewebes, etc. entfernt und die Bulbi erneut für 5 Minuten in die Jodlösung eingelegt.

Anschließend wird der Bulbus an der Äquatoralebene mittels Stichinzision mit dem Skalpell eröffnet und parallel zur Äquatoralebene geteilt. Dann wird der Glaskörper vorsichtig mit einer gebogenen, geschlossenen Pinzette vom Sklerasporn gelöst und entfernt. Die Linse wird vorsichtig stumpf herausgelöst. Folgend wird das Präparat unter dem Stereomikroskop weiter präpariert. Hier wird stumpf mit der Wescot-Schere die Iris vom Untergrund gelöst. An der gelösten Stelle kann nun die Iris, wieder mit der Wescot Schere, durchtrennt werden. Danach wird die Iris vorsichtig unter Sichtkontrolle abgelöst und verworfen. Jetzt wird unter dem Mikroskop überprüft, ob die Gewebe der Vorderkammer noch intakt sind und verbleibendes Pigment und Gewebereste mittels PBS vorsichtig abgespült. Die so präparierte Vorderkammer wird zur kurzfristigen Aufbewahrung nun in P-Medium eingelegt.

Die Perfusionsschalen nach Johnson und Tschumper werden desinfiziert und trocknen gelassen [165]. Die Erhebung wird mit ein paar Tropfen P-Medium benetzt und dann die präparierte Vorderkammer darauf gelegt. Evtl. ist vorher die Größe der präparierten Vorderkammer mit der Schere anzupassen. Hierbei ist jedoch wichtig, dass nicht zu weit an das Trabekelmaschenwerk heran geschnitten wird. Die präparierte Vorderkammer wird auf der Erhebung der Perfusionsschale entsprechend ausgerichtet und zentriert. Fixiert wird diese Position dann mit dem Fixationsring und den passenden Schrauben. Das Anziehen der Schrauben erfolgt „über Kreuz“ (wie beim Reifenwechseln) damit sich die Kraft gleichmäßig verteilt und die Vorderkammer nicht verschoben wird. So entsteht wieder ein „geschlossenes“ Auge. Nun ist erneut zu kontrollieren, ob die Vorderkammer zentriert in der Perfusionsschale sitzt, anschließend wird die Kornea mit ein paar Tropfen P-Medium benetzt.

2.2.1.2 Aufbau und Entlüften des Vorderkammermodells

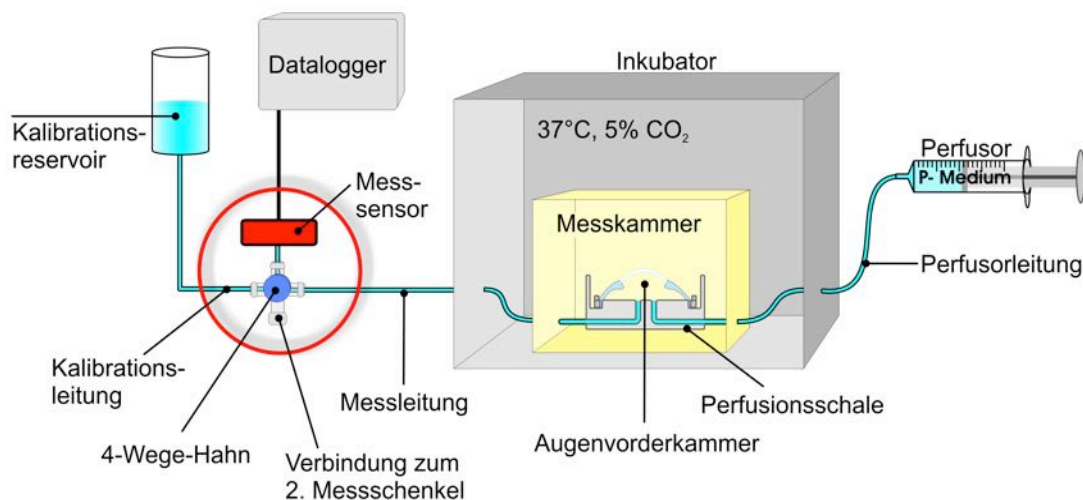


Abbildung 1: Schematische Übersicht über den kompletten Versuchsaufbau. Erkennbar ist der Verlauf der Schlauchführung vom Perfusor in die Messkammer und anschließend zum Messsensor. Am 4-Wege-Hahn sind beide Messschenkel verbunden und können für die Kalibration verbunden werden. Beide Messschenkel haben im verwendeten Aufbau einen eigenen Messsensor; lediglich zur Kalibration werden die Messschenkel wie beschrieben verbunden.

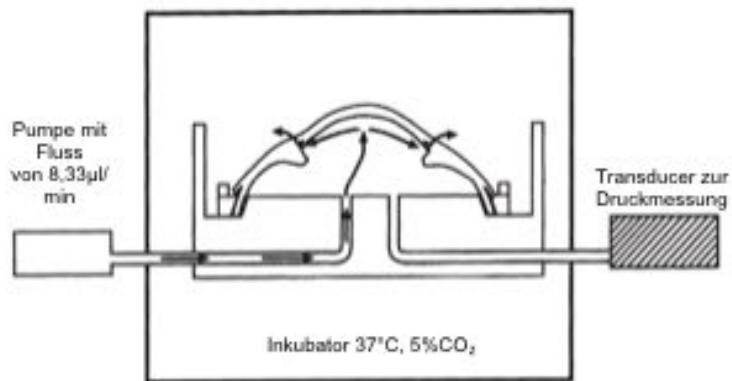


Abbildung 2: schematische Detaildarstellung des Vorderkammermodells. Hieraus ist die Flussrichtung des Mediums erkennbar. Es wird deutlich dass der physiologische Kammerwasserabfluss erhalten bleibt. Der Messschenkel zum Transducer ist eine stehende Flüssigkeitssäule aus P-Medium.



Abbildung 3: Vorderkammeraufbau unter Laborbedingungen. Zu sehen sind die beiden Perfusionsschalen mit bereits befestigten Augenvorderkammern in der Acrylkammer. An der linken Kammer ist zu erkennen dass das Medium über den physiologischen Weg abtransportiert wird und dann in den Sammelbereich der Perfusionsschale läuft.

Die Perfusorspritzen werden mit P-Medium unter der Sterilbank gefüllt, ebenso die 20 ml Spritzen zum Entlüften. Die Perfusorspritze wird mit je ca. 35 ml P-Medium gefüllt. Dies entspricht in etwa einer Laufzeit von 70 Stunden. Die Füllmenge ist abhängig von der geplanten Laufzeit der Versuche. Ggf. kann die Spritze während des Versuchs gewechselt werden. Nach dem Füllen werden die Spritzen mit dem 3-Wege-Hahn verschlossen, der mittels der Perfusorspritze mit P-Medium entlüftet wird. Die 20 ml-Spritze wird ebenfalls an den 3-Wege-Hahn angeschlossen. An den verbleibenden „Luer männlich“-Ansatz des 3-Wege-Hahns wird der mit einem „Luer weiblich“-Anschluss

versehene Schlauch angeschlossen, der wiederum mit dem Zulauf-Anschluss der Perfusionsschale verbunden wird. Auch der Ablauf der Schale wird mit einem Schlauch verbunden. Diese Arbeitsschritte sollten ebenfalls unter der Sterilbank erfolgen. Die Perfusionsschalen werden auf eine Überlaufschale und zum Schutz und besserer Handhabung in eine Versuchskammer aus Acryl gestellt. Diese Versuchskammer hat Öffnungen für die Schläuche. Zu beachten ist die Schlauchführung damit kein Schlauch geknickt wird oder unter starkem Zuge steht.

Die Versuchskammer wird nun zum Inkubator und dem dort befindlichen Messaufbau gebracht. Hier werden die Ablaufschläuche mit dem entsprechenden Sensor des Messaufbaus verbunden (Sensor 1 mit der vorderen Schale, Sensor 3 mit der hinteren Schale). Zwischen den Ablaufschlauch der Kammer und den Drucksensor wird ein Infusionsfilter gesteckt; dann kann das System entlüftet werden. Die Leitungen und die Kammer werden dazu mit P-Medium aus der 20-ml-Spritze gefüllt. Zuerst werden die 4-Wege-Hähne in die Position „Messung auf“ (vgl. Kap. 2.2.1.2.1) gestellt und der Messschenkel entlüftet damit die Zuleitung zum Messsensor definitiv luftfrei ist. Beachtet werden muss, dass sich meist kleinste Bläschen im Trabekelmaschenwerk verfangen. Hier ist darauf zu achten, dass diese möglichst komplett entfernt werden. Wenn die Entlüftung am Konnektor zum Drucksensor angekommen ist wird dieser mit dem Sensor verbunden und die Hähne auf „Messung zu“ (vgl. Kap. 2.2.1.2.1) gestellt. Der Rest des Systems kann nun entlüftet werden und Bläschen lassen sich über das Kalibrationsreservoir besser entfernen. Die beiden Kammern sind nun gefüllt und luftleer. Einzelne kleine Blasen stellen kein Problem dar. Beim Entlüften ist darauf zu achten, dass kein zu starker Druck mit der Spritze ausgeübt wird, da dies unter Umständen zu einer Ruptur bzw. Undichtigkeit der Vorderkammer bzw. zu Veränderungen an der Kornea und dem Abflusstrakt des Kammerwassers führen kann. Das P-Medium stellt nun ein artifizielles Kammerwasser dar. Nach Abschluss des Entlüftens werden die Perfusorspritzen in den Perfusor eingespannt und dieser mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/h gestartet. Dies entspricht 8,33 µl/min und ist

in den verwendeten Perfusoren die kleinste mögliche Geschwindigkeit. Diese, im Vergleich zur physiologischen Kammerwasserproduktion, recht hohe Flussrate zeigte in vorangegangenen Untersuchungen keinen Einfluss auf die Funktion der Zellen, lediglich die Anzahl der Zellen kann sich verringern [166]. Zum besseren Handling werden im Verlauf beide Kammern über einen Perfusor (B. Braun segura) perfundiert. Dieser lässt das Einspannen von zwei Spritzen zu.

Die Messkammer mit den 2 Vorderkammern in den jeweiligen Perfusionsschalen nach Johnson und Tschumper werden nun in den Inkubator gestellt. Die 4-Wege-Hähne stehen in der Position „Messung zu“ (vgl. Kap. 2.2.1.2.1), so dass das gesamte perfundierte Medium in Richtung Reservoir läuft.

2.2.1.2.1 Stellung der Hähne am Messaufbau

Messung auf: Kammer und jeweiliger Drucksensor sind verbunden, Kalibrationsschenkel geschlossen.

Messung zu: Drucksensoren sind geschlossen, Kammern und Kalibrationsreservoir sind verbunden.

Kalibration: Kammern sind geschlossen, Verbindung zwischen Kalibrationsschenkel und Drucksensoren.

2.2.1.3 Messzyklus

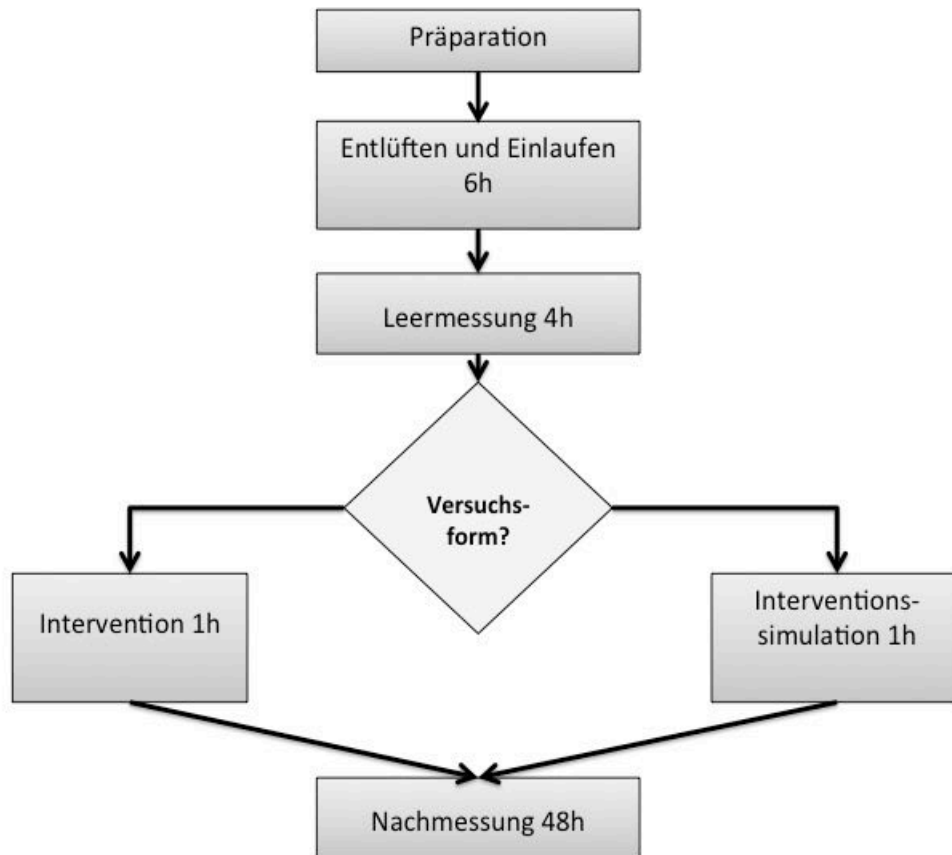


Abbildung 4: Ablaufdiagramm des Messzyklus. Es zeigt den schematischen Ablauf aller Messungen.

2.2.1.3.1 Einlaufen und Kalibration

In den ersten 6 Stunden wird das System einlaufen gelassen, sprich das perfundierte Medium läuft über den Kalibrationsschenkel in das Reservoir. Dann werden die Messsensoren kalibriert. Hierzu wird über den Datalogger eine Messung gestartet. Die 4-Wege-Hähne sind auf die Position Kalibration (vgl. Kap. 2.2.1.2.1) gestellt. Das Messreservoir wird nun anhand eines Messstabes auf den Höhen 0 cm, 10 cm, 20 cm, 30 cm, 40 cm, 50 cm für 10-15 s gehalten. Entscheidend ist, dass der Limbus der Flüssigkeit auf der entsprechenden Höhe ist. Die Messung wird nun manuell gestoppt. Es ergibt sich eine treppenförmige Messkurve. Die Daten werden gesichert und umgerechnet (vgl. Kap. 2.2.1.4).

2.2.1.3.2 Leermessung

Nach dem Einlaufen wird der Messaufbau erneut auf Dichtigkeit, makroskopisches Aussehen der Vorderkammern sowie Luftblasen kontrolliert.

Sind jetzt größere Luftblasen in der Vorderkammer werden diese erneut ausgespült (vgl. Kap. 2.2.1.2)

Dann wird die Leermessung mit einer Messdauer von 4 Stunden gestartet. Die Hähne werden in die Position „Messung auf“ (vgl. Kap. 2.2.1.2.1) gestellt.

In diesen 4 Stunden kann sich das Messsystem equilibrieren. Der Ablauf dient nun als Messschenkel, da hier kein Medium mehr ablaufen kann. Nun wird das Medium über das Kammerwasserabflusssystem nach außen transportiert und es stellt sich ein physiologischer IOP ein, der nun gemessen wird. Nach Ablauf der Messzeit werden die Daten gesichert und entsprechend umgerechnet (vgl. Kap. 2.2.1.4).

2.2.1.3.3 Intervention (Crosslinking) und Kontrolle

2.2.1.3.3.1 Intervention mit Crosslinking

Die Bestrahlung mittels UV Lampe kann nicht im Inkubator stattfinden. Deshalb wird der Messaufbau entsprechend außerhalb aufgebaut, wobei auf die korrekte Höhe zwischen Vorderkammer und Messsensor geachtet wird. Die Crosslinking Methode basiert auf der Dresdner Methode [62] und ist modifiziert nach Kymionis [160] um hier vergleichbare Bedingungen zu erhalten. Beide Protokolle werden so auch bei der Therapie am Menschen angewendet.

Vor der Bestrahlung wird mit einem sterilen Wattetupfer oder einem Augenstäbchen das zentrale Korneaepithel auf ca. 1 cm Fläche abradert. Die Riboflavin Tropfen 0,1% sind vor Versuchsbeginn laut Protokoll herzustellen (vgl. Kap. 2.1.6.1). Der Datalogger wird entsprechend eingestellt. Nun kann die Messung gestartet werden und pro Auge je 1 Trpf. Riboflavin-Lsg. 0,1 % aufgebracht werden. Diese lässt man für 30 min einwirken, wobei die Applikation der Tropfen alle 2 min wiederholt wird. Anschließend wird die Bestrahlung begonnen. Diese dauert 30 Minuten mit einer Intensität von 3 mW/cm². Die Intensität wird durch einen UV-A Sensor kontrolliert und ggf. durch Änderung der Entfernung des Messaufbaus zur Strahlungsquelle reguliert. Während der Bestrahlung werden ebenfalls alle 2 Minuten je 1 Tropfen Riboflavin Lösung 0,1% auf die Vorderkammer gegeben. Die gesamte

Bestrahlung findet unter Beachtung entsprechender Arbeits- und Umweltschutzrichtlinien statt. Nach Ablauf der 30 Minuten Bestrahlung wird das Riboflavin mit 20 ml PBS je Auge abgespült und die Flüssigkeit entsprechend aus der Perfusionsschale abgesaugt. Die Messdaten werden gesichert (vgl. Kap. 2.2.1.4) und der Versuchsaufbau wieder in den Inkubator verbracht.

2.2.1.3.3.2 Kontrolle

Um die Auswirkungen des Umbaus des Versuchsaufbaus zur UV-Lampe abschätzen zu können wird in der Kontrollgruppe dieser Umbau ohne Bestrahlung vorgenommen. Hier wird am Ende der Leermessung der Datalogger wie zur Intervention programmiert (vgl. Kap. 2.2.1.3.3.1) und die Messkammer für 1 h aus dem Inkubator genommen und gemessen. Beim Aufstellen der Messkammer außerhalb des Inkubators ist auch wieder auf den Ausgleich der Höhe zu achten (vgl. Kap. 2.2.1.3.3.1). Nach Ablauf der Stunde wird die Messkammer wieder zurück in den Inkubator gestellt.

2.2.1.3.4 Nachmessung

Nach Kontrolle bzw. Intervention wird der Datalogger für 48 h programmiert. Die Messkammer wird in den Inkubator gestellt und die korrekte, knickfreie Schlauchführung kontrolliert. Ebenso wird die Dichtigkeit überprüft. Danach wird die Messung gestartet. Nach 24 h und idealerweise 36 h wird der Aufbau makroskopisch auf Dichtigkeit, Luftfreiheit, etc. kontrolliert werden. Nach 24 h wird der Überstand in der Perfusionsschale mit einer Spritze abgesaugt damit der Versuch nicht „überläuft“.

2.2.1.3.5 Abbau Messaufbau und Datensicherung

Nach Abschluss der Messung nach 48 h werden die Daten aus dem Logger entsprechend gesichert und später ausgewertet (vgl. Kap. 2.2.1.4).

Die Perfusoren werden gestoppt, das System erneut auf Dichtigkeit hin inspiziert. Die Hähne werden geschlossen und die Messkammer aus dem Inkubator genommen. Die Vorderkammern werden nun gelöst und entnommen. Je nach Versuchsteil werden diese nun geteilt und für die Elektronenmikroskopie eingebettet (vgl. Kap. 2.2.3), zur Entnahme von Trabekelmaschenwerkszellen in eine sterile Petrischale gelegt (vgl.

Kap. 2.2.2.6.2) oder letztlich entsorgt. Die Schläuche, Konnektoren, etc. werden, wenn sie unbeschädigt sind, mit Wasser durchgespült um Mediumreste zu entfernen, im Anschluss daran mit Luft durchgespült, anschließend mit Desinfektionsmittel (innen und außen). Nach Ablauf der Einwirkzeit wird das Desinfektionsmittel wieder ausgespült. Ebenso wird mit allen anderen Bestandteilen des Messaufbaus, der Messkammer, den Perfusionsschalen und dem Instrumentarium verfahren. Anschließend wird alles getrocknet und aufgeräumt.

2.2.1.4 Auswertung der Daten und Statistik

2.2.1.4.1 Umrechnung der Daten

Die während der Kalibration (vgl. Kap. 2.2.1.3.1) ermittelten Werte des Dataloggers in Volt werden in ein Excel-Sheet übertragen. Die Werte werden nun entsprechend der Höhe des Reservoirs zugeordnet. Hieraus wird der Mittelwert in Volt für die jeweilige Höhe gebildet. Nun lässt sich das Bestimmtheitsmaß r^2 , die Steigung der Eichgeraden und der Achsenabschnitt berechnen. Folgend ergibt sich der Regressionskoeffizient, den man mit der Formel: $y = f(x) + e$ berechnen kann (vgl. Abbildung 5).

Durch Umformen kommt man zu: $X = \frac{(y-e)}{f}$. Hieraus lässt sich nun für jeden Wert in Volt der entsprechende Wert in cmH₂O bestimmen. Diese Werte lassen sich auch gleich in das gebräuchliche Maß für den IOP in mmHg umrechnen ($\text{mmHg} = \frac{\text{cm H}_2\text{O}}{1,36}$). Die o. g. Regressionsformel lässt sich mit den entsprechenden Werten in der Grafik in Excel anzeigen. Diese dient dann als Formel zur Umrechnung der Spannungswerte in Druckwerte in einem neuen Excel-Sheet.

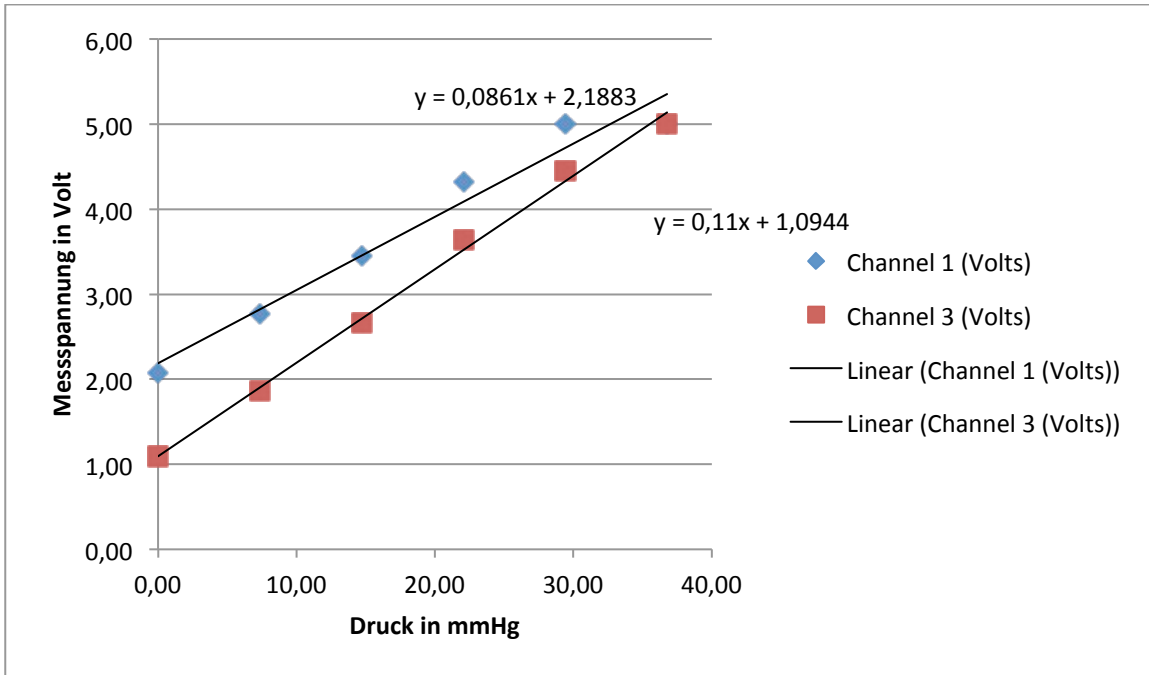


Abbildung 5: Excel Grafik einer Kalibration. Hier Messung I12. Sichtbar ist auch die Regressionsformel mit den entsprechenden Werten. Für x wird nach Umformung der gemessene Wert in Volt eingesetzt

2.2.1.4.2 Auswertung der Daten

Die mit dem Datalogger ermittelten Messwerte werden mit der Excel-Tabelle in mmHg-Werte umgerechnet. Daraus wird der Mittelwert und die Standardabweichung der Gesamtmessung sowie der Mittelwerte für jede Stunde und dessen Standardabweichung ermittelt. Dann ist zusammen mit dem Kurvenverlauf die Plausibilität der Daten zu bewerten. Bei Undichtigkeiten oder technischen Defekten ist die Messung nicht zu verwenden. Nach statistischen Vorgaben dürfen Ausreißer (obere und untere 5 %) entfernt werden, dies ist aber bei stabilen Messungen meist nicht nötig. Negative Druckwerte die sich aus der Umrechnung ergeben werden ebenfalls entfernt. Die Messung erhält eine Identifikations-Nummer (ID), die sich zusammensetzt aus dem Buchstaben I oder K, für Interventionsgruppe bzw. Methodenkontrollgruppe, einer fortlaufenden Nummer und dem Kanal aus dem Messaufbau. Dieser kann 1 oder 3 sein. Diese ID behält die Messung bei allen Auswertungen.

2.2.1.4.3 Statistik

Die Mittelwerte je Stunde werden statistisch ausgewertet. Aus den Stundenwerten werden der Mittelwert und die Standardabweichung für die Messung errechnet. Es wird der Quotient aus Mittelwert Nachmessung zu

Mittelwert Leermessung sowie die Abweichung des Quotienten von 1, sprich der Prozentsatz, errechnet. Außerdem die absolute Abweichung der Mittelwerte von der Leermessung zur Nachmessung. Des Weiteren werden hier die Daten in Kohorten zu je 5 Augen eingeteilt (vgl. Kap. 2.2.1.4.4) Dies geschieht in der Reihenfolge in der sie im Versuch gemessen wurden getrennt nach Intervention und Methodenkontrolle. Statistisch ausgewertet wird letztlich der Gesamtwert der Kohorte, dieser ergibt sich aus den Mittelwerten der einzelnen Messungen der betreffenden Kohorte. Einzelne Ausreißer -insbesondere nach oben- werden ebenso beachtet und beschrieben. Mittels Shapiro-Wilk Test werden die Kohorten auf Normalverteilung überprüft. Die Mittelwerte der Messungen werden Kohortenweise mit einem gepaarten, zweiseitigen t-Test überprüft.

2.2.1.4.4 Fallzahlplanung

Mit Frau Dipl.-Stat. Aline Naumann vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie (Leitung: Prof. Dr. rer. nat Peter Martus) der Universität Tübingen, wurde eine Fallzahlplanung mit folgenden Parametern durchgeführt:

Normalverteilte Messwerte; Signifikanzniveau bei $\alpha = 0,05$; als signifikante Abweichung werden 1,5 Standardabweichungen gesehen; primär werden Werte vor Intervention mit dem Wert nach Intervention verglichen; hieraus wird der Quotient gebildet.

Mit diesen Vorgaben wurde die Anzahl der notwendigen Fälle errechnet mit dem Ergebnis, dass 5 Fälle bzw. Augen gemessen werden müssten. Da dies eine sehr kleine Anzahl ist und durch die Probenbeschaffung (vgl. Kap. 2.1.7) nicht sicher gewährleistet werden kann, dass nicht zufällig Augen von ein und demselben Individuum in einem Versuch gemessen werden, wird der Versuch in 4 Kohorten zu jeweils 5 Augen durchgeführt bzw. in die Statistik übernommen. Dazu kommen noch 3 Kontroll-Kohorten zu je 5 Augen als Methodenkontrolle.

2.2.2 Zellkultur Trabekelmaschenwerk

2.2.2.1 Zellisolation

Zur Vorbereitung wird unter der Sterilbank ein 24-Well mit je 800 μ l angewärmten Z-Medium (vgl. Kap. 2.1.5.2) beimpft. Die Anzahl der beimpften

Wells richtet sich nach der Anzahl der Augen aus denen Material entnommen werden soll.

Die Vorderkammer wird nach entsprechender Vorbereitung und Präparation (vgl. Kap. 2.2.1.1 und 2.2.1.3.5) auf eine sterile Unterlage (Petri-Schale) gelegt. Das Instrumentarium wird mit 70% Ethanol desinfiziert. Dann wird unter der Stereolupe bei 6-8-facher Vergrößerung mit der Splitterpinzette Trabekelmaschenwerk (pigmentiert und unpigmentiert) entnommen. Ziel ist es möglichst große, zusammenhängende Stücke des Trabekelmaschenwerks zu isolieren. Die gesamten Arbeitsschritte werden unter der Sterilbank durchgeführt. Das entnommene Material wird in die vorbereitete 24-Well Platte gelegt. Pro Well wird das Material aus einem Auge gelegt. Dann erfolgt die Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ und 98 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator. Die Well-Platte wird nun mindestens einmal pro Woche mittels Mikroskop auf Wachstum kontrolliert. Nach 14 Tagen Wachstum werden 500 µl Z-Medium in die bewachsenen Wells unter der Sterilbank nachpipetiert. Die Trabekelmaschenwerkzellen sind nach ca. 3-4 Wochen ausreichend gewachsen und adhärent am Well-Boden.

2.2.2.2 Überführen von Zellen in die Kulturflasche

Das Z-Medium wird im Wasserbad angewärmt (auf ca. 37° C). Ebenso wird das Aliquotierte Trypsin/EDTA aufgetaut. Derweil wird die PBS-Flasche, die Kulturflaschen und dann das Trypsin-Röhrchen sowie die Z-Medium Flasche desinfiziert bzw. steril entnommen und in die vorbereitete Sterilbank gestellt. Dann werden 10 ml angewärmtes Z-Medium in die Kulturflaschen gegeben und der Boden der Flasche benetzt und beiseite gestellt. Danach wird die bewachsene Well-Platte aus dem Inkubator genommen. Das Medium in den Wells wird nun von der Oberfläche her vorsichtig aus dem Well abgesaugt, anschließend mit 1 ml PBS gewaschen und wieder vorsichtig abgesaugt. Dies wird ggf. wiederholt wenn noch deutliche Mediumreste verbleiben. Nun werden 150 µl Trypsin-EDTA in das Well geben und 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wird unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen sich lösen, ggf. muss die Well-Platte erneut in den Inkubator gestellt werden. Wenn die Zellen vom Boden gelöst sind werden sofort 1000 µl Z-Medium zum Stoppen der Lyse

hinzugeben. Dann wird der gesamte Inhalt je eines Wells vorsichtig in eine Pipettenspitze gesaugt und in ein vorbereitetes PP-Röhrchen 20 ml mit 4 ml Z-Medium geben. Die Röhrchen werden dann mit 1000 rpm für 3 min bei 20°C mit der Laborzentrifuge zentrifugiert. Der Mediumüberstand wird vorsichtig abgesaugt. Das verbleibende Pellet wird anschließend mit 10 ml Z-Medium suspendiert; hiervon werden 5 ml in die vorbereitete Kulturflasche geben, als „Klecks in der Mitte“. Die Flasche wird nun in den Inkubator mit CO₂ gestellt. Aus der übrigen Suspension kann nun die Zellzahl bestimmt werden (vgl. Kap. 2.2.2.5).

2.2.2.3 Mediumwechsel und Überwachung

Nachdem die Zellen in die Kulturflasche überführt sind (vgl. Kap. 2.2.2.2) dauert es ca. 1 Woche bis die Zellen in dieser wieder adhären am Boden sind. Dann wird einmal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellzahl bzw. Gewebedichte semiquantitativ mit 0, +, ++, +++, +++++ bewertet. Wobei dies folgenden Kriterien entspricht:

- 0: Kein Wachstum, Zelltrümmer
- +: Einzelne Zellinseln ohne deutlichen Kontakt zueinander
- ++: deutliche Zellinseln mit reichlich Kontakten untereinander
- +++: reichlich Zellwachstum, Zellrasen mit deutlichen Lücken
- +++++: dichter Zellrasen ggf. mit einzelnen kleineren Lücken

Zum Mediumwechsel werden Material und Sterilbank entsprechend vorbereitet (vgl. Kap. 2.2.2.2). Dann wird aus der Kulturflasche das alte Z-Medium vorsichtig abgesaugt, die Kultur mit 10 ml PBS gewaschen und dies dann wieder abgesaugt. Der Vorgang ist ggf. zu wiederholen wenn noch Mediumreste zurück bleiben. Dann werden 13 ml angewärmtes Z-Medium hinzugegeben und durch sanftes Schwenken am Boden der Kulturflasche verteilt. Die Flaschen werden nun zurück in den Inkubator gestellt.

2.2.2.4 Splitting der Zellkultur

Wenn der Boden der Zellkulturflasche vollständig bedeckt ist, dies ist ca. alle 4-6 Wochen der Fall, wird die Kultur in eine neue Flasche überführt und ggf. geteilt. Hierzu wird das Material und die Sterilbank analog Kap. 2.2.2.2 und Kap. 2.2.2.3 vorbereitet. Es werden 12 ml angewärmtes Z-Medium in eine neue Kulturflasche vorgelegt. Anschließend wird aus den bewachsenen Flaschen vorsichtig das Medium entfernt und die Kultur mit 10 ml PBS gewaschen. Dies wird dann auch abgesaugt. Folgend werden 2 ml Trypsin/EDTA in die Kulturflasche gegeben und durch sanftes Schwenken am Boden verteilt. Die Flasche wird so für 5 min im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluß daran wird unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen gelöst haben. Wenn ja, wird die Lyse durch Zugabe von 8 ml Z-Medium gestoppt. Die nun in der Flasche enthaltenen 10 ml werden mittels einer Stripette vorsichtig aufgesaugt und in ein PP-Röhrchen 20 ml gegeben. Hierin werden sie dann mit der Laborzentrifuge mit 1000 rpm 3 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Der entstandene Mediumüberstand wird vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet mit 5 ml Z-Medium suspendiert. Daraus wird nun 1 ml entnommen und in die neue Kulturflasche gegeben. Wenn erforderlich kann ein weiterer ml in eine andere Kulturflasche verbracht werden und die Kultur wäre geteilt. Die Flasche wird wieder beschriftet und mit der Anzahl der Zellpassagen versehen in den Inkubator gestellt.

2.2.2.5 Bestimmung der Anzahl Zellen pro Milliliter

Um die Anzahl der Zellen zu bestimmen wird nach der Suspension des Zellpellets nach Zentrifugation (vgl. Kap. 2.2.2.2 und 2.2.2.4) ein kleiner Tropfen Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Aus dieser werden dann unter dem Mikroskop die L-Quadrate (Seitenquadrate) ausgezählt. Aus der Gesamtzahl n wird mittels der Formel $\frac{n}{4} = x$ der durchschnittliche Zellgehalt ermittelt. Das Ergebnis ist dann $x \times 10^4$ Zellen/ml.

2.2.2.6 Zellkulturreihen

2.2.2.6.1 Nativ-Kulturen

Um den Umgang mit Zellkulturen aus Trabekelmaschenwerk zu festigen und die Auswirkung der Isolationsmethode zu überprüfen wurden, analog zu

Kap. 2.2.1.1, insgesamt 12 Augen präpariert und hier direkt Trabekelmaschenwerk isoliert (vgl. Kap. 2.2.2.1). Das weitere Vorgehen für die Zellkultur entspricht dem der Kapitel 2.2.2.2 bis 2.2.2.5. Insgesamt wurden die Kulturen 4-5 mal passagiert.

2.2.2.6.2 Kultur aus Vorderkammer aus Druckmessung

Nach Beendigung des Druckversuches mit der Vorderkammer werden beim Abbau Trabekelmaschenwerkgewebe aus der Vorderkammer entnommen (vgl. Kap. 2.2.1.3.5 und 2.2.2.1) und entsprechend inkubiert. Dann folgt der Versuch der Beschreibung der Kapitel 2.2.2.1 bis 2.2.2.5.

2.2.2.6.3 Kultur aus Vorderkammer ohne Druckmessung

Da die Trabekelmaschenwerkzellen aus den Druckversuchen (vgl. Kap. 2.2.2.6.2) auch nach mehrmaligem Versuch nicht anwachsen, wird ein neuer Versuch eingeführt. Hierbei soll nun überprüft werden ob die Zeit im Medium eine Rolle spielt. Daher werden nun 24 Augen präpariert (vgl. Kap. 2.2.1.1) und die Vorderkammern in eine Petri-Schale gelegt wo sie mit P-Medium bedeckt werden. Dann werden nach 6 Stunden, 12 Stunden und 18 Stunden jeweils aus 8 Augen Trabekelmaschenwerk isoliert, inkubiert und Zellkulturen angesetzt (vgl. Kap. 2.2.2.1 bis 2.2.2.4). Beim Überführen in die Kulturflasche werden die Zellen aus 4 Augen bzw. einer Reihe des Wells in eine Flasche gegeben. Diese werden wie in Kap. 2.2.2.3 überwacht und quantifiziert.

2.2.2.7 TUNEL Färbung

Um zu zeigen und zu überprüfen, dass im Vorderkammermodell weiter vitale Trabekelmaschenwerkzellen vorhanden sind und um zu quantifizieren wie viele apoptotische Zellen im Versuchsverlauf entstehen werden aus zwei Kontrollaugen und zwei Augen die sich 48 Stunden im Versuchsaufbau befanden Paraffinschnitte angefertigt und diese mittels TUNEL (TdT-mediated-dUTP-biotin nick end labeling) Färbung überprüft. Mit der TUNEL-Färbung können DNA-Strangbrüche dargestellt werden. Diese treten vor allem während der Apoptose auf. Während der Apoptose wird der DNA-Strang durch Endonukleasen fragmentiert und an den Bruchenden werden Hydroxylgruppen (3'-OH-Gruppen) frei. Diese werden bei der Färbung durch das Enzym TdT

(Terminal desoxynucleotidyl Transferase) mit markierten Nukleotiden besetzt. Diese TMR rot markierten Nukleotide können dann fluoreszenzmikroskopisch erkannt und gezählt werden. [170]

Die Augen werden in Paraformaldehyd in PBS bei einem pH Wert von 7,4 fixiert und anschließend paraffiniert. Die Schnitte werden mit 5 µm Dicke gefertigt und nach Standardmethoden entparaffiniert und rehydriert: 4x 5 min Xylol, je 2x 1-2 min 99 %, 96 % und 70 % Alkohol und 2x 1-2 min H₂O. Anschließend werden die Proben gefärbt.

Die Färbung wird anhand der Beschreibung des Proben-Kits der Fa. Roche durchgeführt [170]. Die Auswertung erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan2 mit 20-facher Vergrößerung. Die Zellzählung wird mit Unterstützung der entsprechenden Software durchgeführt (Openlab, Improvision).

2.2.3 Ultrastrukturelle Analyse von Vorderkammerschnitten mittels Elektronenmikroskopie

2.2.3.1 Vorbereitung der Proben

Nach Abschluss des Druckversuches wurden 8 Vorderkammern für die Analyse unter dem Elektronenmikroskop eingebettet. Je zweimal zwei Vorderkammern nach Methodenkontrolle und zweimal zwei nach Intervention. Hierfür wird die Vorderkammer aus der Perfusionsschale entnommen, mit dem Skalpell halbiert und je die Hälfte in 5 ml gerade aufgetaute Fixierlösung (2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer) eingelegt. Die Fläschchen werden beschriftet und umgehend in den Kühlschrank gestellt. Hier wurden sie über Nacht bei 4°C fixiert.

2.2.3.2 Einbettung und Mikroskopie der Schnitte

Die fixierten Vorderkammern werden mit Cacodylatpuffer gewaschen und dann Trabekelmaschenwerk ausgeschnitten. Diese Teile wurden für 1 Stunde mit 1 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylatpuffer bei Raumtemperatur nachfixiert. Die Proben werden anschließend durch eine Reihe von Ethanol-Inkubationen (30 %, 50 % und 70 %) für je 10 Minuten dehydriert und dann mit gesättigter Uranylacetat-Lösung gefärbt. Die Dehydrierung wird weitergeführt mit der Inkubation in 70 %, 80 % und 96 % Ethanol für jeweils 10 Minuten und

abschließend jeweils 2x 15 min in absolutem Ethanol und Propylenoxid. Anschließend werden die Proben in Epon (Epoxidpropyleter des Glycerins) eingebettet. Daraus werden dann ultradünne Schnitte hergestellt (70 nm), die mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt werden. Die Schnitte werden im Anschluss mit dem Elektronenmikroskop mikroskopiert und die Ultrastruktur der entscheidenden Teile verglichen. Die Aufmerksamkeit liegt hier v. a. darauf, ob Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsaugen auftreten und ob sich die Ergebnisse beider Gruppen von den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen unterscheiden.

3 Ergebnisse

3.1 Druckmessung der Vorderkammer

Die Druckmessungen sollen den Wert vor Intervention (Leermessung) mit dem Wert nach Intervention (Nachmessung) vergleichen. Um bei den unterschiedlichen Ergebnissen eine Vergleichbarkeit zu erreichen wird jeweils der Quotient errechnet. Abschließend erfolgt eine statistische Auswertung am Ende jeder Kohorte. Ziel ist es festzustellen, ob es innerhalb der Nachmessungszeit zu einem Druckanstieg im Vergleich zur Leermessung kommt. Bei den Methodenkontrollmessungen soll die Auswirkung des Umbaus des Versuchsaufbaus bzw. die Herausnahme aus dem Inkubator zur Bestrahlungslampe untersucht werden.

3.1.1 Interventions-Kohorte 1

Hier wurden die Ergebnisse der Messungen I2.1, I4.1, I4.3, I5.1 und I5.3 ausgewertet. Die Werte der Messung I2.2 konnten nicht verwertet werden da hier eine Leckage im Schlauchsystem aufgetreten war und deshalb kein Druck aufgebaut wurde. Die Messung I1 konnte aufgrund technischer Probleme mit dem Aufbau gar nicht verwertet werden. Ebenso war bei Messung I3 ein technischer Defekt an der Stromversorgung der Messsensoren für einen Totalausfall der Messung verantwortlich.

Die Messwerte der Versuche lagen meist im physiologischen Bereich lediglich bei der Messung I5.3 war der Mittelwert der Leermessung bei 32,81 mmHg ($\pm 5,43$ mmHg) sehr hoch, die Nachmessung zeigte dann aber einen Mittelwert von 18,60 mmHg ($\pm 4,90$ mmHg). Die Messungen I2.1 und I5.1 waren bei der Leermessung mit 20,82 mmHg ($\pm 2,34$ mmHg) und 22,39 mmHg ($\pm 3,48$ mmHg) in einem grenzwertigen, klinisch überwachungsbedürftigen Bereich. Nach CxI kam es in der Nachmessung, außer bei Messung I4.3, immer zu einem leichten Druckabfall. Bei der Messung I4.3 war der Mittelwert der Leermessung bei 8,04 mmHg ($\pm 0,28$ mmHg), der Mittelwert des Drucks der Nachmessung war mit 9,92 mmHg ($\pm 1,68$ mmHg) um 23 % bzw. 1,88 mmHg höher.

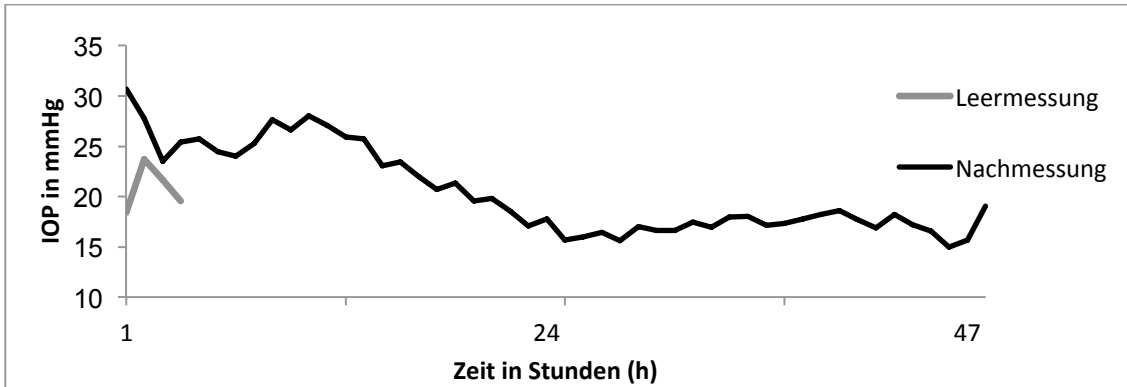


Abbildung 6: Druckverlauf der Messung 12.1. Erkennbar ist, dass der Wert der ersten Stunde der Nachmessung deutlich im erhöhten IOP Bereich liegt (30,7 mmHg (\pm 7,63 mmHg)). Das war auch der maximale Wert der Messung. Der Mittelwert der Leermessung lag bei 20,82 mmHg (\pm 2,34 mmHg), der MW der Nachmessung bei 20,43 mmHg (\pm 4,28 mmHg). Im Verlauf pendelt sich der Druck der Nachmessung im Bereich zwischen 15- 20 mmHg ein.

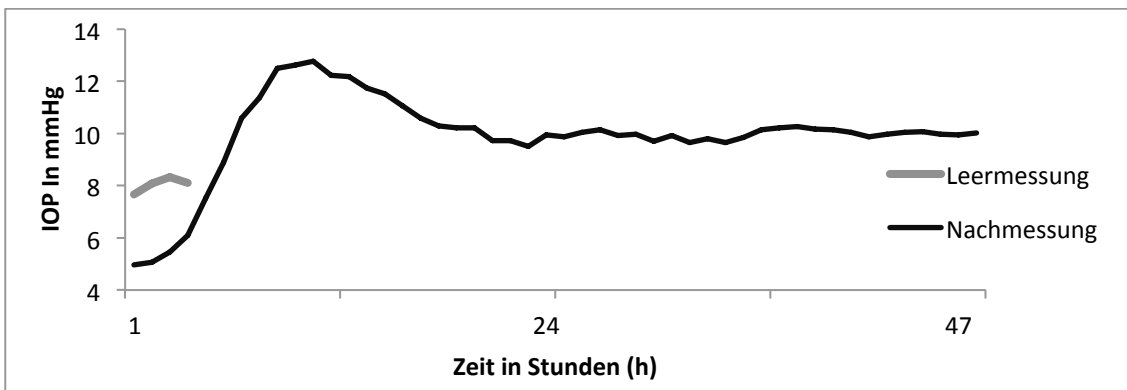


Abbildung 7: Druckverlauf der Messung 14.3. Deutlich erkennbar ist hier, dass die gesamte Messung in einem eher niederen Bereich verlief. Der Mittelwert der Leermessung beträgt 8,04 mmHg (\pm 0,28 mmHg), der Mittelwert der Nachmessung liegt mit 9,92 mmHg (\pm 1,68 mmHg) etwas höher. Die Drucksteigerung von 1,88 mmHg beträgt aber somit 23 %.

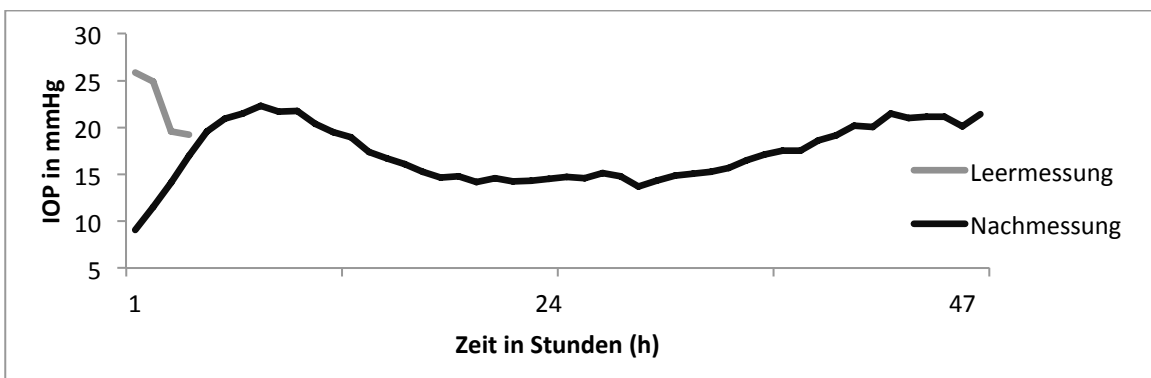


Abbildung 8: Druckverlauf der Messung 15.1. Der Mittelwert der Leermessung beträgt 22,39 mmHg (\pm 3,48 mmHg), der Mittelwert der Nachmessung liegt mit 17,22 mmHg (\pm 3,14 mmHg) darunter. Erkennbar am Kurvenverlauf ist, dass die Nachmessung zu keinem Zeitpunkt nennenswert über den Wert der Leermessung steigt. Insgesamt liegt der Druck der Nachmessung 23 % unter dem der Leermessung.

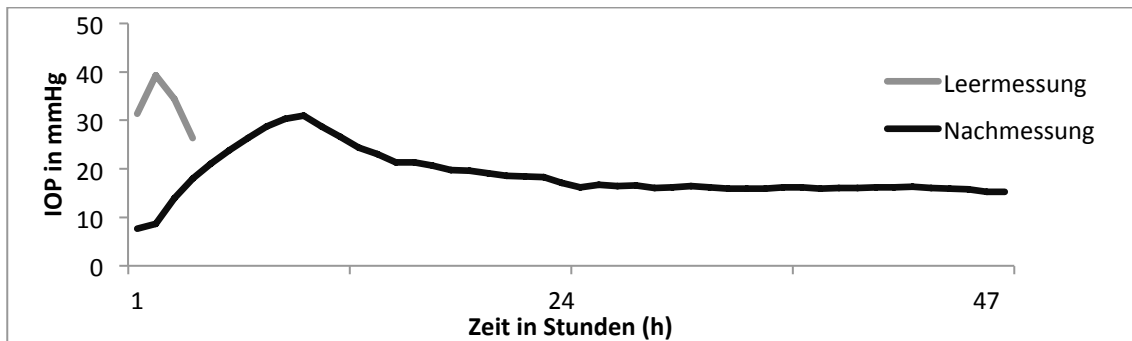


Abbildung 9: Druckverlauf der Messung 15.3. Der Mittelwert der Leermessung beträgt 32,81 mmHg ($\pm 5,43$ mmHg). Hier ist die Druckspitze in der zweiten Stunde gut zu erkennen. Der Mittelwert der Nachmessung liegt bei 18,60 mmHg ($\pm 4,90$ mmHg), wobei hier ab der 15. Stunde ein stabiler Verlauf zu erkennen ist.

Die statistische Auswertung der Mittelwerte der Kohorte ergab einen p-Wert von 0,25. Somit konnte hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Druck vor und nach Intervention festgestellt werden.

Der Mittelwert der gesamten Kohorte war für die Leermessung 20,60 mmHg ($\pm 8,84$ mmHg) und für die Nachmessung 16,78 mmHg ($\pm 4,02$ mmHg). Hieraus ergab sich ein Quotient von 0,81 bzw. eine Drucksenkung um 19 % oder 3,82 mmHg absolut verglichen zur Leermessung.

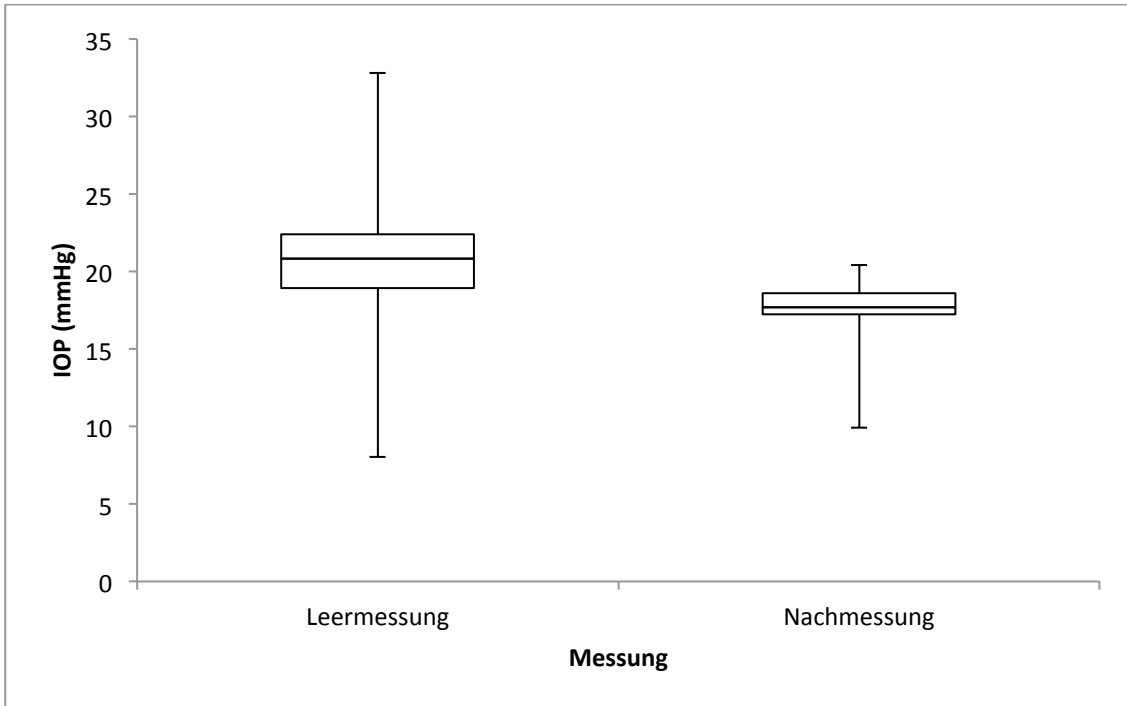


Abbildung 10: Boxplot der Mittelwerte der Kohorte IK1. Die Werte der Leermessung sind wie folgt; Minimum 8,04 mmHg, Maximum 32,81 mmHg, 25 % Quantil 18,92 mmHg, Median 20,82 mmHg, 75 % Quantil 22,39 mmHg. Die Nachmessung hat folgende Werte: Minimum 9,92 mmHg, Maximum 20,43 mmHg, 25 % Quantil 17,22 mmHg, Median 17,71 mmHg, 75 % Quantil 18,60 mmHg.

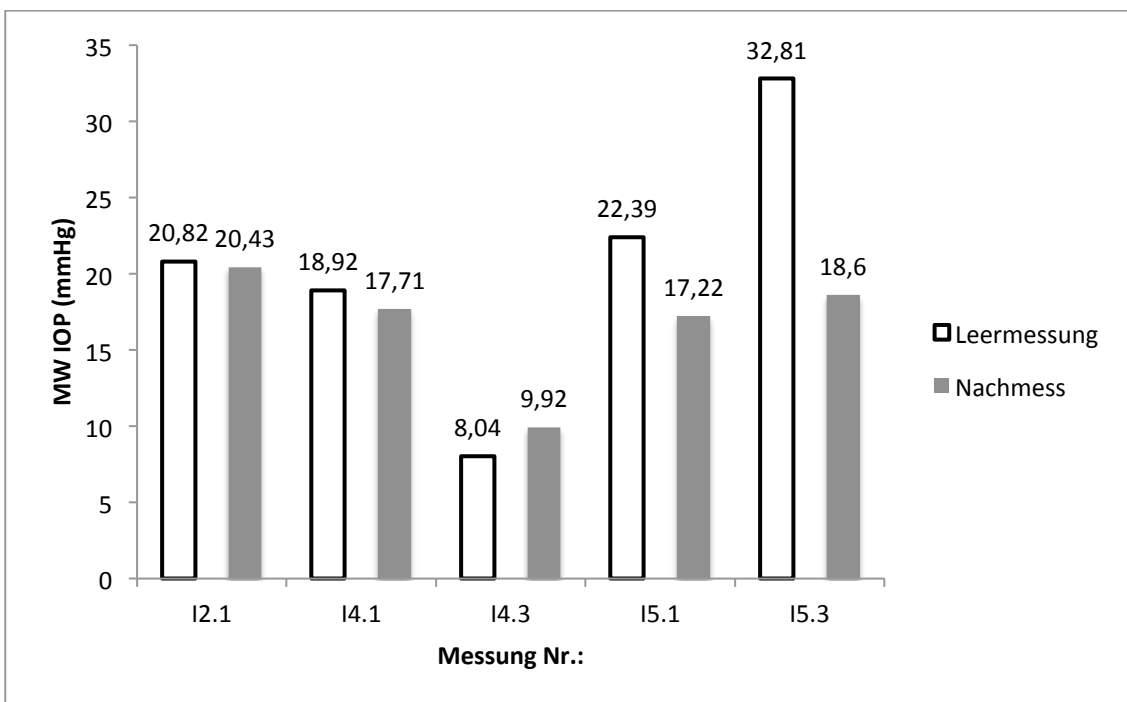


Abbildung 11: Balkendiagramm der Einzelmessungen der Kohorte IK1, die Balkenhöhe visualisiert den Mittelwert der Messung ohne Standardabweichung. Der MW ist oberhalb des Balkens angegeben. Erkennbar ist, dass der Mittelwert der Nachmessung bis auf die Messung 14.3 immer unterhalb des Wertes der Leermessung liegt und es somit in dieser Kohorte nach CxI zu einer Absenkung des IOP kommt.

3.1.2 Interventions-Kohorte 2

In diese Kohorte flossen die Messungen I6.1, I6.3, I7.3, I8.1 und I8.3 ein. Bei der Messung I6.1 war die Kalibration nur mit einer Korrelation von ca. 88% durchführbar. Die Messung I7.1 konnte nicht verwertet werden da hier bereits zu Beginn einer der Schläuche des Messaufbaus verstopft war. Bei den Messungen des Versuchsaufbaus I8 war nach 45 h das P-Medium aufgebraucht. Deshalb wurde bei diesen Messungen nur bis Stunde 45 der Nachmessung ausgewertet.

Die Messungen lagen meist im physiologischen Bereich. Bei Messung I6.1 lag der MW der Leermessung erhöht bei 28,54 mmHg ($\pm 1,05$ mmHg) und in der Nachmessung bei 25,07 mmHg ($\pm 4,68$ mmHg). Bei Messung I7.3 war mit 4,90 mmHg ($\pm 0,82$ mmHg) der MW der Leermessung eher niedrig. Aber auch in der Nachmessung war der MW mit 4,46 mmHg ($\pm 0,71$ mmHg) im hypotonen Druckbereich. In der Übersicht bleibt bis auf Messung I8.3 der Druck nach der Intervention unter dem der Leermessung. Hier betrug der MW der Leermessung 6,92 mmHg ($\pm 0,35$ mmHg), der MW der Nachmessung lag bei 9,63 mmHg ($\pm 1,10$ mmHg) und somit 39 % bzw. 2,71 mmHg über dem der Leermessung.

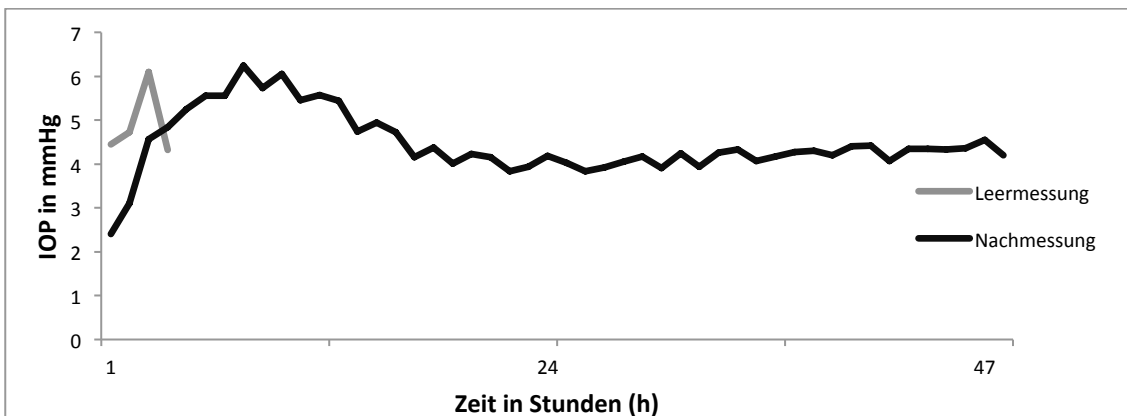


Abbildung 12: Druckverlauf der Messung I7.3. Der Mittelwert der Leermessung beträgt 4,9 mmHg ($\pm 0,82$ mmHg), der Wert der Nachmessung 4,46 mmHg ($\pm 0,71$ mmHg). Gut zu erkennen ist, dass die gesamte Messung in einem sehr niederen Druckbereich und in einem stabilen Niveau mit geringer Abweichung verläuft.

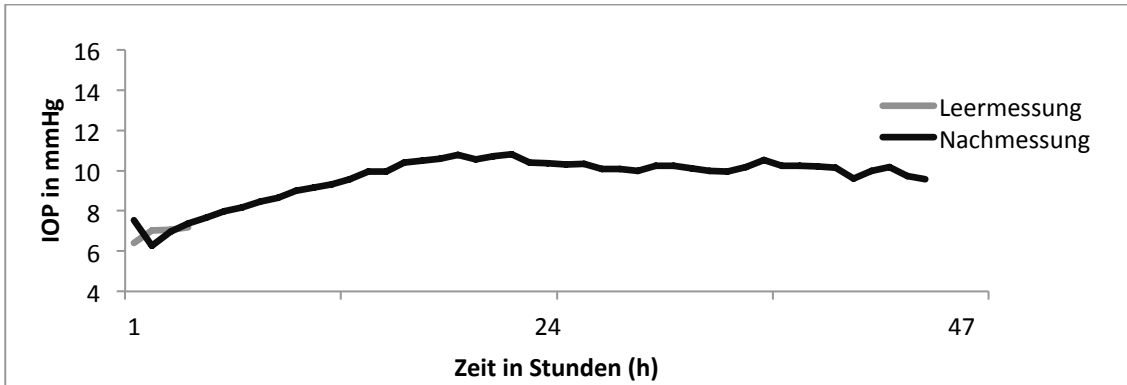


Abbildung 13: Druckverlauf der Messung I8.3. Der Mittelwert des gesamten Verlaufs ist bei der Leermessung 6,92 mmHg ($\pm 0,35$ mmHg), der MW der Nachmessung 9,63 mmHg ($\pm 1,10$ mmHg). Hier liegt der Mittelwert der Nachmessung zwar 39 % über dem der Leermessung aber insgesamt ist der Druck im hypotonen bis normalen Druckbereich.

Der statistische Test konnte auch hier keine signifikante Druckerhöhung zeigen. Der p-Wert lag bei 0,30. Der Mittelwert der Leermessungen der gesamten Kohorte lag bei 13,72 mmHg ($\pm 9,32$ mmHg). Der Mittelwert der Nachmessung bei 11,99 mmHg ($\pm 7,75$ mmHg). Der Quotient der Messungen lag bei 0,87. Somit ist über die gesamte Kohorte gesehen der Druckabfall bei 13 % bzw. 1,73 mmHg absolut. Hierdurch lässt sich auch der p-Wert erneut nachvollziehen. Es kam hier zu keiner signifikanten Erhöhung des Druckes nach Cxl.

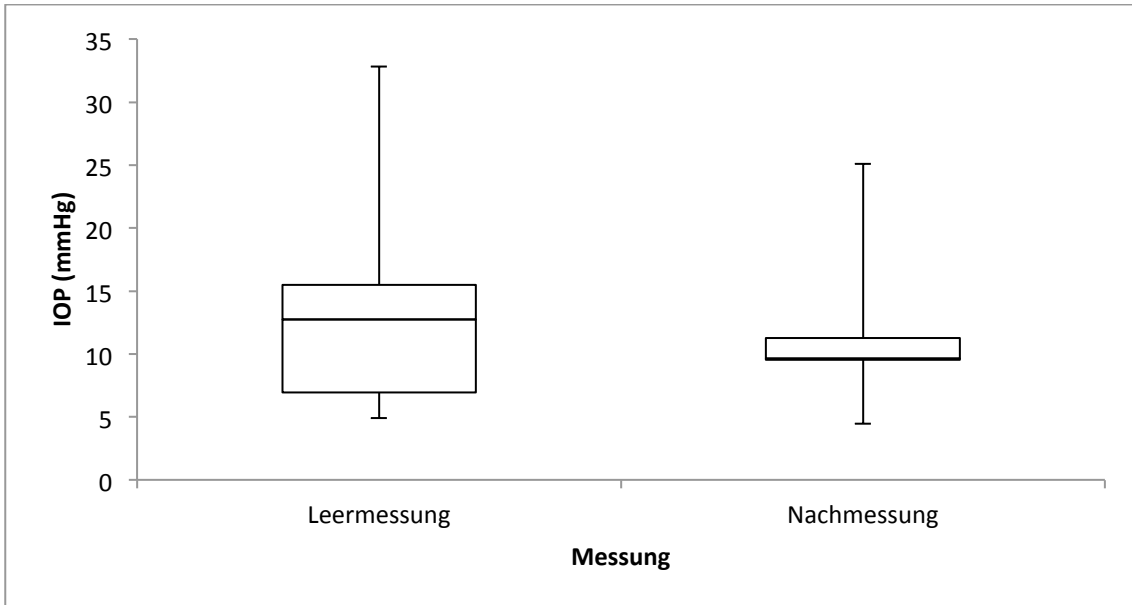


Abbildung 14: Boxplot Diagramm der gesamten Interventionskohorte 2. Die Werte der Leermessung sind: Minimum 4,9 mmHg, Maximum 28,45 mmHg, 25 % Quantil 6,92 mmHg, Median 12,76 mmHg, 75 % Quantil 15,49 mmHg. Die Werte der Nachmessungen: Minimum 4,46 mmHg, Maximum 25,07 mmHg, 25 % Quantil 9,52 mmHg, Median 9,63 mmHg, 75 % Quantil 11,26 mmHg. Es ist gut zu erkennen dass die Box der Nachmessung und die meisten Werte unter dem der Leermessung liegen.

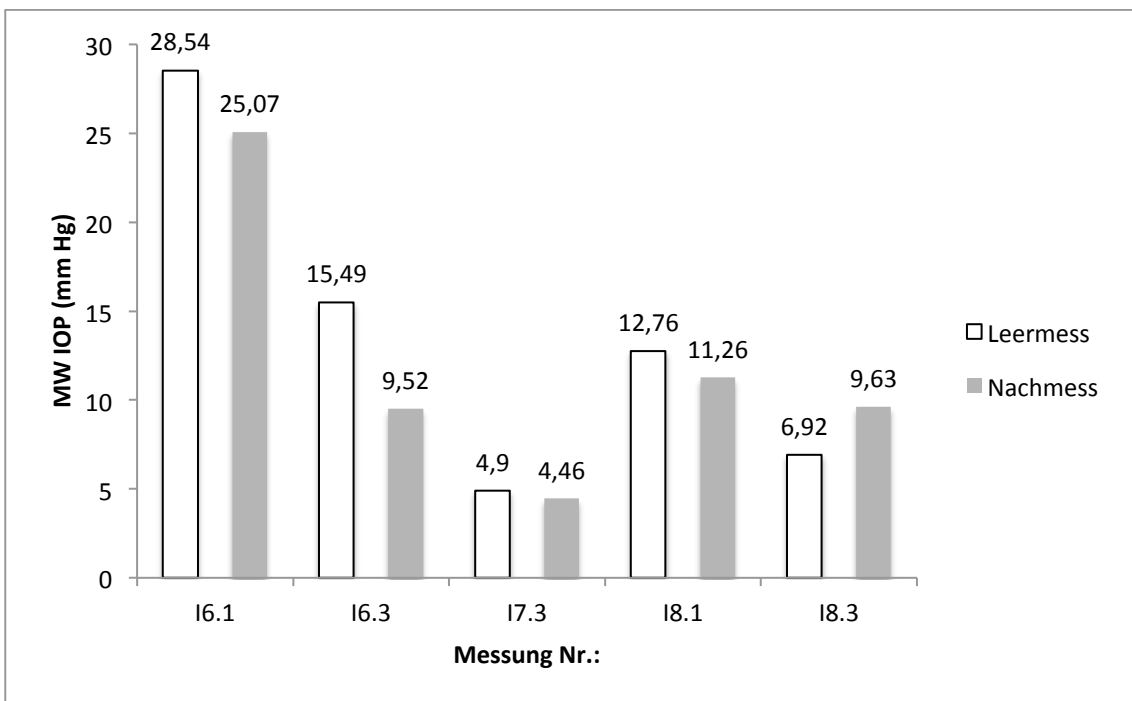


Abbildung 15: Übersicht der Einzelmessungen der Kohorte IK2 als Balkendiagramm anhand der Mittelwerte ohne Standardabweichung. Außer bei der Messung 18.3 liegen die Werte der Nachmessung unter oder im Bereich der Werte der Leermessung. Zu erkennen ist ebenfalls dass bei der Messung 16.1 eher hohe Werte gemessen wurden, aber auch hier ist der Wert nach Cxl niedriger.

3.1.3 Interventions-Kohorte 3

Hier wurden die Messungen I9.1, I9.3, I10.1, I10.3 und I11.1 verwendet. Die Messung I11.3 wird der Interventionskohorte 4 zugerechnet und dort ausgewertet. Insgesamt waren hier die technischen Abläufe der Versuche einwandfrei.

Die Werte der Messungen lagen meist im physiologischen Bereich. Die Messung I9.3 jedoch zeigte mit einem MW von 33,84 mmHg ($\pm 4,12$ mmHg) bei der Leermessung und einem MW von 33,07 mmHg ($\pm 2,58$ mmHg) bei der Nachmessung sehr hohe IOP Werte. Aber auch hier kam es nach dem CxI zu einem Abfall des Druckes und nicht zu einer weiteren Erhöhung. Dagegen war bei der Messung I11.1 ein eher hypotoner Verlauf zu beobachten. Hier lag der MW der Leermessung bei 4,76 mmHg ($\pm 0,10$ mmHg), der MW der Nachmessung betrug 5,23 mmHg ($\pm 1,23$ mmHg). Dies war gleichzeitig die einzige Messung dieser Kohorte bei der ein Druckanstieg zu verzeichnen war. Dieser betrug 0,47 mmHg absolut.

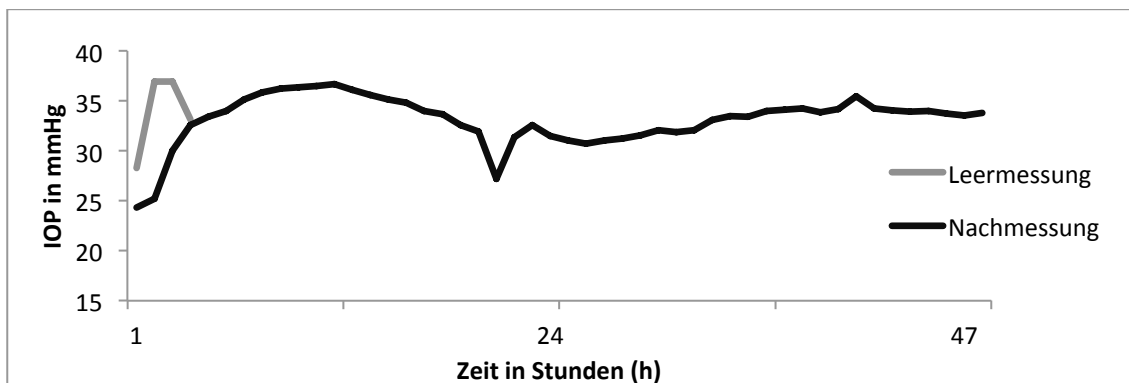


Abbildung 16: Druckverlauf der Messung I9.3. Der Mittelwert der gesamten Leermessung beträgt 33,84 mmHg ($\pm 4,12$ mmHg), der Mittelwert der Nachmessung 33,07 mmHg ($\pm 2,58$ mmHg). Der Wert der Leermessung ist kurzfristig auf einem sehr hohen Niveau von 36,96 mmHg während der Stunde 2 und 3. Der Druckverlauf der Nachmessung ist auch in einem hohen IOP-Bereich insgesamt aber 3 % niedriger als der Verlauf der Leermessung.

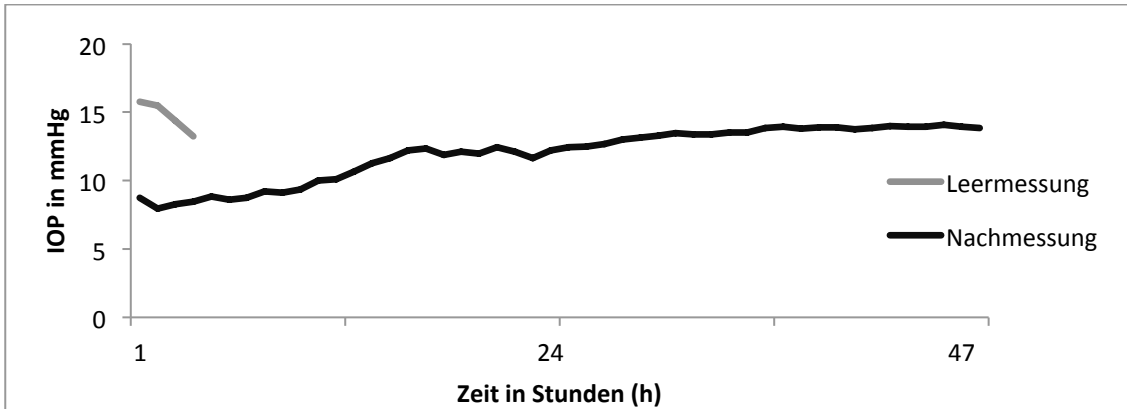


Abbildung 17: Druckverlauf der Messung I10.3. Der MW der Leermessung liegt bei 14,72 mmHg ($\pm 1,16$ mmHg), der Nachmessung bei 11,98 mmHg ($\pm 1,96$ mmHg). Gut zu erkennen ist der stabile Verlauf der Messung insbesondere der Nachmessung.

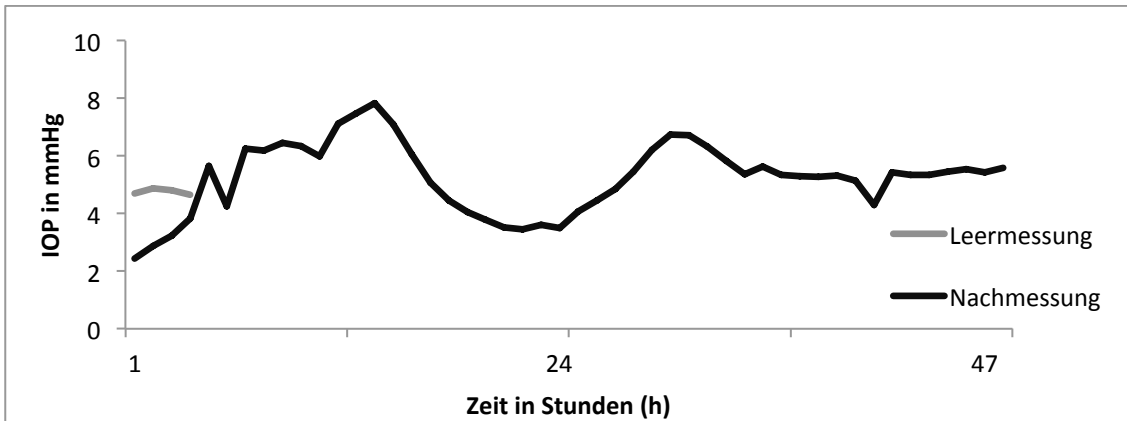


Abbildung 18: Druckverlauf der Messung I11.1. Der Mittelwert der gesamten Leermessung beträgt 4,76 mmHg ($\pm 0,10$ mmHg), der MW der Nachmessung liegt bei 5,23 mmHg ($\pm 1,23$ mmHg). Trotz der Schwankungen im Verlauf der Nachmessung lag der Druck stets im niederen Druckbereich und war im Mittel um 10 % gegenüber der Leermessung erhöht.

Der in dieser Kohorte durchgeführte t-Test ergab einen p-Wert von 0,12 womit sich bei dem gewähltem Niveau von 0,05 keine statistisch signifikante Erhöhung des Druckes nach CxI nachweisen lässt. In der Gesamtbetrachtung zeigen die Werte tendenziell an, dass es nach dem CxI zu keiner nennenswerten Veränderung des IOP kommt; wenn dann tendenziell zu einem Absinken. Auch hier bewegen sich diese Werte jedoch in einem klinisch meist nicht erfassbaren Bereich. Der Mittelwert der Leermessung der gesamten Kohorte liegt bei 15,88 mmHg ($\pm 10,77$ mmHg). Der Mittelwert der Nachmessung der gesamten Kohorte liegt bei 12,44 mmHg ($\pm 11,98$ mmHg). Der Quotient hieraus liegt bei 0,78. In der Übersicht kommt es also zu einem

Druckabfall von 21 % bzw. 3,44 mmHg des IOP in der Nachmessung, als vor dem CxI. Auch hier ist das statistische Ergebnis gut nachvollziehbar.

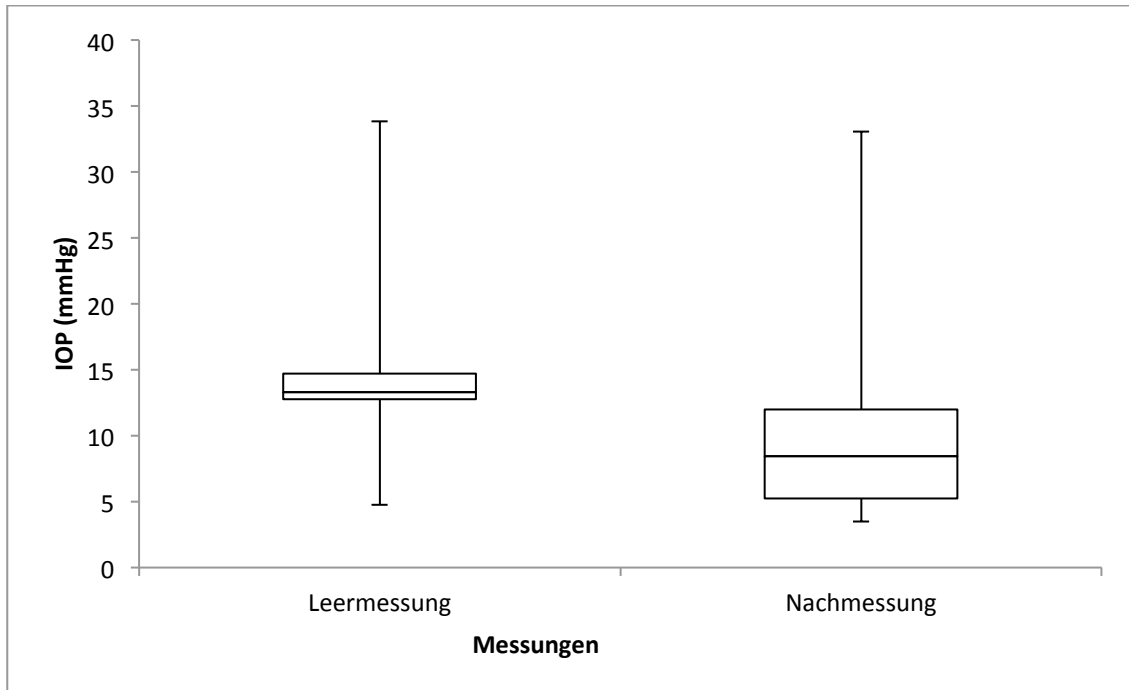


Abbildung 19: Boxplot der Interventions-Kohorte 3. Die Werte für die Leermessungen sind: Minimum 4,76 mmHg, Maximum 33,84 mmHg, 25 % Quantil 12,77 mmHg, Median 13,3 mmHg, 75 % Quantil 14,72 mmHg. Der Maximalwert ist ein Ausreißer aus der Messung 19.3. Die Werte der Nachmessung sind: Minimum 3,47 mmHg, Maximum 33,07 mmHg, 25 % Quantil 5,23 mmHg, Median 8,44 mmHg, 75 % Quantil 11,98 mmHg. Auch hier ist der Maximalwert ein Ausreißer aus der Messung 19.3. Die Nachmessung lässt erkennen, dass der Großteil der Werte der Nachmessung unter denen der Leermessung liegt.

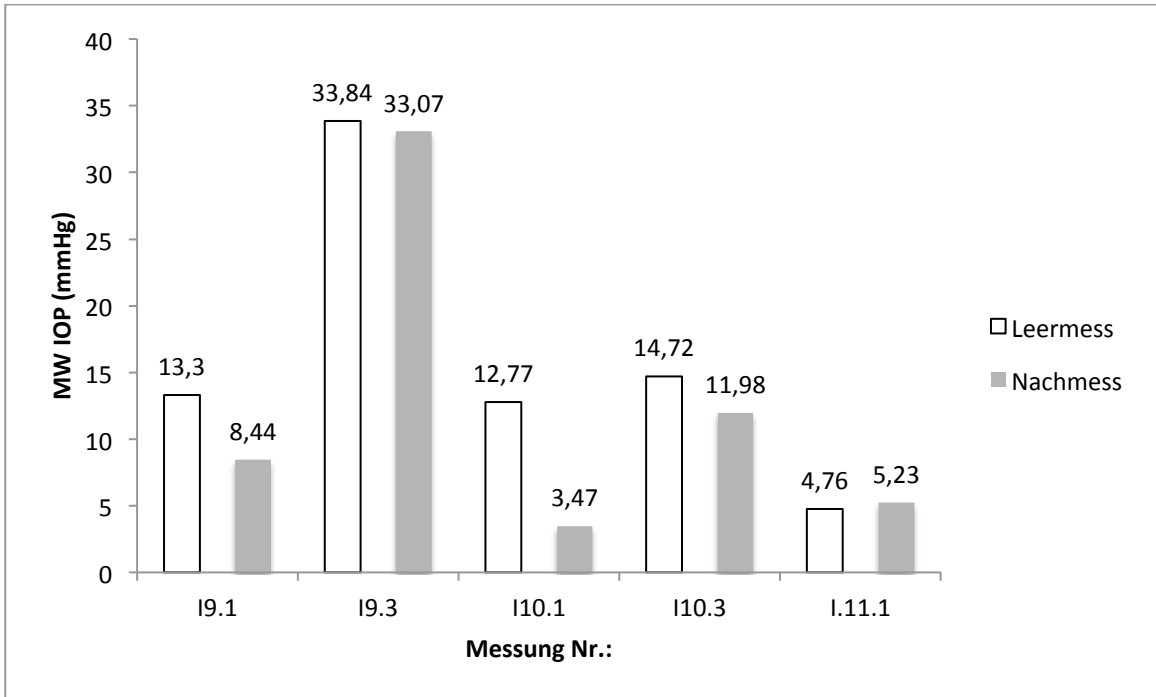


Abbildung 20: Balkendiagramm der Einzelmessungen der Kohorte IK3 in der Übersicht. Die Werte stellen die MW der Messung ohne Standardabweichung dar. Gut zu sehen ist dass die Messung I9.3 sehr hohe Werte geliefert hat. Des Weiteren ist gut zu erkennen dass die Werte der Nachmessung, mit Ausnahme der Messung I11.1, unter denen der Leermessung liegen und eine Erhöhung des IOP nach Cxl nur in Einzelfällen nachweisbar ist.

3.1.4 Interventions-Kohorte 4

Hier wurden die Messungen I11.3, I12.3, I13.1, I14.1 und I14.3 ausgewertet. Die Messung I11.1 wurde bereits in der Interventionskohorte 3 ausgewertet. Die Messung I12.1 war nicht verwertbar da es hier zu einer Ruptur und Undichtigkeit der Vorderkammer am Ansatz des Metallrings kam. Die Messung I13.3 war ebenfalls nicht verwertbar da hier die Messeinrichtung längere Zeit auf dem Messschlauch stand und diesen komprimiert hatte.

Bemerkenswert ist bei dieser Kohorte dass es in allen Messungen, außer bei I14.1, zu einer Erhöhung des Druckes nach Cxl kam. So stieg der MW des IOP in Messung I11.3 von 14,85 mmHg ($\pm 2,61$ mmHg) auf 23,16 mmHg ($\pm 4,53$ mmHg) in der Nachmessung, bei I12.3 von 12,10 mmHg ($\pm 1,21$ mmHg) auf 20,40 mmHg ($\pm 2,71$ mmHg), bei I13.1 von 5,91 mmHg ($\pm 0,64$ mmHg) auf 8,71 mmHg ($\pm 1,84$ mmHg) und bei I14.3 von 22,96 mmHg ($\pm 0,50$ mmHg) auf 26,93 mmHg ($\pm 1,48$ mmHg). Lediglich bei Messung I14.1 kam es zu einem Druckabfall von 3,28 mmHg absolut. Hier war der MW der Leermessung bei

14,55 mmHg ($\pm 0,82$ mmHg) der MW der Nachmessung lag bei 11,27 mmHg ($\pm 1,88$ mmHg). Lediglich bei der Messung I14.3 war der MW der Leermessung schon in einem höheren Bereich, ansonsten waren insbesondere die Leermessungen im überwiegend physiologischen Bereich. Wie schon in Zahlen beschrieben war bei der Messung I13.1 der MW der Leermessung und auch der MW der Nachmessung eher hypoton.

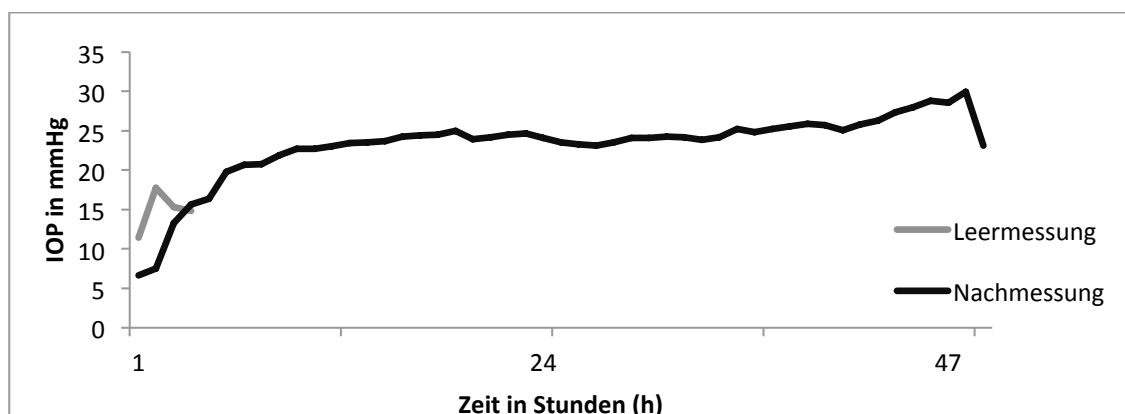


Abbildung 21: Druckverlauf der Messung I11.3. Der Mittelwert der Leermessung beträgt 14,85 mmHg ($\pm 2,61$ mmHg), der Mittelwert der Nachmessung 23,16 mmHg ($\pm 4,53$ mmHg). Der Druckverlauf der Nachmessung ist sehr stabil aber deutlich über den Werten der Leermessung gelegen. Insgesamt beträgt die Drucksteigerung 56 % bzw. 8,31 mmHg.

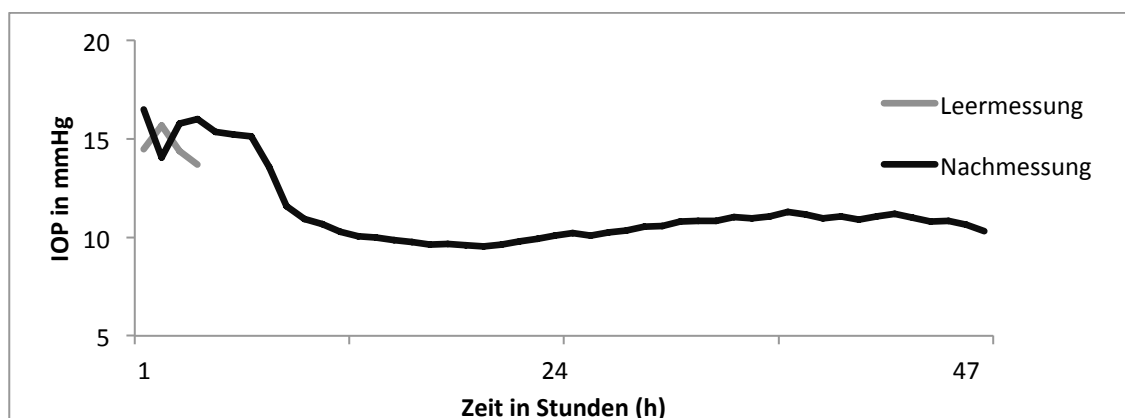


Abbildung 22: Druckverlauf der Messung I14.1. Der Mittelwert der Leermessung liegt bei 14,55 mmHg ($\pm 0,82$ mmHg), der MW der Nachmessung im gesamten beträgt 11,27 mmHg ($\pm 1,88$ mmHg). Im Verlauf liegt der Druck der Nachmessung unter dem der Leermessung. Im Mittel beträgt der Druckabfall 22 % bzw. 3,28 mmHg.

Das statistische Ergebnis, der p-Wert, liegt bei dieser Kohorte bei 0,13 wodurch nicht signifikant gezeigt werden kann, dass Cxl zu einem Druckanstieg im Vorderkammmodell führt. In dieser Kohorte kommt es aber in 4 von 5 Messungen zu einem Druckanstieg. Dieser ist aber nicht immer klinisch

relevant oder erfassbar. Über die gesamte Kohorte kommt es hier aber insgesamt zu einem Anstieg des IOP nach CxI.

Der Mittelwert der Leermessung der gesamten Kohorte liegt bei 14,07 mmHg ($\pm 6,13$ mmHg). Der Mittelwert der Nachmessung der ganzen Kohorte liegt bei 18,09 mmHg ($\pm 7,81$ mmHg). Somit ist der Quotient der Kohorte bei 1,28. Über die gesamte Kohorte kommt es also zu einem Druckerhöhung von 28 % bzw. 4,02 mmHg absolut.

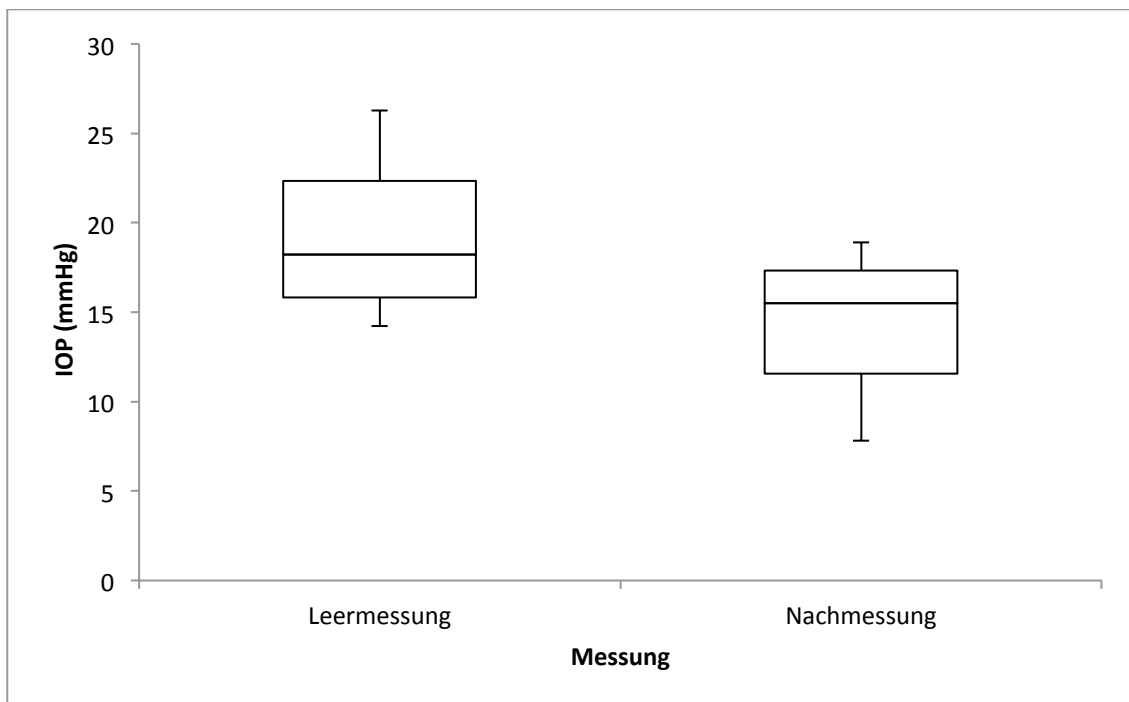


Abbildung 23: Boxplot Diagramm der Interventionskohorte 4. Die Werte der Leermessung sind: Minimum 5,91 mmHg, Maximum 22,96 mmHg, 25 % Quantil 12,10 mmHg, Median 14,55 mmHg, 75 % Quantil 14,85 mmHg. Die Nachmessung hat folgende Werte: Minimum 8,71 mmHg, Maximum 26,93 mmHg, 25 % Quantil 11,27 mmHg, Median 20,40 mmHg, 75 % Quantil 23,16 mmHg.

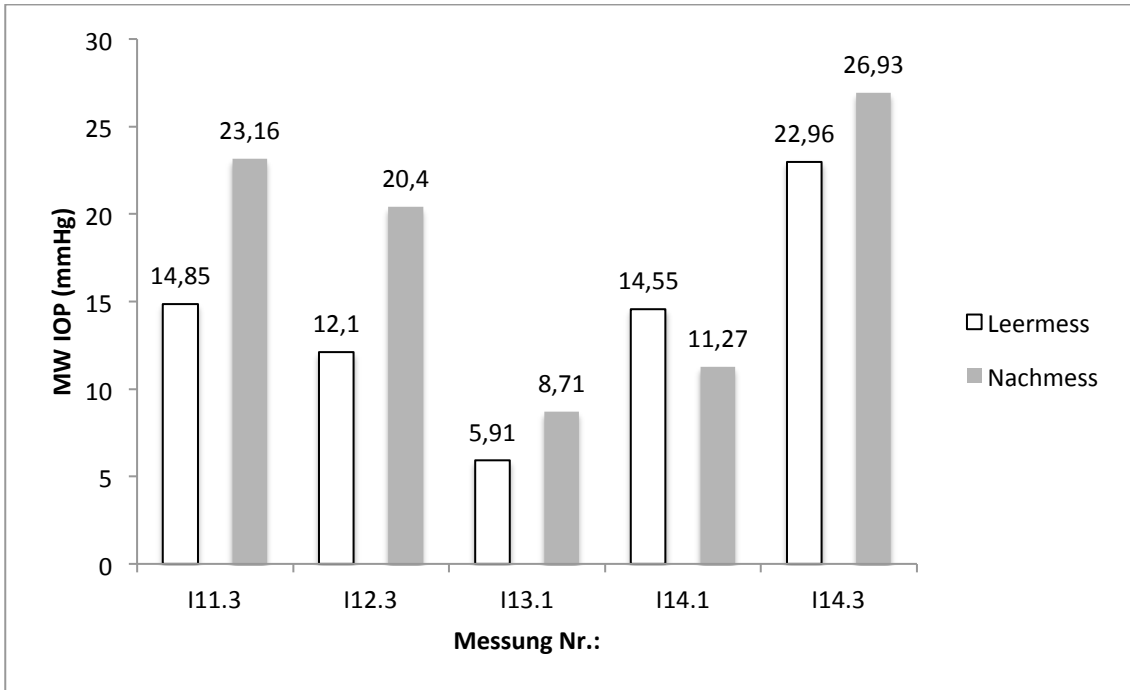


Abbildung 24: Balkendiagramm der Messungen aus Interventionskohorte 4. Hier sind die Mittelwerte der Messungen ohne Standardabweichung im direkten Vergleich dargestellt. Hier ist zu sehen, dass bis auf Messung I14.1 alle Werte der Nachmessungen mehr oder weniger hoch über denen der Leermessung liegen. Ausserdem ist zu erkennen dass bei der Messung I14.3 bereits der Wert der Leermessung erhöht ist.

3.1.5 Interventions-Kohorten Gesamt

Wenn man die Mittelwerte alle Kohorten der Interventionen zusammenfasst stellt sich dies wie folgt dar:

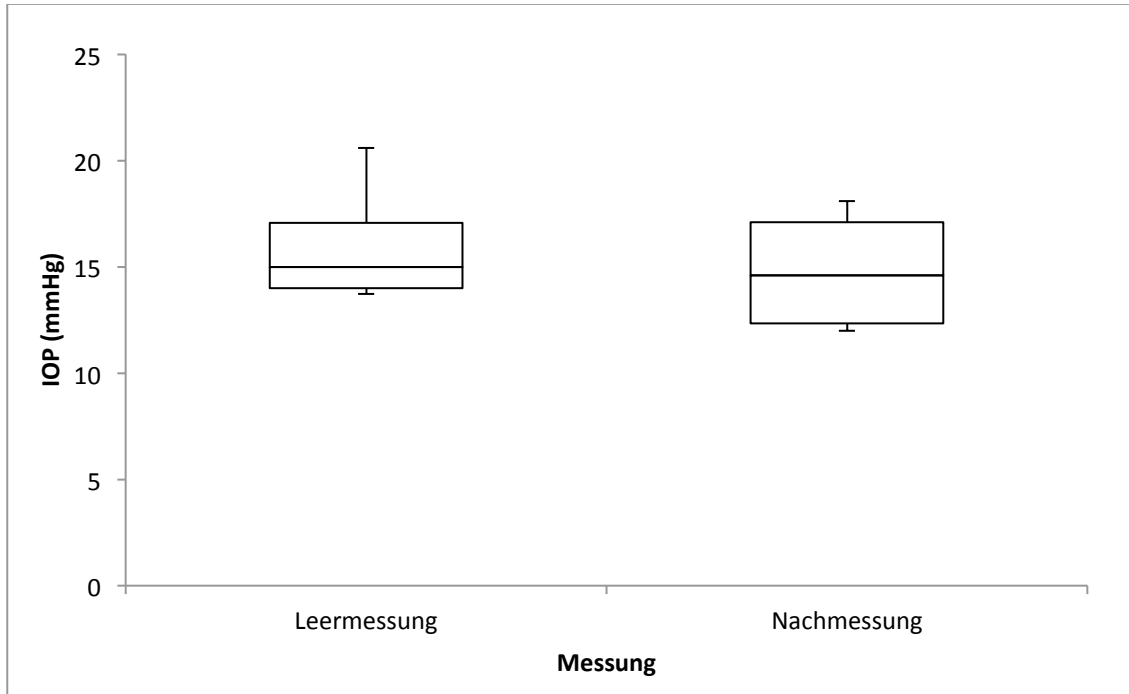


Abbildung 25: Boxplot aller Interventionskohorten basierend auf den absoluten Mittelwerten der Messungen der Kohorten. Hier ist erkennbar dass sich Leermessung und Nachmessung kaum unterscheiden. Die Werte der Leermessung sind: Minimum 13,72 mmHg, Maximum 20,60 mmHg, 25 % Quantil 13,98 mmHg, Median 14,97 mmHg, 75 % Quantil 17,06 mmHg. Die Werte für die Nachmessung liegen bei: Minimum 11,99 mmHg, Maximum 18,09 mmHg, 25 % Quantil 12,33 mmHg, Median 14,61 mmHg, 75 % Quantil 17,11 mmHg. So lässt sich erkennen, dass bei den Mittelwerten der Kohorten sich Leermessung und Nachmessung nur unwesentlich unterscheiden.

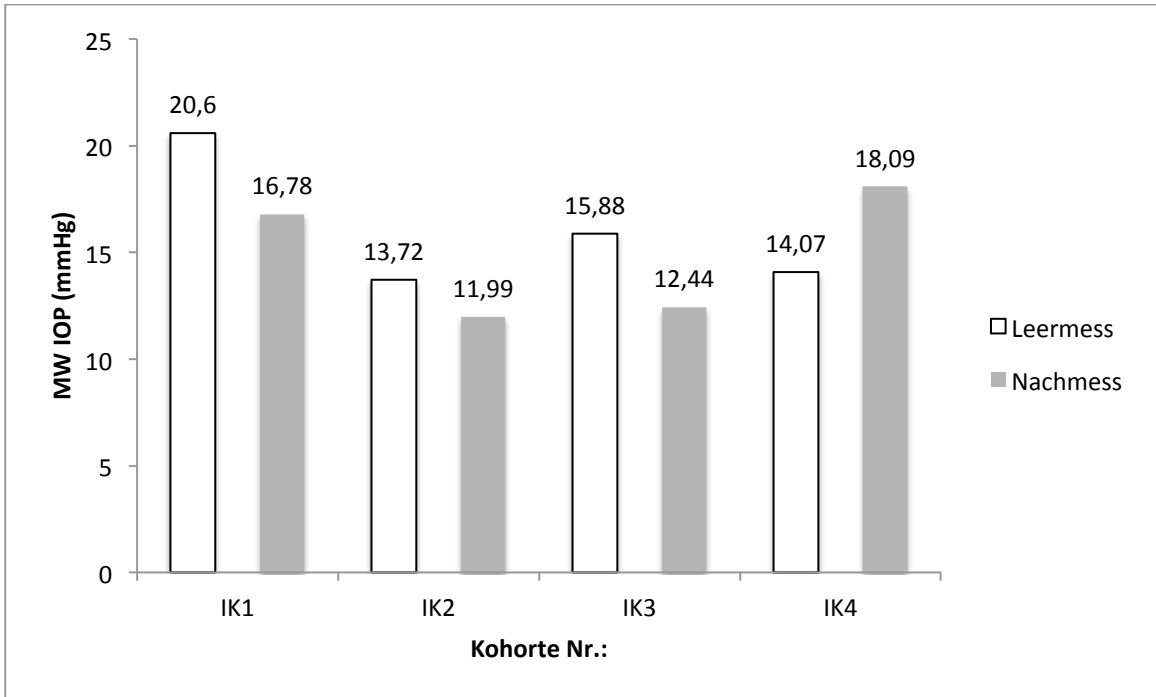


Abbildung 26: Balkendiagramm aller Interventionskohorten. Dargestellt ist der absolute Mittelwert der jeweiligen Kohorte ohne Standardabweichung. Hier ist gut erkennbar, dass im Gesamten der Druck der Nachmessung unter dem der Leermessung liegt, mit Ausnahme bei IK4 wo es nach Cxl zu einer Drucksteigerung kommt.

Der ermittelte Mittelwert der Leermessung über alle Kohorten liegt bei 16,07 mmHg ($\pm 3,17$ mmHg). Der Wert für die Nachmessung liegt bei 14,83 mmHg ($\pm 3,07$ mmHg). Somit ergibt sich ein Quotient von 0,92, sprich über alle Kohorten kommt es zu einem Abfall des IOP um 8 % bzw. 1,30 mmHg. Klinisch würde man hier von einem stabilen Befund sprechen, auch ausgehend von dem zugrunde liegenden Mittelwert.

3.1.6 Kontroll-Kohorte 1

Hier wurden die Messungen K1.1, K2.1, K2.3 sowie K3.1 und K3.3 ausgewertet. Die Messung K1.3 erbrachte keine Messergebnisse da hier der Perfusions-Schlauch nicht korrekt verbunden war und sich so kein Druck aufbaute.

Die Messungen ergaben ein gemischtes Bild; bei zwei Messungen kam es zu einer leichten Druckerhöhung nach der Interventionssimulation (IS), bei dreien zu einer Drucksenkung die mehr oder minder ausgeprägt war. Die Messwerte waren meist im physiologischen oder im hypotonen Bereich wie z.B. bei Messung K3.1; hier war der MW der Leermessung bei 6,84 mmHg ($\pm 1,21$

mmHg) und der MW der Nachmessung dann bei 7,40 mmHg ($\pm 1,33$ mmHg) was einem Druckanstieg von 0,56 mmHg oder 8 % entspricht. Insgesamt sind die Abweichungen zwischen Leer- und Nachmessung im Dezimalbereich, außer bei den Messungen K1.1 und K2.3. Bei K1.1 beträgt der Unterschied zwischen den Messungen +1,24 mmHg absolut und bei K2.3 -1,98 mmHg.

Der p-Wert des t-Testes der Kohorte liegt bei 0,63. Somit kommt es durch die Herausnahme aus dem Inkubator zu keinem statistisch signifikanten Anstieg des IOP. Bei zwei von fünf Messungen kam es zu einem mehr oder weniger ausgeprägten Druckanstieg, beim Rest zu einem Druckabfall.

Der Mittelwert der Leermessung der Kohorte lag bei 9,71 mmHg ($\pm 2,16$ mmHg). Der Mittelwert der Nachmessung der Kohorte liegt bei 9,42 mmHg ($\pm 2,73$ mmHg). Der Quotient der sich hieraus ergibt ist 0,97. Dies entspricht einer Drucksenkung der Nachmessung um 3 % gegenüber der Leermessung. Absolut entspricht dies 0,29 mmHg. Dieser Wert bzw. diese Veränderung wäre mit den üblichen Methoden der IOP Bestimmung in der Klinik nicht erfassbar. Insgesamt zeigt diese Kohorte, dass es durch das Entnehmen und Verändern der Umgebungsbedingungen, Inkubator vs. Raum, keine nennenswerte bzw. relevante Veränderung des IOP der Vorderkammer gibt.

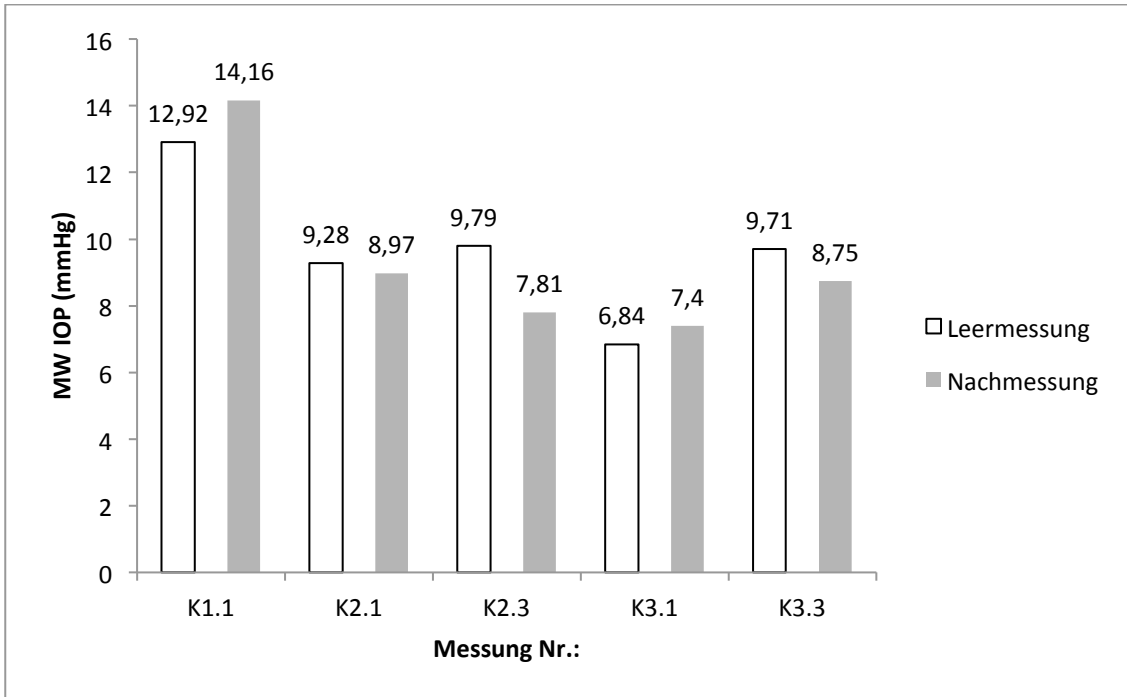


Abbildung 27: Balkendiagramm der Mittelwerte der Messungen aus Kontrollkohorte 1 ohne Standardabweichung im direkten Vergleich. Erkennbar ist hier, dass in den Kontrollen der Umbau alleine keine Auswirkung auf den Druckverlauf zu haben scheint bzw. es durch den Umbau zu keiner Druckerhöhung kommt. Lediglich in den Messungen K1.1 und K3.1 ist eine Erhöhung zu verzeichnen. Insgesamt bewegen sich die Druckänderungen in einem sehr begrenzten Bereich der mit klinischen Messmethoden kaum zu erfassen ist.

3.1.7 Kontroll-Kohorte 2

In dieser Kohorte sind die Messungen K4.1, K4.3, K5.1, K5.3 und K6.1 ausgewertet. Die Messung K6.3 ist Bestandteil der Kontroll-Kohorte 3. Technisch verliefen alle Messungen ohne Schwierigkeiten oder Probleme.

Bei allen Messungen dieser Kohorte kam es nach der IS zu einem mehr oder minder starken Abfall des IOP. Die stärkste Änderung gab es in Messung K5.1; hier betrug der MW der Leermessung 26,27 mmHg ($\pm 1,26$ mmHg), der Mittelwert der Nachmessung betrug 15,52 mmHg ($\pm 4,61$ mmHg). Dies entspricht einem Druckabfall von 41 % bzw. 10,75 mmHg absolut. Die anderen Abweichungen bewegten sich in deutlich geringeren Bereichen. Auch bei Messung 6.1 war jedoch ein hoher Abfall in Prozent zu verzeichnen. Hier war der MW der Leermessung bei 14,23 mmHg ($\pm 0,79$ mmHg) der MW der Nachmessung wiederum war nur bei 7,28 mmHg ($\pm 5,42$ mmHg). Dies entspricht einem Druckabfall von 49% oder 6,95 mmHg. Dies ist insgesamt ein recht hoher Druckverlust. Der IOP war insbesondere am Beginn der

Nachmessung erhöht und fiel dann im Verlauf von Stunden auf ein eher hypotones Niveau.

Der p-Wert des t-Testes ist 0,05. Beim Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ ist man hier gerade an der statistisch gesetzten Grenze. Im Überblick mit den anderen Kohorten kann jedoch die Nullhypothese nicht verworfen werden. Diese Kohorte zeigt sich im Überblick recht hyperten mit teilweise sehr großen Druckunterschieden zwischen Leer- und Nachmessungen. Im Überblick der gesamten Kohorte ist aber ein Druckverlust zu verzeichnen. Die folgende Boxplot-Grafik liefert hierzu ein Bild.

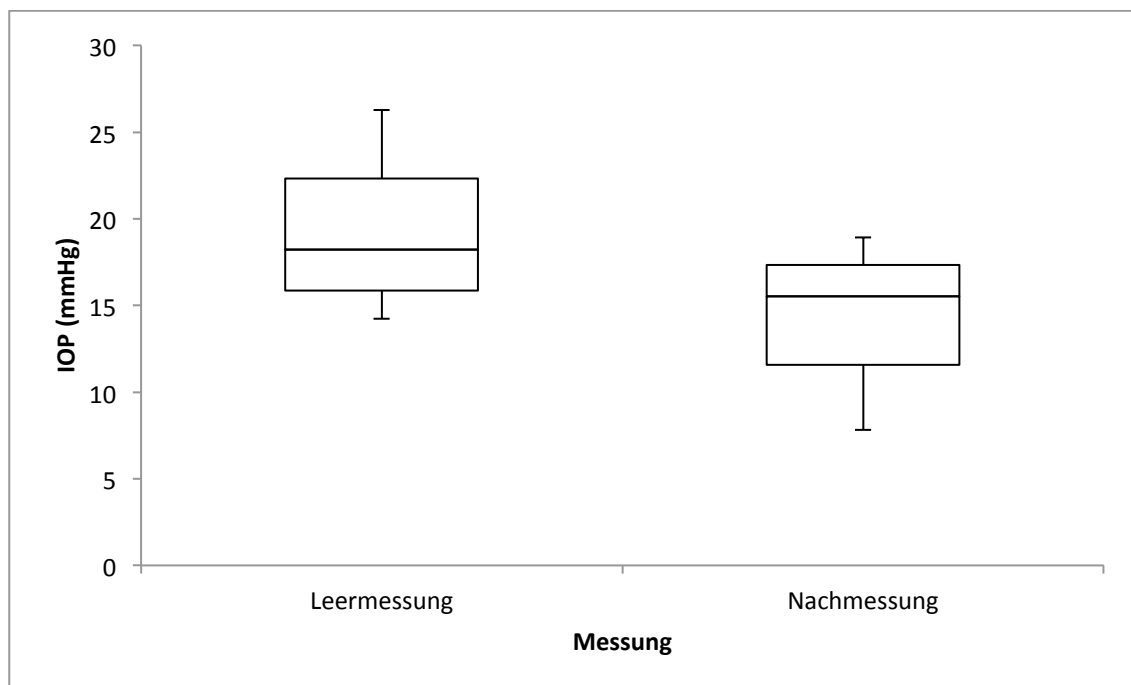


Abbildung 28: Boxplot der gesamten Kohorte KK2. Hier ist zu erkennen, dass insgesamt der Druck der Nachmessung unter dem der Leermessung liegt. Die Werte der Leermessung sind: Minimum 14,23 mmHg, Maximum 26,27 mmHg, 25 % Quantil 15,84 mmHg, Median 18,21 mmHg, 75 % Quantil 22,34 mmHg. Die Nachmessung hat folgende Werte: Minimum 11,57 mmHg, Maximum 18,92 mmHg, 25 % Quantil 11,57 mmHg, Median 15,52 mmHg, 75 % Quantil 17,32 mmHg.

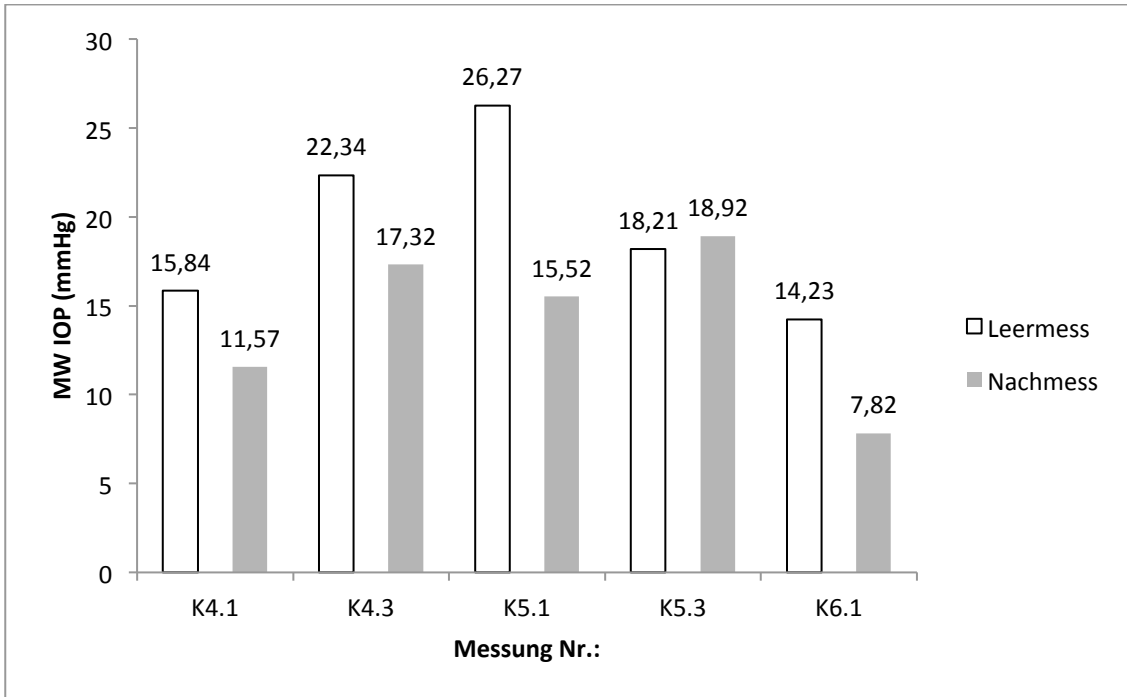


Abbildung 29: Balkendiagramm der Mittelwerte der einzelnen Messungen der KK2 ohne Standardabweichung. Hier sieht man im direkten Vergleich die Drucksteigerung bzw. -senkung. Insbesondere in den Messungen K4.3 und K5.1 sind die Ausgangsdrücke recht hoch. In der Messung K5.1 aber auch in K6.1 sind hierdurch die Druckunterschiede hoch.

Der Mittelwert der Leermessung der gesamten Kohorte liegt bei 19,38 mmHg ($\pm 4,92$ mmHg). Der Mittelwert der Nachmessung der gesamten Kohorte liegt bei 14,23 mmHg ($\pm 4,51$ mmHg). Der Quotient der Kohorte ist somit 0,73. Also liegt der Mitteldruck der Nachmessung 27 % unter demjenigen der Leermessung bzw. 5,15 mmHg absolut. Insgesamt scheint also das Herausnehmen aus dem Inkubator zur Drucksenkung zu führen. Allerdings ist der Wert meist sehr gering, so dass man davon ausgehen kann, dass der Wert durch das Herausnehmen aus dem Inkubator den normalen Schwankungen des biologischen Systems unterliegt.

3.1.8 Kontroll-Kohorte 3

In dieser Kohorte wurden die Messungen K6.3, K7.1, K7.3, K8.3 und K9.3 ausgewertet. Die Messungen K8.1 und K9.1 konnten wegen eines Ausfalls des Messensors an diesem Schenkel nicht verwertet werden. Zu beachten ist außerdem, dass die Messung K9 bereits nach 24 Stunden beendet wurde da hier ein veränderter Zellkulturversuch durchgeführt wurde.

Die einzelnen Messungen zeigen in drei Messungen (K6.3, K7.1 und K9.3) einen deutlichen Abfall des Druckes nach IS bei den zwei anderen Messungen kam es zu keiner nennenswerten Veränderung. Als Beispiel sei hier Messung K7.3 beschrieben bei der gleichzeitig ein recht hoher Druck vorlag. Der MW der Leermessung betrug hier 20,21 mmHg ($\pm 0,77$ mmHg), der MW der Nachmessung lag bei 22,68 mmHg ($\pm 2,41$ mmHg) was einer Druckänderung von + 0,47 mmHg entspricht oder 2 %. Zu einem hohen Druckunterschied kam es in Messung K7.1 wo der MW der Leermessung ebenfalls in einem hohen Bereich bei 24,47 mmHg ($\pm 1,34$ mmHg) lag. Der MW der Nachmessung wiederum war im physiologischen Bereich bei 13,93 mmHg ($\pm 4,36$ mmHg) was einer Drucksenkung von 10,54 mmHg bzw. 43 % entspricht.

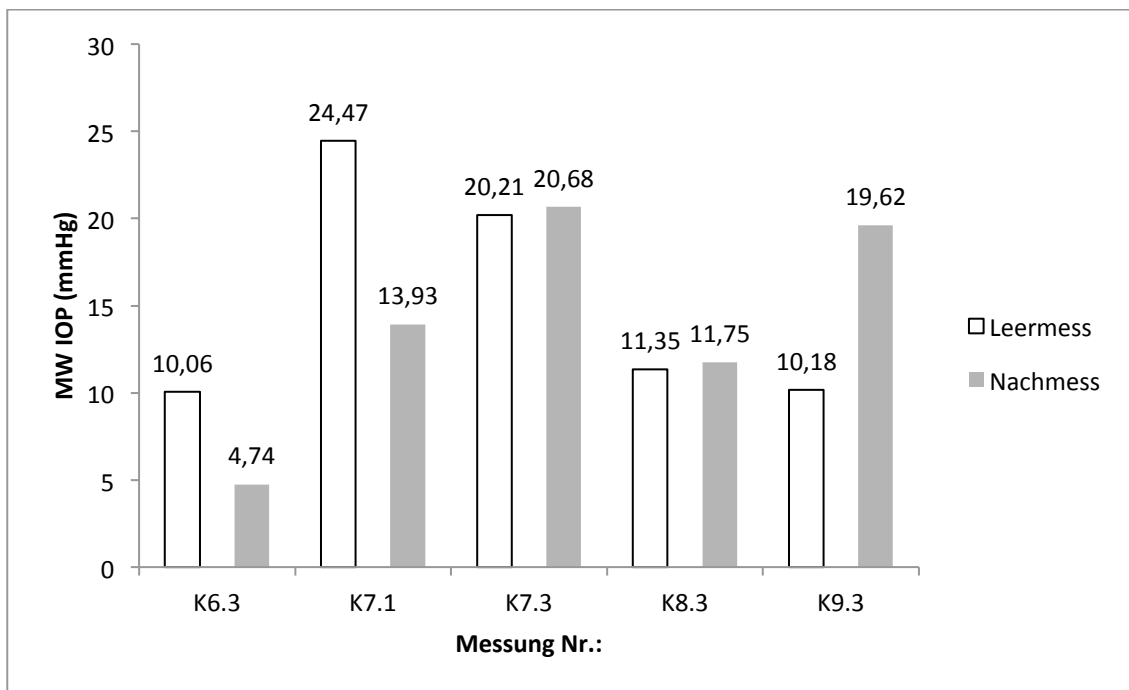


Abbildung 30: Balkendiagramm der Einzelmessungen der Kontroll-Kohorte 3. Sichtbar ist der direkte Vergleich der Mittelwerte der Messungen ohne Standardabweichungen. Lediglich in der Messung K9.3 kommt es zu einer relevanten Erhöhung des IOP in der Nachmessung. Bei den Messungen K7.3 und K8.3 liegt der Unterschied nur im Dezimalbereich weshalb man hier von einem stabilen Druck mit normaler Schwankung innerhalb des biologischen Systems ausgehen kann. Bemerkenswert ist aber noch das der Druck der Leermessungen in K7.1 und K7.3 recht hoch ist.

Der p-Wert der Kohorte liegt bei 0,76. Somit lässt sich hier ebenfalls keine statistisch signifikante Erhöhung nachweisen. Der Mittelwert der Leermessung über die gesamte Kohorte liegt bei 15,25 mmHg ($\pm 6,66$ mmHg). Der Mittelwert der Nachmessung bei 14,14 mmHg ($\pm 6,46$ mmHg). Der Quotient welcher sich

daraus ergibt liegt bei 0,93. Somit kommt es über die gesamte Kohorte zu einer Drucksenkung von 7 % bzw. 1,11 mmHg.

3.1.9 Kontroll-Kohorten Gesamt

Betrachtet man alle Kontrollkohorten zusammen ergibt sich folgendes Bild.

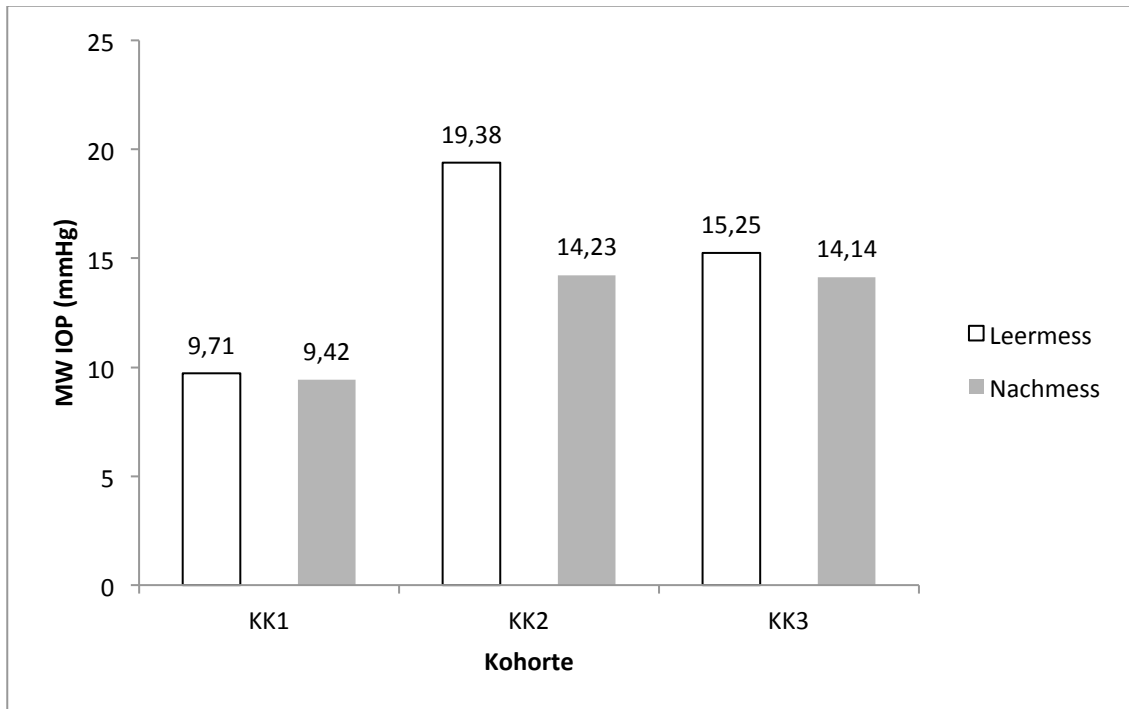


Abbildung 31: Balkendiagramm der gesamten Kontrollkohorten. Sichtbar ist der direkte Vergleich der Mittelwerte der Kohorten ohne Standardabweichung. Gut zu sehen ist, dass der Druck der Nachmessung gleich bzw. leicht unter dem der Leermessung liegt. Die Unterschiede in KK1 wären im klinischen Alltag mit den dort angewendeten Messmethoden nicht nachweisbar. Insgesamt kann der Druckverlauf als stabil beschrieben werden.

Die Diagramme zeigen, dass sich der Druck eher in Richtung Drucksenkung bzw. stabilem Verlauf anordnen. Über alle Kontrollkohorten liegt der Mittelwert der Leermessung bei 14,78 mmHg ($\pm 4,85$ mmHg) und der Mittelwert der Nachmessung bei 12,60 mmHg ($\pm 2,75$ mmHg). Der Quotient der Kontrollkohorten ist 0,85. Somit ist der Druckabfall bei 15 % bzw. 2,18 mmHg absolut. Dieser Absolutwert würde als stabil bezeichnet werden, auch weil die Mittelwerte selbst im physiologischen Bereich lagen und die Schwankungen auch im physiologischen Bereich stattfanden. Zwar waren einzelne Maximalwerte deutlich hyperten, in der Gesamtbetrachtung fallen diese jedoch kaum ins Gewicht, da sie immer nur kurzfristig vorherrschten.

3.2 Zellkulturen der Vorderkammer

3.2.1 Zellkultur aus Trabekelmaschenwerkzellen aus der Druckmessung

Aus 5 Druckmessversuchen wurde am Ende der 48 h-Messung Trabekelmaschenwerk entnommen und in Kultur gebracht (vgl. Kap. 2.2.2). Es zeigte sich jedoch in keinem der Wells ein zufriedenstellendes Wachstum. Es waren bereits nach ca. 7-10 Tagen nur noch Zelltrümmer zu finden. Auch aus dem Versuch K9 der bereits nach 24 h Nachmessung beendet wurde konnte keine Kultur gezüchtet werden. Hier zeigte sich nach ca. 29 Tagen, dass die Zellen nicht anwachsen und absterben. Bei der Isolation aus Versuch 17 war bereits nach 5 Tagen kein Wachstum sondern eine Zelllyse zu sehen. Insgesamt war zu keiner Zeit während der Inkubation ein ausreichendes Zellwachstum oder eine Adhärenz der Zellen zu erreichen, so dass hier auch keine weiteren Versuche hatten stattfinden können. Auch eine Überführung in eine Zellkulturflasche war somit nicht möglich.

3.2.2 Zellkultur aus Trabekelmaschenwerkzellen ohne Druckmessung

Da sich in den Kulturen, die aus den Druckmessungen entnommen wurden, kein Wachstum zeigte (vgl. Kap. 3.2.1), wurde dieser Versuch eingeschoben, um zu überprüfen nach welcher Zeit im P-Medium sich noch Zellen erfolgreich kultivieren lassen. Hierbei wurde das Wachstum semiquantitativ bewertet (vgl. Kap. 2.2.2.3), beim Passagieren dann das Diluent ausgezählt (vgl. Kap. 2.2.2.5)

3.2.2.1 6 Stunden Inkubation in P-Medium

Nach 6 stündiger Inkubation im P-Medium wurde Tabekelmaschenwerk isoliert und entsprechend der Beschreibung im Methodenteil inkubiert. Elf Tage nach der Präparation zeigten sich in den Wells des Versuchs 6/II folgende Wachstumsraten:

Reihe/Spalte	3	4	5	6
C	++	++	+	+
D	+	++	+	+++

Tabelle 1: Semiquantitative Beurteilung der Wachstumsrate des Versuch 6/II, 11 Tage nach Isolation in die Well-Platte. Stufen: 0,+,++,+++

Nach 24 Tagen zeigte sich folgende Verteilung:

Reihe/Spalte	3	4	5	6
C	+++	++	++	++
D	++	+++	++	+++

Tabelle 2: Semiquantitative Beurteilung der Wachstumsrate des Versuch 6/II, 24 Tage nach Isolation. Stufen: 0,+,++,+++

Danach wurden die Zellen in eine Kulturflasche überführt, jeweils eine Reihe in eine Kulturflasche. Nach der Zentrifugation und Dilution zeigten sich folgenden Zellzahlen:

- 6II/a 4×10^4 Zellen/ml
- 6II/b: 5×10^4 Zellen/ml

Versuch 6/I wurde nach 18 Tagen in die Zellkulturflasche überführt, hier wurden 1×10^4 Zellen/ml ermittelt. Im weiteren Verlauf zeigte sich dann in allen Flaschen ein Wachstum mit der Bewertung „++“ über mehrere Wochen. Nach insgesamt 3 Passagen und 97 Tagen Kulturzeit zeigten sich in den sechs Stunden Kulturen folgende Zellzahlen:

- 6/I: 29×10^4 Zellen/ml
- 6II/a: 41×10^4 Zellen/ml
- 6II/b: 41×10^4 Zellen/ml

3.2.2.2 12 Stunden Inkubation in P-Medium

Nach der 12-stündigen Inkubation im P-Medium wurde entsprechend dem Methodenteil Trabekelmaschenwerkzellen isoliert. Hier zeigte sich bereits ein mäßiges Aufquellen des Vorderkammerngewebes. Die Isolation von Gewebe war jedoch problemlos möglich. Nach sechs Tagen zeigte sich folgendes Wachstumsmuster:

Reihe/Spalte	3	4	5	6
C	+	+	+	+
D	+	++	++	+

Tabelle 3: Semiquantitative Beurteilung der Wachstumsrate Versuch 12h, 6 Tage nach Isolation. Stufen: 0,+,++,+++

Nach 12 Tagen sah die Wachstumsrate folgendermaßen aus:

Reihe/Spalte	3	4	5	6
C	+	+	+++	+
D	+	++	++	++

Tabelle 4: Semiquantitative Beurteilung der Wachstumsrate Versuch 12h. 12 Tage nach Isolation. Stufen: 0,+,++,+++

Nachdem die Zellen ausreichend gewachsen und adhären waren wurden sie am Tag 18 in Zellkulturflaschen überführt, ebenso wurde wieder eine Reihe der Wellplatte in eine Flasche überführt (vgl. Kap.: 2.2.2.2 und 2.2.2.6.3). Die Auszählung der Zellen nach Dilution ergab:

- 12a: 6×10^4 Zellen/ml,
- 12b: 3×10^4 Zellen/ml

In den folgenden Wochen wurde die Kultur drei mal passagiert, die semiquantitative Beurteilung war meist „+++“. Die Zellzahlen nach Dilution stiegen am 66. Tag an auf:

- 12a 10×10^4 Zellen/ml
- 12b: 13×10^4 Zellen/ml

am 97. Tag:

- 12a: 33×10^4 Zellen/ml
- 12b: 37×10^4 Zellen/ml

3.2.2.3 18 Stunden Inkubation in P-Medium

Nach 18-stündiger Inkubation in P-Medium ließ sich nur noch aus 4 Augen Trabekelmaschenwerk isolieren. Bei den restlichen Augen war das Gewebe teils sehr geschwollen, so dass sich keine Gewebestreifen abziehen ließen. Die Gewebestreifen aus den 4 Augen bei denen es dennoch möglich war wurden entsprechend dem Protokoll inkubiert. Die Kontrolle am Tag 6 ergab kein

Zellwachstum in den Wells. Es fanden sich lediglich Pigmentreste und Zelldebris. Deshalb wurde der Versuch hier nicht weiter geführt.

3.3 TUNEL-Färbung

Wie bereits in Kapitel 2.2.2.7 beschrieben dient die TUNEL Färbung dazu zu zeigen, dass durch die Organkultur keine Beeinflussung der Funktion des Trabekelmaschenwerks durch übermäßige Apoptose geschieht. Hierzu wurde in einen separaten Versuch aus jeweils zwei Kontrollaugen und zwei Augen die sich 48 h im Versuchsaufbau befanden eine TUNEL-Färbung durchgeführt und ausgewertet.

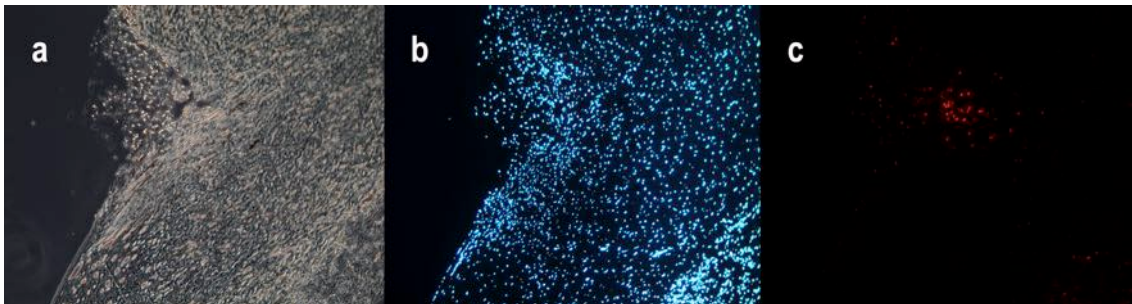


Abbildung 32: (a) Auflichtmikroskopie zur Darstellung des Trabekelmaschenwerks. (b) DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. (c) Färbung der toten Zellen mittels TUNEL-Färbung.

Bereits auf den Bildern ist zu erkennen, dass nur ein sehr kleiner Anteil apoptotischer Zellen zu sehen ist. Mittels Softwareunterstützung (Openlab, Improvion) wurden die Zellzahlen erfasst. Hierbei stellt sich heraus, dass im Mittel 3,95 % (SD: $\pm 1,84\%$) der Zellen im Organschnitt tote Zellen waren, während in den Kontrollen im Mittel 7 % tote Zellen zu finden waren.

3.4 Ultrastrukturelle Analyse und Beschreibung der Vorderkammerschnitte

Die Morphologie des JCT und des Kammerwasserplexus, oder wie in der internationalen Literatur genannt „angular aqueous plexus“ (AAP), unterscheidet sich kaum von der Konfiguration beim Menschen. Der AAP bildet beim Schwein das Äquivalent zum Schlemm'schen Kanal beim Menschen.

Das dreidimensionale Geflecht aus Trabekeln, bestehend aus elastischen Fasern und Kollagenen sowie amorpher Grundsubstanz, erscheint in allen

Proben gleich gestaltet. Es findet sich, wie in Kap. 1.1.2.1 beschrieben, ein Kern aus elektronendichten Fasern und hellem Material, umgeben von einer homogen erscheinenden Hülle. Diese Hülle wiederum ist durch feine Fibrillen mit den benachbarten Zellen verbunden. Es findet sich hier im Vergleich zwischen Kontrolle und Intervention keine Verdickung oder Verminderung dieser Strukturen. Die Trabekelmaschenwerk-Zellen in diesem Bereich sind eher dendriform und stehen über lange Fortsätze untereinander oder mit der EZM in Kontakt. Die Zellen enthalten teils reichlich rER und Vesikel mit Lipiden, aber auch Zellen mit wenig rER sind enthalten. Im Vergleich zwischen Interventionsaugen und den Kontrollen finden sich hier aber keine Unterschiede bzgl. der Zellaktivierung. Ebenfalls konnte nicht nachgewiesen werden, dass in den Interventionsaugen vermehrt Makrophagen zu finden sind. An manchen Zellen ist die Phagozytose zu beobachten zu der die TM-Zellen befähigt sind. Hier zeigt sich auch, dass bei der sorgfältigen Präparation nur wenig Pigment in die Vorderkammer gelangt ist. Vermehrte Apoptose oder Pyknose der Zellen ist in keinem der Schnitte zu beobachten. Es finden sich auch keinerlei Nekrosen.

Die „Loops“ des AAP sind mit Endothelzellen ausgekleidet, die Basalmembran dieser Loops ist nicht kontinuierlich. Eine Verdickung der Basalmembran als Folge einer Schädigung kann in keinem der Schnitte gesehen werden. Die elastischen Fasern des subendothelialen EZM sind mit feinfibrillärem Material mit den Endothelzellen verbunden. In diesem Teil finden sich des Weiteren Kollagenfasern und optisch leere Bereiche, vor allem dort wo keine Basalmembran zu finden ist. Ebendort sind immer wieder die Riesen-Vakuolen zu finden die als charakteristisches Merkmal des Endothels beschrieben werden.

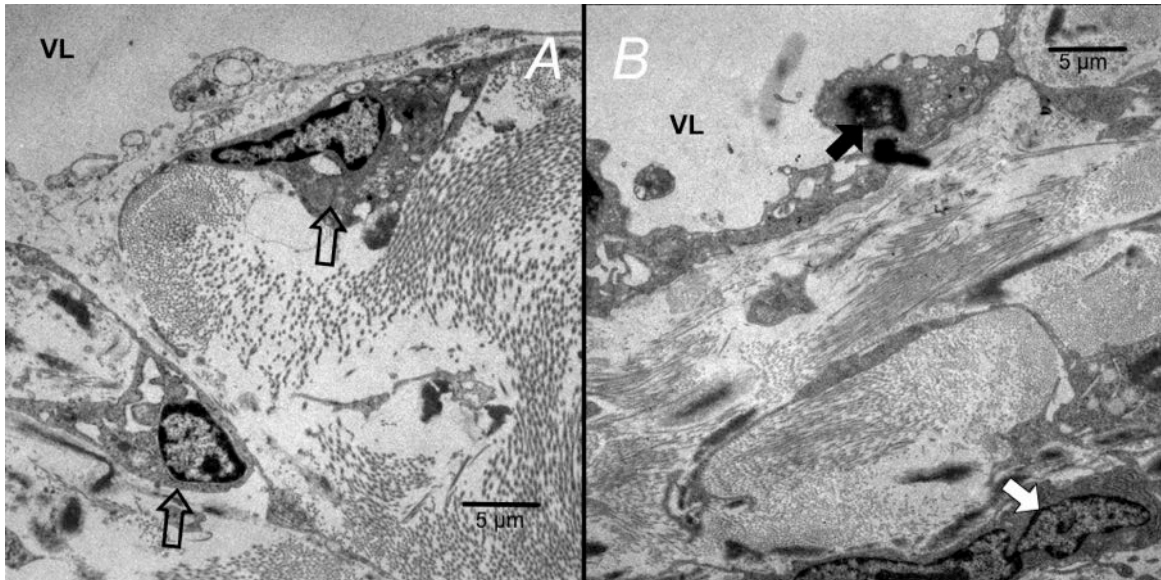


Abbildung 33: Vergleich des Endothelbereichs zwischen (A) Intervention I2.1 und (B) Kontrolle K6.3. (A): Vergrößerung 3000-fach. Zu sehen ist ein Vessel Loop bzw. Kollektorgefäß des AAP (VL) sowie Anschnitte von Endothelzellen (farblose Pfeile), erkennbar ist auch das EZM aus Kollagen, das hier v. a. horizontal angeschnitten und nicht verdickt ist. (B): Vergrößerung 3000-fach. Zu sehen ist ein Vessel Loop (VL) sowie Anschnitte von Endothelzellen mit Nucleus (schwarzer Pfeil). Im Bild ist außerdem eine TM-Zelle (weißer Pfeil). In der EZM sind Kollagene zu sehen, die überwiegend tangential geschnitten sind. Hier ist ebenfalls keine Verdickung oder Veränderung sichtbar. Teilweise ist die Basalmembran erkennbar, die nicht verdickt ist.

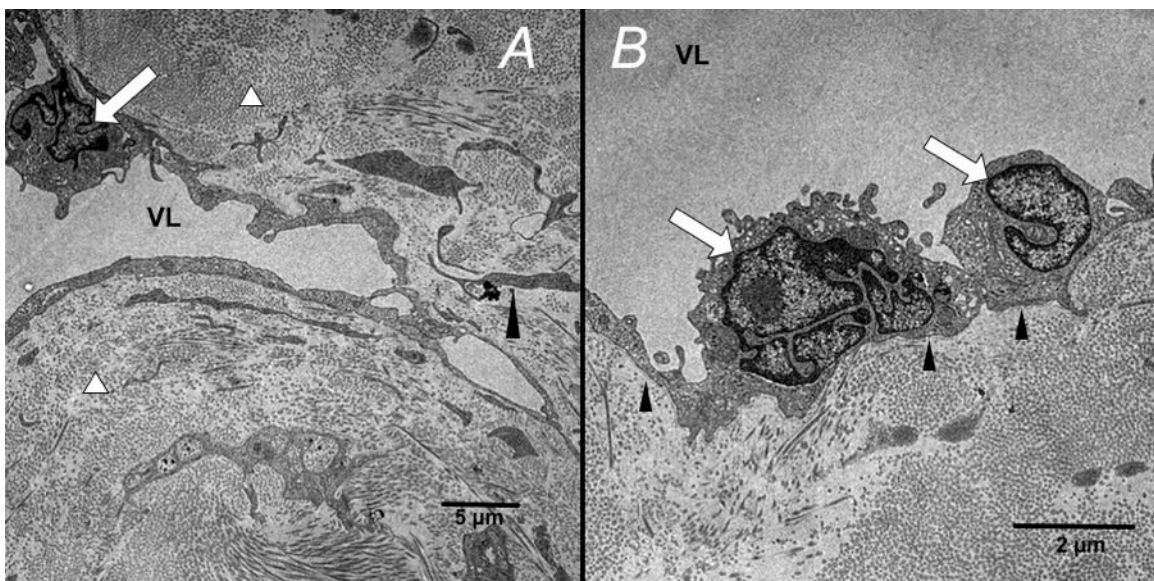


Abbildung 34: Ausschnitte aus dem Präparat aus Intervention I2.1. (A): Vergrößerung 3000-fach. Kollektorgefäß (VL) und Umgebung in der Übersicht. Erkennbar ist eine vorgewölbte Endothelzelle (weißer Pfeil) sowie Anschnitte weiterer Zellen (schwarze Pfeilspitze). Subendothelial ist die EZM aus Kollagenen zu erkennen (weiße Dreiecke), die ein unterschiedlich orientiertes Netzwerk ergeben. (B): Vergrößerung 4400-fach. Zwei nebeneinander liegende Nuclei von Endothelzellen (weiße Pfeile). VL kennzeichnet den luminalen Bereich eines Loops. Die schwarzen Pfeilspitzen zeigen auf die erkennbare Basalmembran die nicht verdickt und regelrecht konfiguriert ist. Subendothelial ist wieder das Netzwerk aus unterschiedlich orientierten Kollagenfasern zu erkennen.

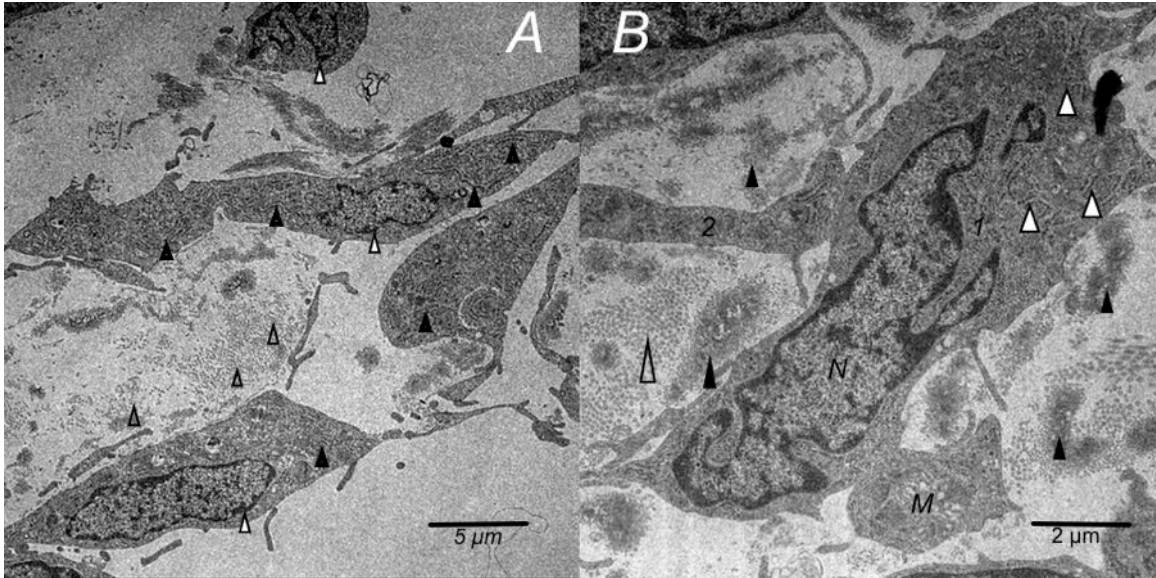


Abbildung 35: Ausschnitte aus dem Präparat aus Intervention I2.1. (A): Vergrößerung 3000-fach. Mehrere TM-Zellen im Anschnitt. Sichtbar ist der Zellkern (weiße Pfeilspritze) sowie raues Endoplasmatisches Retikulum (rER) (schwarze Pfeilspitzen). Extrazellulär sind Kollagenfasern zu sehen (farblose Pfeilspitzen). (B): Vergrößerung 7000-fach. TM Zelle (1) sowie benachbarte Zelle (2) mit Zellkontakt. In Zelle 1 ist der Kern (N) und Mitochondrien (M) zu sehen, ebenso wie rER (weiße Pfeilspitzen). Im Extrazellularraum sind feinfibrilläre Strukturen, am ehesten, aus Kollagen Typ IV (schwarze Pfeilspitzen) sowie Typ I und III (farblose Pfeilspitze) zu sehen. Insgesamt ist hier keine Veränderung zwischen Intervention und Kontrolle oder der Beschreibung in der Literatur zu sehen. Es finden sich keine Anzeichen einer übermäßigen Zellaktivierung wie Vermehrung von rER oder vermehrte Vesikelbildung.

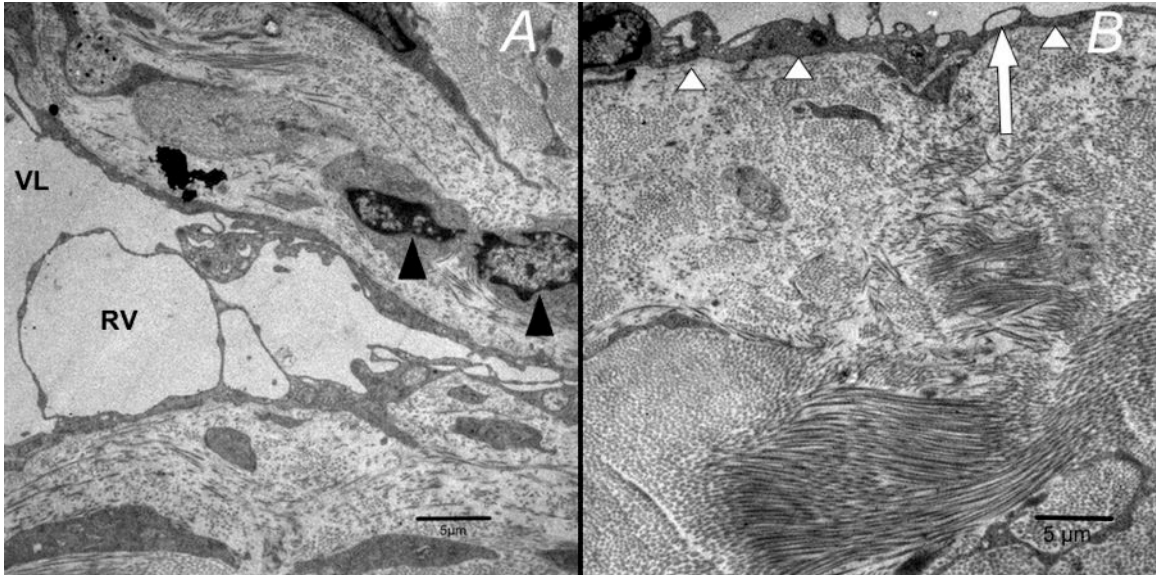


Abbildung 36: Ausschnitt aus dem Präparat von Kontrolle K6.3. (A): Vergrößerung 3000-fach. Zu sehen ist ein Anschnitt eines Kollektorgefäßes (VL) und eine Riesenvakuole (RV) hier ohne Pore. Die schwarzen Pfeilspitzen kennzeichnen Zellkerne von Endothelzellen. Zu sehen ist auch etwas Pigment das hier komplett schwarz erscheint. (B): Vergrößerung 3000-fach. Das Bild zeigt noch einmal einen Anschnitt durch das subendotheliale Netzwerk von Kollagenfasern die in unterschiedlicher Orientierung organisiert sind. Die weißen Dreiecke zeigen die Basalmembran, während der weiße Pfeil eine in Entstehung befindliche Vakuole zeigt.

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es die Auswirkung des Crosslinkings auf den intraokularen Druck zu untersuchen. Darüber ließen sich auch Rückschlüsse auf bereits durchgeführte in-vivo Untersuchungen ziehen, die widersprüchliche Ergebnisse bzgl. des IOP-Verlaufes geben [124, 129, 160-163]. Um den Einfluss der Manipulationen am Messaufbau abschätzen zu können wurden Messungen ohne Bestrahlung oder Riboflavinanwendung durchgeführt. Hier wurden lediglich die Entnahme aus dem Inkubator durchgeführt. Ein weiterer Versuchsteil war die Anzucht von Zellkulturen und die Analyse von ultradünnen Schnitten mit dem Transmissionselektronenmikroskop. Beides diente der Evaluation der Methode und der besseren Einordnung der Druckbefunde [166].

4.1 Diskussion der Ergebnisse der Methodvalidation

Die Validität der Methode als solches wurde bereits in mehreren Untersuchungen festgestellt, ebenso die Übertragbarkeit des Modells Schwein auf den Menschen [165-168, 171]. In der vorliegenden Arbeit konnte die Funktion der Methode insbesondere durch das Ergebnis der TUNEL-Färbung gezeigt werden, bei der nur ein minimaler Teil apoptotischer Zellen von 3,95 % ($\pm 1,84$ %) nachgewiesen werden konnte. Hieraus ist ersichtlich dass das Trabekelmaschenwerk intakt und funktionstüchtig ist. Da dies ein wesentlicher Punkt für die Regulation des IOP ist, ist das Modell valide [10, 43]. Auch die Druckwerte scheinen plausibel, nicht zuletzt auch in der Zusammenschau mit den Befunden der Transmissionselektronenmikroskopie wie sie von Pang et al. empfohlen ist [166]. Allerdings wurden hier nur Stichproben untersucht. In einem weiteren Versuch sollten alle Vorderkammern einer entsprechenden Analyse unterzogen werden.

Warum sich aus den Vorderkammern nach 24 h und 48 h keine Zellkulturen anzüchten ließen bleibt unklar. So gelten die Trabekelmaschenwerkzellen insgesamt als schwer anzüchtbar [172, 173] konnten aber aus den frischen Augen ohne Probleme entnommen und in Kultur gebracht werden. Lediglich die Entnahme aus den Druckversuchen bzw. nach > 12 h im Medium gelang nicht. Vielleicht spielen hier mehreren Faktoren eine Rolle wie z.B. Temperatur, pH-

Wert und Medium-Zusammensetzung, die zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Traumatisierung führen. Zumal die TUNEL-Färbung zeigt, dass selbst nach 48 h im Medium bzw. Versuchsaufbau nur eine geringe Zellzahl apoptotisch ist. Am plausibelsten scheint momentan zu sein, dass die Traumatisierung bei der Präparation zu groß war und deshalb die Zellen nicht mehr angewachsen sind. Vielleicht ist auch die Präparationsmethode selbst ungenügend. Eine Präparation mit Skalpell könnte schonender sein, birgt aber die Gefahr weitere Zelltypen aus Kornea oder Sklera mit in die Kultur zu bringen. Zumal zur Zeit kein spezifischer Marker zur Differenzierung von Trabekelmaschenwerkzellen existiert.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der Druckmessung

Zwar kam es vereinzelt in den Messungen zu einer Erhöhung des IOP nach Cxl, aber in den Kohorten ließ sich keine statistisch signifikante Erhöhung im Beobachtungszeitraum feststellen. Insgesamt kam es in der Nachmessung eher zu einer Verringerung des IOP im Vergleich zur Leermessung, was ein Effekt des Vorderkammermodells sein könnte. Die Kontrollkohorten konnten zeigen, dass der Umbau bzw. die Entnahme aus dem Inkubator keinen eigenen störenden Einfluss auf den Verlauf der Werte hatte, was zeigt das Druckänderungen auf das Cxl oder auf andere störende Einflüsse zurückzuführen wären. So zeigte sich z.B. im Versuch K6.1 dass eine Verschleppung von Pigment durchaus Einfluss auf die Messung nehmen könnte und bekanntermaßen den IOP stark erhöhen kann [165, 174]. Wie aber bereits in Kapitel 2.2.1.1 und 4.1 beschrieben wurde bei der Präparation darauf geachtet dass kaum Pigment freigesetzt und verschleppt wird. Die EM- Bilder zeigen stichprobenartig dass dies auch gut gelungen ist, da hier kaum Pigment vorhanden ist.

Im Vergleich zu den in vivo Studien von z.B. Kymionis et al. [160] wurde hier direkt in der Vorderkammer und nicht mittels Applanationstonometrie gemessen. Wie bereits in verschiedenen anderen Arbeiten gezeigt wurde, ist gerade die Applanationsmessung nach Goldmann (GAP) sehr von den Parametern der Kornea abhängig. So z.B. von der Dicke und Steifigkeit der

Kornea [175, 176]. Bereits Romppainen et al. konnte in seiner ex vivo Studie zeigen, dass die Applanationsverfahren, aber auch die Non-touch Techniken, nach Cxl den IOP zu hoch einschätzen. Am akkuratesten scheint noch die Dynamische Kontour-Tonometrie (DCT) zu sein [164]. Neuere in vivo Studien bestätigen dieses Ergebnis [177, 178]. Interessanterweise kommt Gkika et al. zu dem Ergebnis, dass postoperativ alle Verfahren den Druck als zu hoch einschätzen, während Firat et al. beschreiben dass das Goldman-Tonometer bei Keratokonus präoperativ eher zu niedrige Werte zeigt [176, 177]. Dies lässt die Arbeit von Kymionis et al. in einem anderen Licht erscheinen. Es wäre durchaus möglich, dass die Baseline IOP vor Cxl zu niedrig und die folgenden mit GAP gemessenen Werte zu hoch gemessen wurden und somit nicht den wahren IOP wiedergeben. Hier zeigt unser Modell seinen Vorteil da hier der Druck ohne diese Einflüsse gemessen werden konnte. In der Gesamtschau scheint der Goldstandard der IOP Messung das GAP speziell bei Kornea affektierenden Erkrankungen nicht das Mittel der Wahl zu sein, da sie sehr durch die Parameter der Kornea beeinflusst ist; insbesondere die Dicke der Kornea spielt eine wesentliche Rolle [176, 179-181]. Diese ist speziell beim Keratokonus vermindert. Auch ist nach der Cxl-Prozedur die Kornea v.a. im vorderen Teil deutlich steifer [51, 61, 63, 124, 182]. Hier scheint die von den Korneaparametern nahezu unabhängige DCT besser geeignet zu sein.

Die vorliegende Arbeit stützt die Annahme und Beobachtung dass der IOP durch das Cxl nicht beeinflusst wird bzw. es zu keiner signifikanten Erhöhung des IOP kommt. Vielmehr scheint hier der Schluss naheliegend dass die IOP Messmethoden der in vivo-Studien zu sehr durch die kornealen Veränderungen beeinflusst werden. Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals diese Fragestellung bearbeitet ohne dass die veränderte Biomechanik der Kornea die Mess- und Druckwerte beeinflusst. Die Arbeit beweist aber nicht, dass es zu keiner IOP Erhöhung kommt, weil hier kein Langzeitverlauf abgebildet werden kann. Insbesondere könnten Veränderungen am Trabekelmaschenwerk erst im Verlauf auftreten z.B. durch Induktion einer entzündlichen Reaktion. In dieser Versuchsreihe konnten keine morphologischen Veränderungen am Trabekelmaschenwerk oder dem Kammerwasserplexus festgestellt werden, der

als Hauptwiderstand im Kammerwasserabfluss gilt [9-11, 13, 14]. Die als ursächlich angesehenen Plaques konnten in der Elektronenmikroskopie in den untersuchten Proben nicht nachgewiesen werden, wobei unklar bleibt ob die Plaques eine reine Altersreaktion sind oder die Entstehung dieser Plaques induziert werden kann. Meist wird die Plaquebildung jedoch als Altersreaktion angesehen, die bei den jungen Schweinen noch nicht vorzufinden ist [9, 10, 20, 168]. Eine entsprechende Aktivierung der Zellen konnte auch nicht gezeigt werden. Ein weiterer Aspekt ist die Entstehung eines Glaukoms durch oxidativen Stress am TM wie er von Welge-Lüssen et al. [183] beschrieben wird. Möglich wäre durchaus, dass durch die UV-Bestrahlung vermehrt oxidativer Stress jenseits der Kornea ausgelöst wird; dies jedoch scheint durch die Untersuchungen und die photochemischen Erkenntnisse eher unwahrscheinlich. Zum einen wird der meiste Anteil der UV Strahlung innerhalb des Korneastromas resorbiert und die Radikale wie der Singulett-Sauerstoff sind sehr kurzlebig [108, 119, 121, 122]. Des Weiteren ist das Riboflavin zeitgleich als Antioxidans aktiv [119, 137]. Bei Beachtung der Einwirkzeiten, Energiemengen und Kontraindikationen der CxI Behandlung dürfte dies kein Problem darstellen. In der Folge sollte meiner Meinung nach nun insbesondere untersucht werden wie sich der Druck über einen längeren Untersuchungszeitraum verhält. Auch scheint die Frage interessant inwieweit es zu einem veränderten Expressionsmuster von EZM oder Mediatoren kommt. Hierzu wären, wie schon erwähnt, weitere Untersuchungen speziell mit den Zellkulturen notwendig, ggf. mit einem angepassten Protokoll, um genügend Material nach dem Vorderkammerversuch anzüchten zu können; zumal die Ergebnisse der TUNEL-Färbung zeigen das reichlich vitales Trabekelmaschenwerk vorhanden ist.

4.3 Beantwortung der Fragestellung

Innerhalb des Beobachtungszeitraums konnte keine signifikante Erhöhung des IOP nach CxI nachgewiesen werden. In den EM-Schnitten zeigten sich keine morphologischen Veränderungen im Sinne einer Inflammation, Aktivierung oder Plaquebildung. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass durch das CxI im Kurzzeitverlauf keine IOP Erhöhung in der isolierten porcinen

Vorderkammer ausgelöst wird. Dies liefert den Hinweis, dass die in den in-vivo Studien erhöhten IOP Ergebnisse eher durch die biomechanischen Veränderungen und deren Einfluss auf die jeweilige Messmethode verursacht wurden. Diese Ergebnisse sollten jedoch vorsichtig in den klinischen Alltag transferiert werden: Für die Patientenversorgung könnte dies heißen, dass für die Beurteilung des individuellen Risikos idealerweise mittels DCT der Ausgangs-IOP bestimmt wird und ebenso im Verlauf mit dieser Methode der IOP bestimmt wird. Eine engmaschige Nachsorge der meist sehr jungen Keratokonus Patienten erscheint sehr wichtig. Auch wenn die Progression des Keratokonus laut aktueller Studienlage aufgehalten wird, ist eine lebenslange Mitbehandlung durch den Augenarzt wichtig um rechtzeitig ein IOP Erhöhung festzustellen und deren Folgen wie z.B. das Glaukom zu verhindern. Es erscheint trotz der positiven Tendenz der vorliegenden Arbeit sinnvoll die Patienten über das Risiko einer IOP Erhöhung nach Cxl aufzuklären, da die momentane Datenlage dies nicht ausschließen kann und auch in der vorliegenden Arbeit bei einzelnen Augen eine Erhöhung zu verzeichnen war. Die Langzeitfolgen bzw. der Langzeitverlauf lässt sich in dieser in vitro Studie nicht abbilden. Weitere Untersuchungen scheinen sinnvoll, insbesondere in Richtung der Trabekelmaschenwerkzellen und etwaiger Veränderungen auf der Ebene der Proteinbiosynthese.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage ob sich nach Cxl-Behandlung intraokular ein Anstieg des IOP feststellen lässt. Ziel war es, die Auswirkung auf den IOP-Verlauf und die Morphologie des TM einzuschätzen womit eine bessere Einordnung aktueller Studienergebnisse ermöglicht wird und Rückschlüsse auf klinisch verwertbare Messmethoden erzielt werden können.

Wir konnten in mehreren Messkohorten zeigen, dass durch das Cxl mit UV-A Bestrahlung und Riboflavin nach den aktuell verwendeten klinischen Methoden intraokular kein Anstieg des IOP nachgewiesen werden kann. Innerhalb des untersuchten Zeitraums kam es tendenziell eher zu einem leichten Abfall des IOP. In einzelnen Messungen kam es zwar auch zu leichten Anstiegen des IOP,

die aber statistisch nicht signifikant wurden bzw. immer noch im physiologischen Bereich des IOP lagen. In den morphologischen Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie konnte keine morphologische Veränderung oder Aktivierung des TM nachgewiesen werden, weder durch das Vorderkammermodell noch nach CxI. Lediglich das Isolieren von TM-Zellen nach dem Vorderkammermodell war nicht möglich, wobei ein weiterer Versuch die Vermutung zulässt, dass verschiedene Faktoren zu einer erhöhten Traumasierbarkeit der Zellen führen, so dass sie sich mit der gewählten Präparationsmethode nicht mehr isolieren lassen. Das Modell selbst zeigt sich durch die Ergebnisse der TUNEL-Färbung und der Elektronenmikroskopie als valide.

Das vorliegende Ergebnis stützt die Annahme, dass die veränderten Eigenschaften der Kornea nach CxI die extraokularen Messmethoden des IOP stark beeinflussen. Hier im speziellen die Applanationsverfahren, welche am meisten abhängig von den Parametern der Kornea sind. Hier scheint das Verfahren der DCT besser geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein kurzer Zeitraum untersucht; in diesem zeigte sich aber, dass es zu keiner Erhöhung des IOP kommt, aber im Einzelfall eine solche nicht ausgeschlossen werden kann. Vor allem aber auch weil es sich bei den Keratokonus-Patienten meist um junge Patienten handelt ist hier ein Langzeitverlauf von Jahrzehnten zu berücksichtigen, bei dem bereits kleinere IOP Erhöhungen, wenn sie sich weiter entwickeln, zu Problemen führen könnten. Hieraus erscheint es sinnvoll, die Patienten über die Gefahr einer IOP Erhöhung und deren Folgen aufzuklären und eine regelmäßige, engmaschige Kontrolle des IOP durchzuführen. Es scheint ebenso sinnvoll bereits im Vorfeld eine Methode zu wählen, die weniger von den Eigenschaften der Kornea abhängig ist, um den Ausgangs-IOP zu bestimmen. Abschließend sind weitere Untersuchungen über einen längeren Zeitraum am Modell zu empfehlen. Insbesondere aber auch im Bereich der Zellkultur um evtl. Veränderungen im Bereich der Proteinbiosynthese und -Expression bestimmter EZM-Bestandteile zu erforschen. Weitere klinische Langzeitstudien mit DCT Messungen könnten den in-vivo Verlauf beleuchten

6 Literaturverzeichnis

1. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ und Zilch H-G (2010). "Anatomie (Duale Reihe)". 1. Auflage, Seite 1064-1067, 1077-1079, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
2. Krachmer J, Mannis MJ und Holland EJ (2010). "Cornea". 3. Auflage, Seite 2-24, Mosby, St. Louis.
3. Ralla B (2011). "Über den Einfluss der Kollagenvernetzung der Cornea auf die Laser-in-situ-Keratomileusis". Medizinische Dissertationsschrift, Universität Würzburg.
4. Welsch U (2003). "Lehrbuch Histologie". 1. Auflage, Seite 517-522, Urban & Fischer, München.
5. Kanski JJ (2008). "Klinische Ophthalmologie". 6. Auflage, Seite 254; 378-380, Elsevier, Urban & Fischer, München.
6. Augustin AJ (2007). "Augenheilkunde". 3. Auflage, Seite 229-230, 1178, Springer, Berlin.
7. Klyce SD (1972). "Electrical profiles in the corneal epithelium". *J Physiol*, **226**(2): 407-29.
8. Komai Y und Ushiki T (1991). "The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **32**(8): 2244-58.
9. Tamm ER (2009). "The trabecular meshwork outflow pathways: structural and functional aspects". *Exp Eye Res*, **88**(4): 648-55.
10. Johnson M (2006). "What controls aqueous humour outflow resistance?". *Exp Eye Res*, **82**(4): 545-57.
11. Tamm ER und Fuchshofer R (2007). "What increases outflow resistance in primary open-angle glaucoma?". *Surv Ophthalmol*, **52 Suppl 2**: S101-4.
12. Acott TS und Kelley MJ (2008). "Extracellular matrix in the trabecular meshwork". *Exp Eye Res*, **86**(4): 543-61.
13. Lütjen-Drecoll E, Gabelt BT, Tian B und Kaufman PL (2001). "Outflow of aqueous humor". *J Glaucoma*, **10**(5 Suppl 1): S42-4.
14. Lütjen-Drecoll E und Rohen JW (2001). "Functional morphology of the trabecular meshwork". *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*. W Tasman und E A Jaeger. Philadelphia, J.B. Lippincott Company. 1-30.
15. Kelley MJ, Rose AY, Keller KE, Hessle H, Samples JR und Acott TS (2009). "Stem cells in the trabecular meshwork: present and future promises". *Exp Eye Res*, **88**(4): 747-51.
16. Gong H, Ruberti J, Overby D, Johnson M und Freddo TF (2002). "A new view of the human trabecular meshwork using quick-freeze, deep-etch electron microscopy". *Exp Eye Res*, **75**(3): 347-58.
17. Bhatt K, Gong H und Freddo TF (1995). "Freeze-fracture studies of interendothelial junctions in the angle of the human eye". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **36**(7): 1379-89.

18. Marshall GE, Konstas AG und Lee WR (1991). "Immunogold ultrastructural localization of collagens in the aged human outflow system". *Ophthalmology*, **98**(5): 692-700.
19. Murphy CG, Yun AJ, Newsome DA und Alvarado JA (1987). "Localization of extracellular proteins of the human trabecular meshwork by indirect immunofluorescence". *Am J Ophthalmol*, **104**(1): 33-43.
20. Lütjen-Drecoll E, Futa R und Rohen JW (1981). "Ultrastructural studies on tangential sections of the trabecular meshwork in normal and glaucomatous eyes". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **21**(4): 563-73.
21. Gong HY, Trinkaus-Randall V und Freddo TF (1989). "Ultrastructural immunocytochemical localization of elastin in normal human trabecular meshwork". *Curr Eye Res*, **8**(10): 1071-82.
22. Gasiorowski JZ und Russell P (2009). "Biological properties of trabecular meshwork cells". *Exp Eye Res*, **88**(4): 671-5.
23. Sherwood ME und Richardson TM (1988). "Phagocytosis by trabecular meshwork cells: sequence of events in cats and monkeys". *Exp Eye Res*, **46**(6): 881-95.
24. Grierson I und Chisholm IA (1978). "Clearance of debris from the iris through the drainage angle of the rabbit's eye". *Br J Ophthalmol*, **62**(10): 694-704.
25. Hann CR und Fautsch MP (2009). "Preferential fluid flow in the human trabecular meshwork near collector channels". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50**(4): 1692-7.
26. Mc Ewen WK (1958). "Application of Poiseuille's law to aqueous outflow". *AMA Arch Ophthalmol*, **60**(2): 290-4.
27. Grant WM (1963). "Experimental aqueous perfusion in enucleated human eyes". *Arch Ophthalmol*, **69**: 783-801.
28. Lütjen-Drecoll E, Rittig M, Rauterberg J, Jander R und Mollenhauer J (1989). "Immunomicroscopical study of type VI collagen in the trabecular meshwork of normal and glaucomatous eyes". *Exp Eye Res*, **48**(1): 139-47.
29. Marshall GE, Konstas AG und Lee WR (1990). "Immunogold localization of type IV collagen and laminin in the aging human outflow system". *Exp Eye Res*, **51**(6): 691-9.
30. Gong H, Tripathi RC und Tripathi BJ (1996). "Morphology of the aqueous outflow pathway". *Microsc Res Tech*, **33**(4): 336-67.
31. Fuchshofer R, Welge-Lussen U, Lütjen-Drecoll E und Birke M (2006). "Biochemical and morphological analysis of basement membrane component expression in corneoscleral and cribriform human trabecular meshwork cells". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **47**(3): 794-801.
32. Rohen JW, Futa R und Lütjen-Drecoll E (1981). "The fine structure of the cribriform meshwork in normal and glaucomatous eyes as seen in tangential sections". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **21**(4): 574-85.
33. Ricard CS und Tamm ER (2005). "Focus on Molecules: Myocilin/TIGR". *Exp Eye Res*, **81**(5): 501-2.
34. Tripathi BJ und Tripathi RC (1974). "Proceedings: Pathways for bulk outflow of aqueous humour and cerebrospinal fluid". *J Physiol*, **240**(2): 4P-6P.

35. Tripathi RC (1974). "Tracing the bulk outflow route of cerebrospinal fluid by transmission and scanning electron microscopy". *Brain Res*, **80**(3): 503-6.
36. Tripathi RC (1974). "Comparative physiologie an anatomy of the aqueous outflow pathway". *The Eye Comparative Physiology*. Vol 5, H Davson, L T Graham und et.al. New York, Academic Press. 163-356.
37. Raviola G und Raviola E (1981). "Paracellular route of aqueous outflow in the trabecular meshwork and canal of Schlemm. A freeze-fracture study of the endothelial junctions in the sclerocorneal angel of the macaque monkey eye". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **21**(1 Pt 1): 52-72.
38. Johnstone MA und Grant WG (1973). "Pressure-dependent changes in structures of the aqueous outflow system of human and monkey eyes". *Am J Ophthalmol*, **75**(3): 365-83.
39. Bill A und Svedbergh B (1972). "Scanning electron microscopic studies of the trabecular meshwork and the canal of Schlemm--an attempt to localize the main resistance to outflow of aqueous humor in man". *Acta Ophthalmol (Copenh)*, **50**(3): 295-320.
40. Grierson I und Lee WR (1978). "Pressure effects on flow channels in the lining endothelium of Schlemm's canal. A quantitative study by transmission electron microscopy". *Acta Ophthalmol (Copenh)*, **56**(6): 935-52.
41. Epstein DL und Rohen JW (1991). "Morphology of the trabecular meshwork and inner-wall endothelium after cationized ferritin perfusion in the monkey eye". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **32**(1): 160-71.
42. Ye W, Gong H, Sit A, Johnson M und Freddo TF (1997). "Interendothelial junctions in normal human Schlemm's canal respond to changes in pressure". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **38**(12): 2460-8.
43. Johnson M, Johnson DH, Kamm RD, DeKater AW und Epstein DL (1990). "The filtration characteristics of the aqueous outflow system". *Exp Eye Res*, **50**(4): 407-18.
44. Freddo TF (2013). "A contemporary concept of the blood-aqueous barrier". *Prog Retin Eye Res*, **32**: 181-95.
45. Brubaker RF (1991). "Flow of aqueous humor in humans [The Friedenwald Lecture]". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **32**(13): 3145-66.
46. Johnson M, Chan D, Read AT, Christensen C, Sit A und Ethier CR (2002). "The pore density in the inner wall endothelium of Schlemm's canal of glaucomatous eyes". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43**(9): 2950-5.
47. Sit AJ, Coloma FM, Ethier CR und Johnson M (1997). "Factors affecting the pores of the inner wall endothelium of Schlemm's canal". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **38**(8): 1517-25.
48. Gabelt BT und Kaufman PL (2005). "Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma". *Prog Retin Eye Res*, **24**(5): 612-37.
49. Rabinowitz YS (1998). "Keratoconus". *Surv Ophthalmol*, **42**(4): 297-319.
50. Zadnik K, Barr JT, Edrington TB, Everett DF, Jameson M, McMahon TT, Shin JA, Sterling JL, Wagner H und Gordon MO (1998). "Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **39**(13): 2537-46.

51. Meek KM, Tuft SJ, Huang Y, Gill PS, Hayes S, Newton RH und Bron AJ (2005). "*Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas*". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46**(6): 1948-56.
52. Kennedy RH, Bourne WM und Dyer JA (1986). "*A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus*". *Am J Ophthalmol*, **101**(3): 267-73.
53. Zadnik K, Steger-May K, Fink BA, Joslin CE, Nichols JJ, Rosenstiel CE, Tyler JA, Yu JA, Raasch TW, Schechtman KB und Keratoconus CSGCLEo (2002). "*Between-eye asymmetry in keratoconus*". *Cornea*, **21**(7): 671-9.
54. Kymes SM, Walline JJ, Zadnik K und Gordon MO (2004). "*Quality of life in keratoconus*". *American journal of ophthalmology*, **138**(4): 527-35.
55. Ashwin PT und Mc-Donnell PJ (2010). "*Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research*". *Br J Ophthalmol*, **94**(8): 965-70.
56. Sachsenweger M (2003). "*Augenheilkunde (Duale Reihe)*". 2. Auflage, Seite 105-107, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
57. Aldave AJ, Mabon M, Hollander DA, McLeod SD, Spencer WH und Abbott RL (2003). "*Spontaneous corneal hydrops and perforation in keratoconus and pellucid marginal degeneration*". *Cornea*, **22**(2): 169-74.
58. Dantas PE und Nishiwaki-Dantas MC (2004). "*Spontaneous bilateral corneal perforation of acute hydrops in keratoconus*". *Eye Contact Lens*, **30**(1): 40-1.
59. Tuft SJ, Gregory WM und Buckley RJ (1994). "*Acute corneal hydrops in keratoconus*". *Ophthalmology*, **101**(10): 1738-44.
60. Tuft SJ, Moodaley LC, Gregory WM, Davison CR und Buckley RJ (1994). "*Prognostic factors for the progression of keratoconus*". *Ophthalmology*, **101**(3): 439-47.
61. Snibson GR (2010). "*Collagen cross-linking: a new treatment paradigm in corneal disease - a review*". *Clin Experiment Ophthalmol*, **38**(2): 141-53.
62. Hoyer A, Raiskup-Wolf F, Spörl E und Pillunat LE (2009). "*Kollagenvernetzung mit Riboflavin und UVA-Licht bei Keratokonus, Dresdner Ergebnisse*". *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, **106**(2): 133-40.
63. Wollensak G (2006). "*Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope*". *Curr Opin Ophthalmol*, **17**(4): 356-60.
64. Krachmer JH, Feder RS und Belin MW (1984). "*Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders*". *Surv Ophthalmol*, **28**(4): 293-322.
65. Pearson AR, Soneji B, Sarvananthan N und Sandford-Smith JH (2000). "*Does ethnic origin influence the incidence or severity of keratoconus?*". *Eye (Lond)*, **14 (Pt 4)**: 625-8.
66. Maatta M, Heljasvaara R, Sormunen R, Pihlajaniemi T, Autio-Harmainen H und Tervo T (2006). "*Differential expression of collagen types XVIII/endostatin and XV in normal, keratoconus, and scarred human corneas*". *Cornea*, **25**(3): 341-9.
67. Maatta M, Vaisanen T, Vaisanen MR, Pihlajaniemi T und Tervo T (2006). "*Altered expression of type XIII collagen in keratoconus and scarred*

- human cornea: Increased expression in scarred cornea is associated with myofibroblast transformation*". Cornea, **25**(4): 448-53.
68. Kao WW, Vergnes JP, Ebert J, Sundar-Raj CV und Brown SI (1982). "*Increased collagenase and gelatinase activities in keratoconus*". Biochem Biophys Res Commun, **107**(3): 929-36.
 69. Kenney MC, Nesburn AB, Burgeson RE, Butkowski RJ und Ljubimov AV (1997). "*Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas*". Cornea, **16**(3): 345-51.
 70. Rehany U, Lahav M und Shoshan S (1982). "*Collagenolytic activity in keratoconus*". Ann Ophthalmol, **14**(8): 751-4.
 71. Sawaguchi S, Yue BY, Sugar J und Gilboy JE (1989). "*Lysosomal enzyme abnormalities in keratoconus*". Arch Ophthalmol, **107**(10): 1507-10.
 72. Bawazeer AM, Hodge WG und Lorimer B (2000). "*Atopy and keratoconus: a multivariate analysis*". Br J Ophthalmol, **84**(8): 834-6.
 73. Bron AJ und Rabinowitz YS (1996). "*Corneal dystrophies and keratoconus*". Curr Opin Ophthalmol, **7**(4): 71-82.
 74. Lema I, Duran JA, Ruiz C, Diez-Feijoo E, Acera A und Merayo J (2008). "*Inflammatory response to contact lenses in patients with keratoconus compared with myopic subjects*". Cornea, **27**(7): 758-63.
 75. Behndig A, Karlsson K, Johansson BO, Brannstrom T und Marklund SL (2001). "*Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea*". Invest Ophthalmol Vis Sci, **42**(10): 2293-6.
 76. Gondhowiardjo TD und van Haeringen NJ (1993). "*Corneal aldehyde dehydrogenase, glutathione reductase, and glutathione S-transferase in pathologic corneas*". Cornea, **12**(4): 310-4.
 77. Joseph R, Srivastava OP und Pfister RR (2011). "*Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas*". Exp Eye Res, **92**(4): 282-98.
 78. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Tran A, Carballo M, Saghizadeh M, Vasiliou V, Adachi W und Brown DJ (2005). "*Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays a role in this disorder*". Invest Ophthalmol Vis Sci, **46**(3): 823-32.
 79. Daxer A und Fratzl P (1997). "*Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implication in keratoconus*". Invest Ophthalmol Vis Sci, **38**(1): 121-9.
 80. Radner W, Zehetmayer M, Skorpik C und Mallinger R (1996). "*Zur Anordnung der kollagenen Lamellen beim Keratokonus*". Spektrum der Augenheilkunde, **10**(4): 156-160.
 81. Sherwin T und Brookes NH (2004). "*Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis*". Clin Experiment Ophthalmol, **32**(2): 211-7.
 82. Morishige N, Wahlert AJ, Kenney MC, Brown DJ, Kawamoto K, Chikama T, Nishida T und Jester JV (2007). "*Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea*". Invest Ophthalmol Vis Sci, **48**(3): 1087-94.

83. Rohrbach JM, Szurman P, El-Wardani M und Grub M (2006). "Zur Häufigkeit der exzessiven Verdickung der epithelialen Basalmembran beim Keratokonus". *Klin Monbl Augenheilkd*, **223**(11): 889-93.
84. Andreassen TT, Simonsen AH und Oxlund H (1980). "Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas". *Exp Eye Res*, **31**(4): 435-41.
85. Ihme A, Krieg T, Müller RK und Wollensak J (1983). "Biochemical investigation of cells from keratoconus and normal cornea". *Exp Eye Res*, **36**(5): 625-31.
86. Cannon DJ und Foster CS (1978). "Collagen crosslinking in keratoconus". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **17**(1): 63-5.
87. Cameron JA (1993). "Corneal abnormalities in Ehlers-Danlos syndrome type VI". *Cornea*, **12**(1): 54-9.
88. Elder MJ (1994). "Leber congenital amaurosis and its association with keratoconus and keratoglobus". *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, **31**(1): 38-40.
89. Lichter H, Loya N, Sagie A, Cohen N, Muzmacher L, Yassur Y und Weinberger D (2000). "Keratoconus and mitral valve prolapse". *Am J Ophthalmol*, **129**(5): 667-8.
90. Sharif KW, Casey TA und Coltart J (1992). "Prevalence of mitral valve prolapse in keratoconus patients". *J R Soc Med*, **85**(8): 446-8.
91. Cullen JF und Butler HG (1963). "Mongolism (Down's Syndrome) and Keratoconus". *Br J Ophthalmol*, **47**: 321-30.
92. Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI und Yang H (2000). "Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination". *Am J Med Genet*, **93**(5): 403-9.
93. Joseph R, Srivastava OP und Pfister RR (2012). "Downregulation of beta-actin gene and human antigen R in human keratoconus". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **53**(7): 4032-41.
94. Li X, Bykhovskaya Y, Tang YG, Picornell Y, Haritunians T, Aldave AJ, Szczotka-Flynn L, Iyengar SK, Rotter JI, Taylor KD und Rabinowitz YS (2013). "An Association Between the Calpastatin (CAST) Gene and Keratoconus". *Cornea*.
95. Lu Y, Vitart V, Burdon KP, Khor CC, Bykhovskaya Y, Mirshahi A, Hewitt AW, Koehn D, Hysi PG, Ramdas WD, Zeller T, Vithana EN, Cornes BK, Tay WT, Tai ES, Cheng CY, Liu J, Foo JN, Saw SM, Thorleifsson G, Stefansson K, Dimasi DP, Mills RA, Mountain J, Ang W, Hoehn R, Verhoeven VJ, Grus F, Wolfs R, Castagne R, Lackner KJ, Springelkamp H, Yang J, Jonasson F, Leung DY, Chen LJ, Tham CC, Rudan I, Vataavuk Z, Hayward C, Gibson J, Cree AJ, MacLeod A, Ennis S, Polasek O, Campbell H, Wilson JF, Viswanathan AC, Fleck B, Li X, Siscovick D, Taylor KD, Rotter JI, Yazar S, Ulmer M, Li J, Yaspan BL, Ozel AB, Richards JE, Moroi SE, Haines JL, Kang JH, Pasquale LR, Allingham RR, Ashley-Koch A, Neighbor-Consortium, Mitchell P, Wang JJ, Wright AF, Pennell C, Spector TD, Young TL, Klaver CC, Martin NG, Montgomery GW, Anderson MG, Aung T, Willoughby CE, Wiggs JL, Pang CP, Thorsteinsdottir U, Lotery AJ, Hammond CJ, van Duijn CM, Hauser MA, Rabinowitz YS, Pfeiffer N, Mackey DA, Craig JE, Macgregor

- S und Wong TY (2013). "Genome-wide association analyses identify multiple loci associated with central corneal thickness and keratoconus". *Nat Genet*, **45**(2): 155-63.
96. Nielsen K, Hjortdal J, Pihlmann M und Corydon TJ (2013). "Update on the keratoconus genetics". *Acta Ophthalmol*, **91**(2): 106-13.
 97. Kuo IC, Broman A, Pirouzmanesh A und Melia M (2006). "Is there an association between diabetes and keratoconus?". *Ophthalmology*, **113**(2): 184-90.
 98. Seiler T, Huhle S, Spörl E und Kunath H (2000). "Manifest diabetes and keratoconus: a retrospective case-control study". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **238**(10): 822-5.
 99. Reiser KM (1991). "Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes". *Proc Soc Exp Biol Med*, **196**(1): 17-29.
 100. Bühren J, Kühne C und Köhnen T (2006). "Wellenfrontanalyse zur Diagnose des subklinischen Keratokonus". *Ophthalmologe*, **103**(9): 783-90.
 101. Grunauer-Kloevekorn C und Duncker GI (2006). "Keratokonius: Epidemiologie, Risikofaktoren und Diagnose". *Klin Monbl Augenheilkd*, **223**(6): 493-502.
 102. Gobbe M und Guillon M (2005). "Corneal wavefront aberration measurements to detect keratoconus patients". *Cont Lens Anterior Eye*, **28**(2): 57-66.
 103. Li Y, Meisler DM, Tang M, Lu AT, Thakrar V, Reiser BJ und Huang D (2008). "Keratoconus diagnosis with optical coherence tomography pachymetry mapping". *Ophthalmology*, **115**(12): 2159-66.
 104. Rabinowitz YS und Rasheed K (1999). "KISA% index: a quantitative videokeratography algorithm embodying minimal topographic criteria for diagnosing keratoconus". *J Cataract Refract Surg*, **25**(10): 1327-35.
 105. Rabinowitz YS (1995). "Videokeratographic indices to aid in screening for keratoconus". *J Refract Surg*, **11**(5): 371-9.
 106. Colin J und Velou S (2003). "Current surgical options for keratoconus". *J Cataract Refract Surg*, **29**(2): 379-86.
 107. Krumeich JH, Daniel J und Knulle A (1998). "Live-epikeratophakia for keratoconus". *J Cataract Refract Surg*, **24**(4): 456-63.
 108. Pron G, Ieraci L, Kaulback K und Medical Advisory Secretariat HQO (2011). "Collagen cross-linking using riboflavin and ultraviolet-a for corneal thinning disorders: an evidence-based analysis". *Ont Health Technol Assess Ser*, **11**(5): 1-89.
 109. Krumeich JH und Daniel J (1997). "Lebend-Epikeratophakie und Tiefe Lamelläre Keratoplastik zur Stadiengerechten chirurgischen Behandlung des Keratokonus (KK) I-III". *Klin Monbl Augenheilkd*, **211**(2): 94-100.
 110. Jhanji V, Sharma N und Vajpayee RB (2011). "Management of keratoconus: current scenario". *Br J Ophthalmol*, **95**(8): 1044-50.
 111. Colin J, Cochener B, Savary G und Malet F (2000). "Correcting keratoconus with intracorneal rings". *J Cataract Refract Surg*, **26**(8): 1117-22.
 112. Tan DT und Por YM (2007). "Current treatment options for corneal ectasia". *Curr Opin Ophthalmol*, **18**(4): 284-9.

113. Ertan A und Colin J (2007). "*Intracorneal rings for keratoconus and keratectasia*". *J Cataract Refract Surg*, **33**(7): 1303-14.
114. Ghosheh FR, Cremona F, Ayres BD, Hammersmith KM, Cohen EJ, Raber IM, Laibson PR und Rapuano CJ (2008). "*Indications for penetrating keratoplasty and associated procedures, 2001-2005*". *Eye Contact Lens*, **34**(4): 211-4.
115. Maeno A, Naor J, Lee HM, Hunter WS und Rootman DS (2000). "*Three decades of corneal transplantation: indications and patient characteristics*". *Cornea*, **19**(1): 7-11.
116. Pramanik S, Musch DC, Sutphin JE und Farjo AA (2006). "*Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus*". *Ophthalmology*, **113**(9): 1633-8.
117. Koller T und Seiler T (2007). "*Therapeutische Quervernetzung der Hornhaut mittels UVA und Riboflavin*". *Klin Monbl Augenheilkd*, **224**(9): 700-6.
118. Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G und Sittinger M (1998). "*Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage*". *J Biomed Mater Res*, **42**(3): 347-56.
119. Spörl E, Raiskup-Wolf F und Pillunat LE (2008). "*Biophysikalische Grundlagen der Kollagenvernetzung*". *Klin Monbl Augenheilkd*, **225**(2): 131-7.
120. Spörl E, Huhle M, Kasper M und Seiler T (1997). "*Erhöhung der Festigkeit der Hornhaut durch Vernetzung*". *Ophthalmologie*, **94**(12): 902-6.
121. Spörl E, Huhle M und Seiler T (1998). "*Induction of cross-links in corneal tissue*". *Exp Eye Res*, **66**(1): 97-103.
122. Kohlhaas M, Spörl E, Schilde T, Unger G, Wittig C und Pillunat LE (2006). "*Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light*". *J Cataract Refract Surg*, **32**(2): 279-83.
123. Wollensak G, Spörl E und Seiler T (2003). "*[Treatment of keratoconus by collagen cross linking]*". *Ophthalmologie*, **100**(1): 44-9.
124. Wollensak G, Spörl E und Seiler T (2003). "*Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus*". *Am J Ophthalmol*, **135**(5): 620-7.
125. Wittig-Silva C, Whiting M, Lamoureux E, Lindsay RG, Sullivan LJ und Snibson GR (2008). "*A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: preliminary results*". *J Refract Surg*, **24**(7): S720-5.
126. Agrawal VB (2009). "*Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet - a light for keratoconus: results in Indian eyes*". *Indian J Ophthalmol*, **57**(2): 111-4.
127. Jankov MR, 2nd, Hafezi F, Beko M, Ignjatovic Z, Djurovic B, Markovic V und Schor P (2008). "*[Corneal Cross-linking for the treatment of keratoconus: preliminary results]*". *Arq Bras Oftalmol*, **71**(6): 813-8.

128. Koller T, Iseli HP, Hafezi F, Vinciguerra P und Seiler T (2009). "Scheimpflug imaging of corneas after collagen cross-linking". *Cornea*, **28**(5): 510-5.
129. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spörl E und Pillunat LE (2008). "Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results". *J Cataract Refract Surg*, **34**(5): 796-801.
130. Vinciguerra P, Albe E, Trazza S, Seiler T und Epstein D (2009). "Intraoperative and postoperative effects of corneal collagen cross-linking on progressive keratoconus". *Arch Ophthalmol*, **127**(10): 1258-65.
131. Wollensak G, Spörl E und Seiler T (2003). "Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking". *J Cataract Refract Surg*, **29**(9): 1780-5.
132. Spörl E, Wollensak G, Dittert DD und Seiler T (2004). "Thermomechanical behavior of collagen-cross-linked porcine cornea". *Ophthalmologica*, **218**(2): 136-40.
133. Wollensak G, Aurich H, Pham DT und Wirbelauer C (2007). "Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A". *J Cataract Refract Surg*, **33**(3): 516-21.
134. Wollensak G, Wilsch M, Spörl E und Seiler T (2004). "Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA". *Cornea*, **23**(5): 503-7.
135. Spörl E, Wollensak G und Seiler T (2004). "Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion". *Curr Eye Res*, **29**(1): 35-40.
136. Ehlers N und Hjortdal J (2008). "Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation". *Acta Ophthalmol*, **86**(5): 549-51.
137. Spörl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S und Seiler T (2007). "Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea". *Cornea*, **26**(4): 385-9.
138. Wollensak G, Spörl E, Wilsch M und Seiler T (2003). "Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit". *J Cataract Refract Surg*, **29**(9): 1786-90.
139. Wollensak G, Spörl E, Wilsch M und Seiler T (2004). "Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment". *Cornea*, **23**(1): 43-9.
140. Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi T, Tommasi C und Caporossi A (2007). "Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans". *Cornea*, **26**(4): 390-7.
141. Caporossi A, Baiocchi S, Mazzotta C, Traversi C und Caporossi T (2006). "Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study". *J Cataract Refract Surg*, **32**(5): 837-45.
142. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Sergio P, Caporossi T und Caporossi A (2006). "Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-uva-induced cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation". *Eur J Ophthalmol*, **16**(4): 530-5.

143. Hafezi F, Kanellopoulos J, Wiltfang R und Seiler T (2007). "*Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A to treat induced keratectasia after laser in situ keratomileusis*". J Cataract Refract Surg, **33**(12): 2035-40.
144. Kohlhaas M, Spörl E, Speck A, Schilde T, Sandner D und Pillunat LE (2005). "*Behandlung der Keraektasie nach LASIK*". Klin Monbl Augenheilkd, **222**(5): 430-6.
145. Ghanem RC, Santhiago MR, Berti TB, Thomaz S und Netto MV (2010). "*Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A in eyes with pseudophakic bullous keratopathy*". J Cataract Refract Surg, **36**(2): 273-6.
146. Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C und Pham DT (2009). "*Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy*". Ophthalmic Res, **41**(2): 114-7.
147. Moren H, Malmso M, Mortensen J und Ohrstrom A (2010). "*Riboflavin and ultraviolet a collagen crosslinking of the cornea for the treatment of keratitis*". Cornea, **29**(1): 102-4.
148. Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, Kampmeier J und Seiler T (2008). "*Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts*". Cornea, **27**(5): 590-4.
149. Sauer A, Letscher-Bru V, Speeg-Schatz C, Touboul D, Colin J, Candolfi E und Bourcier T (2010). "*In vitro efficacy of antifungal treatment using riboflavin/UV-A (365 nm) combination and amphotericin B*". Invest Ophthalmol Vis Sci, **51**(8): 3950-3.
150. Schrier A, Greebel G, Attia H, Trokel S und Smith EF (2009). "*In vitro antimicrobial efficacy of riboflavin and ultraviolet light on Staphylococcus aureus, methicillin-resistant Staphylococcus aureus, and Pseudomonas aeruginosa*". J Refract Surg, **25**(9): S799-802.
151. Schnitzler E, Spörl E und Seiler T (2000). "*Bestrahlung der Hornhaut mit UV-Licht und Riboflavingabe als neuer Behandlungsversuch bei einschmelzenden Hornhautprozessen, erste Ergebnisse bei vier Patienten*". Klin Monbl Augenheilkd, **217**(3): 190-3.
152. Wang F (2008). "*UVA/riboflavin-induced apoptosis in mouse cornea*". Ophthalmologica, **222**(6): 369-72.
153. Hafezi F, Mrochen M, Iseli HP und Seiler T (2009). "*Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas*". J Cataract Refract Surg, **35**(4): 621-4.
154. Mazzotta C, Balestrazzi A, Baiocchi S, Traversi C und Caporossi A (2007). "*Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus: in vivo confocal microscopic evaluation*". Clin Experiment Ophthalmol, **35**(6): 580-2.
155. Raiskup F, Hoyer A und Spoerl E (2009). "*Permanent corneal haze after riboflavin-UVA-induced cross-linking in keratoconus*". J Refract Surg, **25**(9): S824-8.
156. Koller T, Mrochen M und Seiler T (2009). "*Complication and failure rates after corneal crosslinking*". J Cataract Refract Surg, **35**(8): 1358-62.

157. Pollhammer M und Cursiefen C (2009). "*Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A*". J Cataract Refract Surg, **35**(3): 588-9.
158. Rama P, Di Matteo F, Matuska S, Paganoni G und Spinelli A (2009). "*Acanthamoeba keratitis with perforation after corneal crosslinking and bandage contact lens use*". J Cataract Refract Surg, **35**(4): 788-91.
159. Zamora KV und Males JJ (2009). "*Polymicrobial keratitis after a collagen cross-linking procedure with postoperative use of a contact lens: a case report*". Cornea, **28**(4): 474-6.
160. Kymionis GD, Grentzelos MA, Kounis GA, Portaliou DM, Detorakis ET, Magarakis M, Karampatakis VE und Pallikaris IG (2010). "*Intraocular pressure measurements after corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A in eyes with keratoconus*". J Cataract Refract Surg, **36**(10): 1724-7.
161. Goldich Y, Barkana Y, Morad Y, Hartstein M, Avni I und Zadok D (2009). "*Can we measure corneal biomechanical changes after collagen cross-linking in eyes with keratoconus?--a pilot study*". Cornea, **28**(5): 498-502.
162. Sedaghat M, Naderi M und Zarei-Ghanavati M (2010). "*Biomechanical parameters of the cornea after collagen crosslinking measured by waveform analysis*". J Cataract Refract Surg, **36**(10): 1728-31.
163. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S und Caporossi T (2010). "*Long-term results of riboflavin ultraviolet a corneal collagen cross-linking for keratoconus in Italy: the Siena eye cross study*". Am J Ophthalmol, **149**(4): 585-93.
164. Romppainen T, Bachmann LM, Kaufmann C, Kniestedt C, Mrochen M und Thiel MA (2007). "*Effect of riboflavin-UVA-induced collagen cross-linking on intraocular pressure measurement*". Invest Ophthalmol Vis Sci, **48**(12): 5494-8.
165. Johnson DH und Tschumper RC (1987). "*Human trabecular meshwork organ culture. A new method*". Invest Ophthalmol Vis Sci, **28**(6): 945-53.
166. Pang IH, McCartney MD, Steely HT und Clark AF (2000). "*Human ocular perfusion organ culture: a versatile ex vivo model for glaucoma research*". J Glaucoma, **9**(6): 468-79.
167. Bachmann B, Birke M, Kook D, Eichhorn M und Lutjen-Drecoll E (2006). "*Ultrastructural and biochemical evaluation of the porcine anterior chamber perfusion model*". Invest Ophthalmol Vis Sci, **47**(5): 2011-20.
168. McMenamin PG und Steptoe RJ (1991). "*Normal anatomy of the aqueous humour outflow system in the domestic pig eye*". J Anat, **178**: 65-77.
169. Medio-Haus Medizinprodukte GmbH, Neudorf (2009). "*Fachinformation "MedioCross"*". Medio-Haus Medizinprodukte GmbH, Neudorf
170. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (2006). "*In Situ Cell Deaths Detection Kit, TMR red.*" Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany
171. Sanchez I, Martin R, Ussa F und Fernandez-Bueno I (2011). "*The parameters of the porcine eyeball*". Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, **249**(4): 475-82.

172. Johnson DH und Tschumper RC (1989). "The effect of organ culture on human trabecular meshwork". *Exp Eye Res*, **49**(1): 113-27.
173. Polansky JR, Weinreb RN, Baxter JD und Alvarado J (1979). "Human trabecular cells. I. Establishment in tissue culture and growth characteristics". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **18**(10): 1043-9.
174. Tektas OY und Lutjen-Drecoll E (2009). "Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma". *Exp Eye Res*, **88**(4): 769-75.
175. Lamparter J und Hoffmann EM (2009). "Messung des Augeninnendrucks (Tonometrie) mit unterschiedlichen Verfahren". *Ophthalmologe*, **106**(8): 676-82.
176. Firat PG, Orman G, Doganay S und Demirel S (2013). "Influence of corneal parameters in keratoconus on IOP readings obtained with different tonometers". *Clin Exp Optom*, **96**(2): 233-7.
177. Gkika MG, Labiris G und Kozobolis VP (2012). "Tonometry in keratoconic eyes before and after riboflavin/UVA corneal collagen crosslinking using three different tonometers". *Eur J Ophthalmol*, **22**(2): 142-52.
178. Aristeidou AP, Labiris G, Katsanos A, Fanariotis M, Foudoulakis NC und Kozobolis VP (2011). "Comparison between Pascal dynamic contour tonometer and Goldmann applanation tonometer after different types of refractive surgery". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **249**(5): 767-73.
179. Erickson DH, Goodwin D, Rollins M, Belaustegui A und Anderson C (2009). "Comparison of dynamic contour tonometry and Goldmann applanation tonometry and their relationship to corneal properties, refractive error, and ocular pulse amplitude". *Optometry*, **80**(4): 169-74.
180. Harada Y, Hirose N, Kubota T und Tawara A (2008). "The influence of central corneal thickness and corneal curvature radius on the intraocular pressure as measured by different tonometers: noncontact and goldmann applanation tonometers". *J Glaucoma*, **17**(8): 619-25.
181. Meyenberg A, Iliev ME, Eschmann R und Frueh BE (2008). "Dynamic contour tonometry in keratoconus and postkeratoplasty eyes". *Cornea*, **27**(3): 305-10.
182. Hoyer A, Spörl E und Pillunat LE (2010). "Kollagenvernetzung mit Riboflavin und UVA-Licht". *Klin Monbl Augenheilkd*, **227**(9): 723-8.
183. Welge-Lussen U und Birke K (2010). "Oxidativer Stress im Trabekelwerk beim POWG". *Klin Monbl Augenheilkd*, **227**(2): 99-107.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Alle Teile der Druckmessversuche wurden von mir durchgeführt und ausgewertet, ebenso die Versuche an den Zellkulturen. Die Einbettung und Anfertigung der Schnitte für die Elektronenmikroskopie sowie die Aufnahme der Bilder wurden zusammen mit Fr. Dr. med. Charlotte Schramm und Hr. Dr. med. Kai Januschowski vorgenommen. Die Auswertung der Schnitte wurde von mir vorgenommen. Die Durchführung der TUNEL-Färbung sowie die Präparation zur Färbung wurden zusammen mit Fr. Dr. med. Charlotte Schramm vorgenommen, die Auswertung der Ergebnisse wiederum von mir. Fr. Dr. med. Charlotte Schramm, Hr. Dr. med. Kai Januschowski und ich waren an der Konzeption der Arbeit beteiligt.

8 Danksagungen

Einen ganz besonderen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Bartz-Schmidt für die Aufnahme in die Klinik und Überlassung des Themas.

Ebenso ganz besonderen Dank an Prof. Dr. med. Szurman für die Überlassung des Themas und die Betreuung des Promotionsverfahrens.

Besonderen Dank auch an Fr. Dr. med. Schramm und Hr. Dr. med. Januschowski für die Betreuung während der Erstellung der Arbeit und das offene Ohr für Fragen aller Art, speziell für die kritisch, fachliche Beratung und Unterstützung.

Danke an die Mitarbeiter der feinmechanischen Werkstatt der Universitäts-Augenklinik für die technische Unterstützung und den Bau der Perfusionsschalen.

Danke auch an das gesamte Team des Labors „Breuningerbau“ für die Geduld, die Einarbeitung und Beantwortung aller Fragen während meiner Arbeit, sowie an Frau Kanz für die Hilfe bei der Literaturbeschaffung und an Frau Ebenhoch für die Mithilfe bei der Erstellung der Versuchsgrafik.

Danke an die Mitarbeiter der Schlachthof e.G. Landkreis Böblingen, Schlachthof Gärtringen, für die Entnahme der Augen und an Fr. Dr. med. vet. Natalia Quindt für die Bereitstellung und Freigabe derselben.

Danke an die Mitarbeiter des Institut für Anatomie, Lehrstuhl II, AG Fr. Prof. Dr. Lütjen-Drecoll, Universität Erlangen-Nürnberg für die Beratung zur Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Danke an Fr. Dipl.-Stat. Naumann vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen für die statistisch, methodische Beratung.

Danke an meine Ehefrau Kerstin Ottmann für die Geduld, Kritik, die Motivation, den Zuspruch sowie den emotionalen Rückhalt während der nicht immer ganz einfachen Zeit.

Nicht zuletzt noch Danke an meine Eltern Astrid und Peter Ottmann, meine Schwiegereltern Irmgard und Wolfgang Schmidtke, meine ganzen Familie und meine Freunde deren Unterstützung und motivierenden Worte mich immer voran gebracht haben.

9 Anlagen

Kohorte Intervention 1			Kohorte Intervention 2			Kohorte Intervention 3			Kohorte Intervention 4			Intervention Gesamt		
	Leermessung	Nachmess		Leermess	Nachmess		Leermess	Nachmess		Leermess	Nachmess		Leermess	Nachmess
I2.1	20,82	20,43	I6.1	28,54	25,07	I9.1	13,3	8,44	I11.3	14,85	23,16	IK1	20,6	16,78
I4.1	18,92	17,71	I6.3	15,49	9,52	I9.3	33,84	33,07	I12.3	12,1	20,4	IK2	13,72	11,99
I4.3	8,04	9,92	I7.3	4,9	4,46	I10.1	12,77	3,47	I13.1	5,91	8,71	IK3	15,88	12,44
I5.1	22,39	17,22	I8.1	12,76	11,26	I10.3	14,72	11,98	I14.1	14,55	11,27	IK4	14,07	18,09
I5.3	32,81	18,6	I8.3	6,92	9,63	I11.1	4,76	5,23	I14.3	22,96	26,93	MW alle	16,07	14,83
MW Kohorte	20,60	16,78	MW Kohorte	13,72	11,99	MW Kohorte	15,88	12,44	MW Kohorte	14,07	18,09	STABW	3,17	3,07
STABW K	8,84	4,02	STABW K	9,32	7,75	STABW K	10,77	11,98	STABW K	6,13	7,81	Quot.:		0,92
Quotient N/L		0,81	Quotient N/L		0,87	Quotient N/L		0,78	Quotient N/L		1,28	Abw Quot		-0,08
Abweichung		-0,19	Abweichung		-0,13	Abweichung		-0,21	Abweichung		0,28	Abw. Absolut (mmHg)		-1,3
Abweichung absolut (mm)		-3,82	Abweichung absolut (mm)		-1,73	Abweichung absolut (mm)		-3,44	Abweichung absolut (mm)		4,02			
Ttest pWert		0,25	Ttest pWert		0,30	Ttest pWert		0,12	Ttest pWert		0,13			0,54

$\alpha=0,05$

Kohorte Kontrolle 1			Kohorte Kontrolle 2			Kohorte Kontrolle 3			Kontrolle Gesamt		
	Leermessung	Nachmessung		Leermess	Nachmess		Leermess	Nachmess		Leermess	Nachmess
K1.1	12,92	14,16	K4.1	15,84	11,57	K6.3	10,06	4,74	KK1	9,71	9,42
K2.1	9,28	8,97	K4.3	22,34	17,32	K7.1	24,47	13,93	KK2	19,38	14,23
K2.3	9,79	7,81	K5.1	26,27	15,52	K7.3	20,21	20,68	KK3	15,25	14,14
K3.1	6,84	7,4	K5.3	18,21	18,92	K8.3	11,35	11,75	MW alle	14,78	12,60
K3.3	9,71	8,75	K6.1	14,23	7,82	K9.3	10,18	19,62	STABW	4,85	2,75
MW Kohorte	9,71	9,42	MW Kohorte	19,38	14,23	MW Kohorte	15,25	14,14	Quot.:		0,85
STABW K	2,16	2,73	STABW K	4,92	4,51	STABW K	6,66	6,46	Abw Quot		-0,15
Quotient N/L		0,97	Quotient N/L		0,73	Quotient N/L		0,93	Abw. Absolut (mmHg)		-2,18
Abweichung		-0,03	Abweichung		-0,27	Abweichung		-0,07			
Abweichung absolut (mm)		-0,29	Abweichung absolut (mmHg)		5,15	Abweichung absolut (mm)		-1,11			0,28
Ttest pWert		0,63	Ttest pWert		0,05	Ttest pWert		0,76			

Stunde	Stundenmittelwerte I11.3				Stundenmittelwerte I12.3				Stundenmittelwerte I13.1				Stundenmittelwerte I14.1				Stundenmittelwerte I14.3														
	Leermessung	STABW	Intervention	STABW	Nachmessung	STABW	Leermessung	STABW	Intervention	STABW	Nachmessung	STABW	Leermessung	STABW	Intervention	STABW	Nachmessung	STABW	Leermessung	STABW	Intervention	STABW	Nachmessung	STABW							
1	11,45	5,36	8,24	2,63	6,65	5,21	10,42	3,25	8,54	2,53	25,32	6,94	5,05	0,70	4,05	1,10	5,00	0,62	14,47	3,97	4,18	1,64	16,50	2,88	22,30	4,76	10,95	5,80	34,73	2,11	
2	17,77	1,27			7,50	2,16	12,97	0,37			16,15	0,65	6,41	0,32			5,22	0,35	15,67	0,53			14,06	0,63	22,85	0,48			25,68	1,23	
3	15,32	0,41			13,28	1,28	12,03	0,79			16,32	0,46	6,39	0,39			5,37	0,29	14,37	0,37			15,77	0,50	23,34	0,33			26,39	0,72	
4	14,85	0,44			15,63	0,79	12,99	0,35			17,31	0,23	5,79	0,29			5,37	0,31	13,69	0,40			16,00	0,31	23,35	0,62			27,42	0,53	
5					16,42	1,18					17,24	0,25					5,58	0,34					15,34	0,33					27,51	0,37	
6					19,83	1,41					17,46	0,33					5,67	0,29					15,22	0,34					27,85	0,48	
7					20,69	0,77					17,47	0,31					5,87	0,28					15,12	0,28					28,25	0,34	
8					20,81	1,03					17,97	0,31					5,87	0,35					13,56	1,04					28,36	0,41	
9					21,93	0,84					18,38	0,29					6,21	0,30					11,59	0,39					27,78	0,87	
10					22,75	0,80					18,79	0,39					6,47	0,34					10,94	0,30					25,54	0,57	
11					22,76	0,90					19,00	0,24					6,56	0,33					10,65	0,30					24,60	0,35	
12					23,05	0,59					19,25	0,39					6,55	0,37					10,28	0,29					24,98	0,29	
13					23,47	0,92					19,28	0,29					7,25	0,64					10,06	0,26					25,62	0,45	
14					23,51	0,70					19,36	0,29					8,14	0,37					10,00	0,24					26,30	0,39	
15					23,71	0,64					19,04	0,26					8,12	0,34					9,87	0,20					26,66	0,41	
16					24,25	0,66					18,97	0,23					8,42	0,38					9,76	0,20					27,03	0,39	
17					24,45	0,62					18,76	0,32					8,79	0,37					9,62	0,20					26,41	0,39	
18					24,52	0,56					18,57	0,31					8,78	0,39					9,66	0,16					26,04	0,37	
19					25,00	0,39					18,53	0,25					9,33	0,39					9,59	0,18					25,78	0,35	
20					23,93	0,58					18,38	0,62					9,57	0,35					9,54	0,19					26,00	0,37	
21					24,16	0,35					17,89	0,64					9,88	0,41					9,62	0,18					26,49	0,37	
22					24,52	0,56					17,60	0,40					9,77	1,31					9,79	0,17					26,87	0,33	
23					24,64	1,01					17,90	0,61					9,59	0,51					9,92	0,18					27,11	0,32	
24					24,06	0,64					18,28	0,49					9,69	0,45					10,09	0,19					27,83	0,34	
25					23,50	0,81					19,08	0,62					9,44	0,55					10,23	0,25					28,17	0,40	
26					23,28	0,50					19,47	0,67					9,65	0,44					10,08	0,25					28,48	0,46	
27					23,10	0,52					19,29	0,56					9,22	0,60					10,23	0,21					28,23	0,31	
28					23,51	0,51					19,74	0,61					9,57	0,48					10,36	0,21					28,27	0,31	
29					24,08	0,62					19,88	0,66					9,39	0,46					10,53	0,25					26,49	0,88	
30					24,09	0,53					19,91	0,64					9,44	0,49					10,56	0,21					26,48	0,38	
31					24,25	0,57					20,37	0,66					9,61	0,50					10,79	0,21					27,21	0,33	
32					24,20	0,60					20,91	0,79					9,76	0,45					10,82	0,21					27,44	0,33	
33					23,85	0,51					21,24	0,67					9,56	0,38					10,83	0,18					27,41	0,47	
34					24,18	0,61					21,46	0,74					10,35	0,57					11,01	0,23					27,38	0,63	
35					25,21	0,72					22,15	0,72					10,32	0,50					10,96	0,23					27,07	0,41	
36					24,84	0,50					22,62	0,89					10,20	0,38					11,07	0,25					26,72	0,39	
37					25,23	0,59					23,87	0,77					10,44	0,41					11,28	0,20					26,75	0,42	
38					25,54	0,71					23,80	0,75					10,40	0,38					11,17	0,26					27,00	0,35	
39					25,88	0,52					23,75	0,85					10,22	0,50					10,95	0,25					27,26	0,40	
40					25,76	0,58					23,81	0,81					9,92	0,47					11,04	0,24					27,05	0,42	
41					25,04	0,64					24,06	0,72					10,10	0,51					10,89	0,24					26,30	0,45	
42					25,81	0,72					24,50	0,74					10,43	0,43					11,05	0,22					26,01	0,40	
43					26,32	0,54					24,90	0,75					10,39	0,43					11,18	0,27					26,22	0,39	
44					27,32	0,63					24,62	0,67					10,72	0,43					11,00	0,27					25,74	0,32	
45					27,97	0,54					24,29	0,75					10,71	0,38					10,79	0,18					26,08	0,28	
46					28,84	0,67					24,46	0,66					10,35	0,37					10,82	0,27					26,10	0,33	
47					28,56	0,59					24,40	0,67					10,28	0,41					10,64	0,24					25,86	0,24	
48					29,98	1,02					23,64	0,68					10,42	0,38					10,32	0,25					25,46	0,26	
GMW/STAB	14,85	2,61			23,16	4,53	12,10	1,21			20,40	2,71	5,91	0,64			8,71	1,84	14,55	0,82			11,27	1,88	22,96	0,50	26,93	1,48			
Quot Nachmessung/Leermessung																															
Abweichung Nachmessung zu Leermessung Quotient																															
Abweichung Nachmessung zu Leermessung Absolut (mmHg)																															

Stunde	Stundenmittelwerte K1.1				Stundenmittelwerte K2.1				Stundenmittelwerte K2.3				Stundenmittelwerte K3.1				Stundenmittelwerte K3.3														
	Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessun STABW		Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessun STABW		Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessun STABW		Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessun STABW		Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessun STABW												
1	12,89	0,21	12,82	0,27	13,11	0,22	9,06	0,54	8,13	1,07	9,57	0,61	12,12	1,97	6,76	3,46	12,44	2,38	5,05	0,62	16,56	5,11	6,91	0,59	11,27	1,54	9,37	2,27	9,76	1,41	
2	12,91	0,24			13,07	0,24	9,82	0,72			9,50	0,38	10,73	1,55			10,06	1,77	7,28	1,39			6,49	0,96	11,11	1,66			8,47	0,83	
3	12,89	0,26			13,26	0,26	8,97	0,64			9,19	0,61	8,67	1,54			9,53	1,28	7,73	0,31			3,11	0,45	7,15	0,53			8,10	1,03	
4	12,99	0,26			13,40	0,19	9,25	0,79			9,24	0,59	7,63	1,80			8,46	1,47	7,29	0,42			2,34	0,27	9,33	0,81			9,26	0,88	
5					13,37	0,27					9,43	0,67					8,76	1,30					6,39	2,33					9,73	1,41	
6					13,50	0,22					9,19	0,49					9,32	1,16					7,91	1,18					9,50	0,70	
7					13,55	0,24					10,28	0,39					10,03	1,24					8,70	0,83					12,19	0,76	
8					13,49	0,24					10,09	0,64					10,00	1,93					8,66	0,74					11,47	1,29	
9					13,68	0,25					10,63	0,64					10,97	1,32					8,26	0,86					12,54	1,08	
10					13,90	0,27					10,78	0,77					10,77	1,16					8,05	0,79					12,25	1,19	
11					13,76	0,25					10,10	0,52					10,58	1,51					8,19	0,68					11,07	1,12	
12					13,83	0,23					10,61	0,59					10,10	1,47					8,45	0,78					10,85	0,59	
13					14,04	0,24					9,82	0,67					9,75	1,10					8,26	0,73					8,94	0,58	
14					13,94	0,28					9,71	0,59					9,30	0,97					8,77	0,81					8,84	0,92	
15					14,00	0,22					9,46	0,58					8,59	1,17					8,43	0,68					8,15	0,51	
16					14,07	0,27					8,78	0,46					8,34	1,18					8,28	0,67					7,51	0,48	
17					14,00	0,20					9,09	0,34					8,61	0,96					8,01	0,57					7,73	0,47	
18					14,03	0,26					8,67	0,48					8,48	0,92					8,42	0,68					7,07	0,39	
19					14,16	0,30					8,43	0,63					7,43	1,24					8,48	0,66					7,28	0,59	
20					14,22	0,26					8,56	0,40					7,59	0,84					8,42	0,64					7,24	0,49	
21					14,17	0,22					8,00	0,38					6,91	0,95					8,01	0,60					6,76	0,52	
22					14,25	0,21					8,48	0,39					6,91	0,74					7,82	0,82					7,09	0,62	
23					14,25	0,21					8,11	0,39					6,67	0,91					7,99	0,58					6,68	0,59	
24					14,29	0,29					8,17	0,39					7,04	0,86					7,24	0,59					6,74	0,58	
25					14,31	0,25					8,43	0,56					6,59	0,84					7,46	0,60					7,04	0,59	
26					14,40	0,25					8,03	0,38					6,56	0,82					8,07	1,06					6,49	0,34	
27					14,40	0,25					8,53	0,36					6,63	0,85					10,69	0,85					7,30	0,53	
28					14,43	0,22					8,26	0,52					6,84	0,69					9,54	3,20					6,98	0,60	
29					14,37	0,22					8,35	0,35					6,34	0,83					6,43	0,41					7,19	0,51	
30					14,32	0,22					8,64	0,53					6,79	0,72					6,42	0,53					7,48	0,75	
31					14,41	0,25					8,29	0,34					6,38	0,85					6,64	0,46					6,99	0,53	
32					14,49	0,24					8,93	0,39					6,40	0,84					6,85	0,54					7,93	0,56	
33					14,41	0,27					9,00	0,29					6,57	0,76					6,97	0,57					7,70	0,85	
34					14,65	0,19					9,71	0,39					6,60	0,74					6,91	0,67					7,72	0,66	
35					14,55	0,23					9,98	0,34					6,39	0,75					7,12	0,27					8,55	0,65	
36					14,44	0,17					8,38	0,58					6,48	0,86					6,95	0,57					7,71	0,64	
37					14,68	0,24					7,32	0,66					6,81	0,70					7,01	0,59					9,25	0,56	
38					14,64	0,24					7,23	0,91					6,49	0,68					6,88	0,71					8,43	1,20	
39					14,58	0,25					8,32	0,49					6,34	0,86					7,02	0,48					8,92	1,31	
40					14,55	0,18					8,61	0,67					6,58	0,78					7,05	0,50					9,37	1,26	
41					14,55	0,23					8,52	0,37					6,66	0,66					7,08	0,51					8,67	0,81	
42					14,58	0,29					8,99	0,33					6,63	0,84					6,87	0,58					10,27	1,29	
43					14,70	0,18					8,43	0,49					6,58	1,05					7,09	0,55					9,53	1,12	
44					14,65	0,21					9,12	0,49					6,47	1,27					7,17	0,49					9,91	1,01	
45					14,73	0,22					10,06	0,88					6,87	1,36					6,85	0,46					10,31	0,79	
46					14,70	0,15					8,32	0,41					6,57	1,27					6,94	0,47					9,62	0,67	
47					14,71	0,23					8,57	0,34					6,65	1,21					6,83	0,56					10,80	0,96	
48											8,57	0,26					7,09	0,67					6,74	0,56					10,38	1,03	
GMW/STAB	12,92	0,05			14,16	0,46	9,28	0,38			8,97	0,83	9,79	2,02			7,81	1,61	6,84	1,21			7,40	1,33	9,71	1,92			8,75	1,62	
Quot Nachmessung/Leermessung					1,09						0,96						0,79						1,08							0,90	
Abweichung Nachmessung zu Leermessung Quotient					0,09						-0,03						-0,20						0,08							-0,10	
Abweichung Nachmessung zu Leermessung Absolut (mmHg)					1,24						-0,31						-1,98						0,56							-0,96	

Stunde	Stundenmittelwerte K4.1				Stundenmittelwerte K4.3				Stundenmittelwerte K5.1				Stundenmittelwerte K5.3				Stundenmittelwerte K6.1														
	Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessung STABW		Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessung STABW		Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessung STABW		Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessung STABW		Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessung STABW												
1	15,51	0,96	24,27	3,69	27,87	2,14	20,03	4,30	23,63	5,13	5,20	4,44	27,58	2,54	27,52	2,54	25,67	1,75	21,15	4,55	21,31	4,42	26,68	3,32	14,92	2,11	23,96	4,82	26,64	3,54	
2	15,28	0,60			18,48	2,56	22,69	2,96			6,39	2,69	24,60	1,48			18,41	2,75	15,81	2,46			22,33	3,10	14,77	2,16			16,11	3,56	
3	16,23	0,82			15,46	1,03	23,00	3,30			16,22	3,48	26,78	1,83			19,20	2,48	17,84	1,37			20,19	2,94	14,01	2,59			14,66	2,41	
4	16,32	1,33			16,11	1,01	23,65	3,50			24,18	1,69	26,12	2,28			19,65	1,82	18,03	1,68			19,05	3,05	13,20	2,08			14,63	2,62	
5					15,58	0,74					23,88	2,38					22,70	0,98					18,98	2,89					13,66	2,71	
6					14,49	0,58					24,99	2,22					21,82	2,11					17,97	2,88					14,52	2,37	
7					13,28	0,54					25,63	2,12					25,42	1,41					18,11	2,88					15,33	2,60	
8					12,56	0,47					24,67	2,14					26,37	2,54					18,34	2,82					15,69	2,71	
9					13,16	0,61					26,03	2,39					25,35	1,88					18,36	2,80					16,05	2,59	
10					12,71	0,77					25,91	2,54					25,70	1,15					18,67	2,95					14,23	2,79	
11					12,46	0,44					25,95	2,36					21,53	2,11					18,73	2,98					12,91	2,64	
12					12,85	0,96					22,23	1,27					20,38	2,61					18,63	3,11					12,29	2,56	
13					13,69	1,00					23,37	2,86					18,64	1,64					19,27	2,87					10,75	3,16	
14					13,32	0,58					22,20	2,32					15,97	1,84					19,39	2,90					9,34	2,08	
15					13,45	0,72					21,84	0,62					16,45	1,51					18,49	2,66					8,41	2,18	
16					13,83	0,67					18,62	1,60					14,36	1,09					19,05	2,76					8,37	2,48	
17					13,29	0,62					17,38	1,75					13,93	1,33					19,06	2,87					6,92	1,96	
18					12,87	0,74					17,79	0,53					14,11	0,88					19,41	2,42					6,38	1,66	
19					12,28	1,38					23,95	10,81					12,87	0,91					19,31	2,63					6,01	1,75	
20					9,77	0,54					20,17	6,64					14,43	1,20					19,04	2,49					5,43	1,79	
21					9,66	0,42					14,32	1,27					11,86	0,85					17,07	2,45					4,42	1,58	
22					9,47	0,32					14,90	0,41					12,23	0,73					17,87	2,55					4,09	1,35	
23					9,45	0,36					14,49	1,49					12,45	0,57					18,16	2,33					4,02	1,23	
24					9,37	0,40					14,71	1,47					11,55	0,71					18,49	2,48					3,83	1,30	
25					9,26	0,44					14,69	1,59					12,13	0,61					18,40	2,42					3,58	1,26	
26					9,73	0,38					15,14	1,64					11,63	0,76					18,98	2,48					3,53	1,14	
27					9,48	0,32					14,48	1,43					11,96	0,75					18,83	2,63					4,04	1,40	
28					9,49	0,48					15,15	1,74					12,30	0,83					18,83	2,50					3,52	1,36	
29					9,77	0,29					15,44	0,52					11,59	0,68					19,14	2,58					3,51	1,41	
30					9,42	0,33					14,63	2,12					12,14	0,61					18,50	2,48					3,40	1,59	
31					9,92	0,31					15,56	1,13					11,80	0,87					19,02	2,43					3,51	1,48	
32					9,52	0,52					14,93	1,86					11,57	0,74					18,52	2,50					3,21	1,38	
33					9,73	0,45					15,11	1,71					12,19	0,53					18,58	2,72					3,25	1,40	
34					9,46	0,53					14,59	1,58					11,76	0,68					18,59	2,40					3,48	1,30	
35					9,27	0,56					15,23	1,86					12,62	0,58					18,36	2,54					3,51	1,53	
36					9,99	0,51					15,31	0,56					12,06	0,91					17,63	2,63					3,09	1,47	
37					9,33	0,45					14,87	1,59					12,25	0,82					18,10	2,62					2,79	1,70	
38					9,83	0,69					14,16	1,75					13,00	0,90					18,22	2,57					3,42	1,60	
39					9,82	0,36					15,12	1,79					12,31	0,82					18,67	2,55					3,71	1,76	
40					9,31	0,43					14,53	2,01					13,23	0,90					18,13	2,56					3,33	1,67	
41					9,59	0,46					14,58	1,75					12,99	0,91					19,02	2,59					3,14	1,66	
42					9,28	0,68					15,33	1,69					12,93	0,70					18,88	2,81					3,53	1,57	
43					9,85	0,59					14,56	1,62					13,83	0,73					18,45	2,47					3,69	1,31	
44					9,72	0,42					14,12	1,96					12,65	0,94					18,24	2,38					3,62	1,21	
45					9,53	0,42					14,90	1,72					14,31	0,74					18,93	2,46					3,72	1,51	
46					9,67	0,39					15,00	1,70					14,33	0,86					18,50	2,19					4,48	1,46	
47					9,34	0,45					14,06	2,04					13,47	1,10					19,53	2,62					4,20	1,24	
48					9,53	0,41					14,88	1,82					14,79	0,73					19,52	2,56					3,43	1,13	
GMW/STAB	15,84	0,52			11,57	3,33	22,34	1,60			17,32	4,84	26,27	1,26			15,52	4,61	18,21	2,20			18,92	1,37	14,23	0,79	7,28	5,42			
Quot Nachmessung/Leermessung																															
Abweichung Nachmessung zu Leermessung Quotient																															
Abweichung Nachmessung zu Leermessung Absolut (mmHg)																															

Stunde	Stundenmittelwerte K6.3			Stundenmittelwerte K7.1			Stundenmittelwerte K7.3			Stundenmittelwerte K8.3			Stundenmittelwerte K9.3																	
	Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessung STABW	Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessung STABW	Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessung STABW	Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessung STABW	Leermessung STABW	Intervention STABW	Nachmessung STABW															
1	9,41	1,38	10,62	2,42	13,89	1,90	23,89	4,58	27,60	1,91	27,80	1,81	19,17	3,31	19,03	2,90	20,19	2,78	10,98	1,94	11,81	2,28	11,87	6,75	7,82	1,01	17,84	2,00	20,07	1,91
2	9,92	1,50			13,17	2,14	26,29	3,09			22,90	4,46	20,32	2,86			18,82	2,89	11,44	1,59			8,81	0,93	8,86	0,94	20,62	1,97		
3	10,35	1,61			13,27	1,91	24,55	3,82			21,68	4,50	21,05	3,18			21,05	3,18	11,41	1,45			9,03	1,06	10,46	1,43	22,10	2,00		
4	10,58	1,87			14,20	2,27	23,17	4,29			19,38	4,42	21,04	2,94			22,09	3,19	11,58	1,48			9,68	1,05	13,57	1,94	21,93	2,20		
5					13,37	2,20					18,46	4,27					23,80	3,19					10,15	1,11			21,86	2,42		
6					13,36	1,84					17,54	4,22					25,48	3,57					10,48	1,28			21,57	2,23		
7					13,20	2,15					17,35	4,48					25,86	3,87					11,01	1,21			20,68	2,31		
8					12,79	1,98					17,30	4,07					25,32	3,50					11,33	1,36			20,84	2,05		
9					13,04	1,92					18,54	4,29					26,39	3,66					11,33	1,34			20,28	2,23		
10					12,22	2,04					17,48	4,24					25,52	3,71					11,62	1,42			20,31	2,21		
11					12,23	2,02					17,94	4,14					24,69	3,58					11,61	1,48			19,45	2,29		
12					12,68	1,97					17,24	3,97					23,04	3,60					11,83	1,51			19,37	2,20		
13					8,94	1,87					18,24	4,03					23,39	3,46					12,04	1,47			19,30	2,13		
14					6,17	1,01					17,75	4,16					23,52	3,61					11,87	1,53			18,68	1,97		
15					5,04	0,48					16,69	3,83					21,99	3,23					11,73	1,39			18,73	2,04		
16					4,39	0,41					15,77	3,44					21,01	3,12					11,84	1,28			17,95	1,53		
17					4,12	0,47					15,41	3,47					20,06	2,89					11,83	1,25			17,87	1,52		
18					3,62	0,33					15,62	3,43					20,73	2,90					11,98	1,08			17,84	1,52		
19					3,32	0,34					14,86	3,18					20,69	2,85					11,94	1,23			18,82	1,46		
20					3,03	0,31					13,99	3,19					19,85	2,85					11,86	1,18			14,17	6,15		
21					1,73	0,44					14,27	3,20					20,70	2,69					11,90	1,00				0,52		
22					1,99	0,25					14,05	2,81					20,63	2,46					11,56	1,05				0,19		
23					1,86	0,22					15,21	4,00					20,57	2,80					11,40	1,14				0,15		
24					2,01	0,26					14,53	2,75					21,28	2,39					11,65	1,21				1,65		
25					1,63	0,26					13,18	2,53					20,85	2,16					11,85	1,03				0,00		
26					1,52	0,21					12,30	2,48					19,44	2,23					11,48	0,99				0,00		
27					1,49	0,22					12,32	2,51					20,12	2,32					11,68	1,06				0,00		
28					1,36	0,22					11,83	2,64					19,33	2,53					11,55	1,10				0,00		
29					1,36	0,23					12,49	2,45					19,76	2,20					11,75	1,12				0,00		
30					1,17	0,21					12,26	2,76					19,85	2,77					11,96	1,14				0,00		
31					1,20	0,20					11,81	2,72					19,82	2,69					12,02	1,39				0,00		
32					1,27	0,23					11,23	2,48					19,11	2,35					11,95	1,31				0,00		
33					1,04	0,20					11,17	2,64					19,15	2,75					12,16	1,40				0,00		
34					1,05	0,29					11,09	2,53					19,64	2,51					12,13	1,44				0,00		
35					1,04	0,22					10,51	2,65					19,63	2,81					12,25	1,44				0,00		
36					1,07	0,19					10,57	2,57					19,86	2,85					12,42	1,51				0,00		
37					0,95	0,19					9,93	2,43					19,60	2,54					12,40	1,57				0,00		
38					1,03	0,22					9,84	2,32					18,99	2,57					12,47	1,57				0,00		
39					0,86	0,18					9,06	2,24					18,72	2,58					12,20	1,71				0,00		
40					0,89	0,19					9,15	2,32					18,68	2,55					12,49	1,62				0,00		
41					0,75	0,18					9,74	2,25					18,77	2,39					12,47	1,40				0,00		
42					0,56	0,18					9,73	1,35					17,75	1,41					12,33	1,37				0,00		
43					0,56	0,18					9,19	1,81					19,11	2,13					12,29	1,52				0,00		
44					0,59	0,19					8,48	1,93					17,48	1,96					12,48	1,39				0,00		
45					0,58	0,16					8,30	1,91					17,47	1,90					12,39	1,47				0,00		
46					0,56	0,16					8,68	1,98					17,74	2,01					13,16	1,54				0,00		
47					0,62	0,18					7,88	1,73					17,65	1,79					13,09	1,58				0,00		
48					0,55	0,17					8,07	1,67					17,43	1,65					12,77	1,51				0,00		
GMW/STAB	10,06	0,51			4,74	5,15	24,47	1,34			13,93	4,36	20,21	0,77		20,68	2,41	11,35	0,26			11,75	0,87	10,18	2,51		19,62	1,87		
Quot Nachmessung/Leermessung					0,47						0,57					1,02						1,03						1,92		
Abweichung Nachmessung zu Leermessung Quotient											-0,53					0,02						0,03						0,92		
Abweichung Nachmessung zu Leermessung Absolut (mmHg)					-5,32						-10,54					0,47						0,40						9,44		