

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Kopf- und Neurozentrum, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. M. S. Spitzer

Auswirkung des hydrostatischen Irrigationsdruckes auf das Hornhautendothel bei der Katarakt-Operation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von

Constanze Schultheiß
aus München

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.10.2022**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Klaus Püschel

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Spitzer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung:	5
1.1	Die Hornhaut.....	5
1.2	Das Hornhautendothel	6
1.3	Die Katarakt-Operation	7
1.4	Modell der organotypisch kultivierten Schweinehornhaut.....	8
1.5	Simulation einer Katarakt-Operation zur standardisierten Untersuchung einzelner Teilschritte	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Verwendete Materialien	14
2.1.1	Schweineaugen	14
2.1.2	Verwendete Substanzen.....	15
2.1.3	Instrumente und Verbrauchsmaterial	15
2.1.4	Geräte & Software	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Präparation der Schweineaugen	17
2.2.2	Vorbereitung des Kulturmediums.....	18
2.2.3	Simulation der Katarakt-Operation.....	18
2.2.4	Exzision der porkinen Hornhautlamellen („split corneal buttons“)	20
2.2.5	Wechsel des Kulturmediums.....	22
2.2.6	Mikroskopie der porkinen Hornhautlamellen	23
2.2.7	Färbung der „split corneal buttons“	25
2.2.8	Auswertung der Morphologie	26
2.2.9	Statistische Analyse.....	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Endothelzellzahl.....	28
3.2	Relativer Verlust an Endothelzellen.....	30
3.3	Morphologie des Endothels	31
4	Diskussion:	31
4.1	Auswertbarkeit der Daten.....	31
4.1.1	Stabile Ausgangsbedingungen.....	31
4.1.2	Einfluss der Färbung auf die Quantifizierung der Endothelzelldichte.....	32
4.2	Interpretation der Ergebnisse.....	32
4.2.1	Intraokularer Druck als Risikofaktor für Endothelverlust.....	33
4.2.2	Fließgeschwindigkeit und Turbulenzen als Risikofaktor für Endothelverlust	34
4.2.3	Schwachpunkte der Doktorarbeit	37
4.2.4	Konsequenzen für die klinische Anwendung.....	38
4.3	Analyse potentiell schädigenden Mechanismen der Katarakt-OP mittels Schweinehornhautkultur	40

5	Zusammenfassung.....	42
6	Literaturverzeichnis.....	46
7	Anhang.....	51
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	51
7.2	Tabellenverzeichnis.....	51
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	52
9	Danksagung.....	55
8	Lebenslauf.....	56
10	Eidesstattliche Versicherung.....	58

1 Einleitung:

In Deutschland ist die Katarakt-Operation nach der intravitrealen Injektion die am zweit-häufigsten durchgeführte Operation. Hierbei wird die natürliche Linse durch eine Kunstlinse ersetzt. Bei der Katarakt-Operation kommt es iatrogen zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Schädigung des Hornhautendothels, die zu einem Verlust an Endothelzellen (EZ) führt (Gogate et al. 2010; Dick et al. 1996). Die EZ der Hornhaut sorgen durch einen aktiven vom Stroma in Richtung intraokular gerichteten Wassertransport für die Klarheit der Hornhaut. Eine zu geringe Endothelzellzahl (EZZ) führt zu einer insuffizienten Pumpfunktion des Endothels und zum Aufquellen der Hornhaut – sie „dekompensiert“. Die postoperative Hornhautdekompensation nach einer Katarakt-Operation ist heutzutage einer der wichtigsten Gründe für die Durchführung einer Hornhauttransplantation und stellt somit ein sehr relevantes klinisches Problem dar (Shimazaki et al. 2007; Walkow, Anders, and Klebe 2000).

Bisher ist es unklar, welche Einzelparameter der Katarakt-Operation in welchem Ausmaß zu einer Endothelschädigung führen. In meiner Doktorarbeit habe ich mich mit dem Effekt des hydrostatischen Irrigationsdruckes der Spüllösung auf das Hornhautendothel befasst und diesen in einem standardisierten in-vitro Katarakt-Modell untersucht. Bei der Katarakt-Operation wird die Form des Auges und damit auch die Form des vorderen Augenabschnitts kontinuierlich durch eine Infusion von Spülflüssigkeit aufrechterhalten. Hierfür wird die Infusionsflasche mit der Spüllösung in unterschiedlicher Höhe über dem Auge platziert, so dass die Spülflüssigkeit passiv in Folge des hydrostatischen Druckes nachfließen kann. Die Infusionshöhe hat daher eine Auswirkung sowohl auf den intraokularen Augendruck als auch auf die Fließgeschwindigkeit der Spüllösung und die im Auge induzierten Turbulenzen. Alle Faktoren könnten prinzipiell zu einer EZ-Schädigung führen. Deshalb stellt der hydrostatische Druck der Spülflüssigkeit einen potentiellen Risikofaktor bei einer Katarakt-Operation dar.

1.1 Die Hornhaut

Die Hornhaut ist die erste optische Grenzfläche des menschlichen Auges für den einfallenden Lichtstrahl. Sie ist ca. 530 μm dick (Doughty and Zaman 2000) und setzt sich aus 5 Schichten zusammen (DelMonte and Kim 2011; Edelhauser 2006; Hos et al. 2019):

- Epithel: mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel (ca. 40 μm)

- Bowman-Membran: Basalmembran des Epithels (ca. 15 μm)
- Stroma: parallel ausgerichtete Kollagenfasern, Keratozyten, Proteoglykane (ca. 450 μm)
- Descemet-Membran: Basalmembran des Endothels (ca. 10 μm)
- Hornhautendothel: einlagige Zellschicht aus hexagonalen Zellen (ca. 4-5 μm)

Zudem besteht eine weitere azelluläre Schicht zwischen Descemet-Membran und Hornhautstroma - die Dua-Schicht (Dicke: $10,15 \mu\text{m} \pm 3,6 \mu\text{m}$)(Dua et al. 2013). Diese wird teilweise als sechste Hornhautschicht angesehen.

Für den Sehvorgang von entscheidender Bedeutung ist die Transparenz der Hornhaut. Wenn diese eintrübt, werden die einfallenden Lichtstrahlen unkontrolliert abgelenkt und können vom Auge nicht mehr auf der Makula gebündelt werden. Hierdurch leiden die Patienten an einer verminderten Sehschärfe sowie einer starken Blendung.

1.2 Das Hornhautendothel

Das Endothel liegt auf der Innenseite der Hornhaut und besteht aus einem Monolayer aus hexagonal angeordneten Zellen.

Durch den Augeninnendruck wird kontinuierlich Kammerwasser hydrostatisch in die Hornhaut hineingepresst. Die wichtigste Funktion des Endothels ist die konstante Dehydratation der Kornea. Nur hierdurch kann die Transparenz der Hornhaut aufrechterhalten werden. Ohne eine ausreichende Endothelfunktion, entwickelt sich deshalb ein Hornhautödem. Die Dehydratation des kornealen Stromas erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Tight Junctions, interdigitierenden Zellfortsätzen, aktive Transportproteine (u.a. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) in der endothelialen Zellmembran sowie weiteren Faktoren(He et al. 2016; Geroski and Edelhauser 1984; Mergler and Pleyer 2007; Edelhauser 2006; Fischbarg and Maurice 2004).

Die Funktionalität des Hornhautendothels hängt entscheidend von der Endothelzell-dichte (EZD) ab(Schroeter and Rieck 2009). Kommt es zu einem Verlust an EZ vergrößern sich die verbliebenen EZ kompensatorisch, da das Endothel sich in einem G-1-Phasen Zellzyklusarrest befindet und somit nur ein sehr geringes proliferatives Potential aufweist(Joyce et al. 1996; Joyce 2003). Ab einer EZD von ca. 500-800 Zellen / mm^2 ist die Pumpfunktion des Endothels soweit reduziert, dass die Dehydratation der Hornhaut durch die EZ nicht mehr aufrechterhalten werden kann – die Hornhaut quillt auf und „dekompensiert“(DelMonte and Kim 2011; Edelhauser 2006; Fischbarg and

Maurice 2004). Ist dieser Zustand erst einmal erreicht, kann die Transparenz der Hornhaut nur noch durch eine Hornhauttransplantation wiederhergestellt werden. Liegt ein isolierter Endothelschaden vor, ist die OP-Methode der Wahl eine Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK), bei der nur die Endothelschicht mit seiner Basalmembran transplantiert wird. Alternativ kann auch die gesamte Hornhaut (perforierende Keratoplastik) transplantiert werden(Matthaei et al. 2019). Da diese OP-Methode jedoch ein größeres Operationstrauma darstellt und höhere Abstoßungsraten sowie einen deutlich längeren Heilungsverlauf aufweist, stellt die perforierende Keratoplastik nur noch ein Reserveverfahren dar(Matthaei et al. 2019; Hos et al. 2019).

Die korneale EZD nimmt im Laufe des Lebens kontinuierlich ab. Die meisten Erwachsenen haben eine EZD zwischen 2500 und 3000 Zellen/ mm²(Filev et al. 2018; Krohn and Hovding 2005). Der jährliche Verlust an EZ liegt bei ca. 0,3-0,6% pro Jahr(Filev et al. 2018; Bourne, Nelson, and Hodge 1997; Hollingsworth et al. 2001; Krohn and Hovding 2005). Bei Erkrankungen wie der Fuchsschen Endotheldystrophie kommt es zu einer schnelleren Abnahme der EZD(Jeang, Margo, and Espana 2021). Zudem führen Traumata wie eine Katarakt-Operation zu einer gesteigerten Abnahme der EZD(Jeang, Margo, and Espana 2021).

Die Hornhautdekomensation nach einer Katarakt-OP stellt in Europa die zweithäufigste Ursache für eine Hornhauttransplantation dar(Matthaei et al. 2017). Der Verlust an EZ während einer Katarakt-OP ist deshalb ein klinisch äußerst relevantes Thema.

1.3 Die Katarakt-Operation

Jede natürliche Linse durchläuft einen Alterungsprozess, der schließlich zu einer Eintrübung der Linse führt. Die Linse besteht aus einem Linsenkapsel, einer Linsenrinde und einem Linsenkern. Bei der Katarakt- bzw. Grauen-Star-Operation wird der Linsenkern und die Linsenrinde durch eine Kunstlinse ersetzt und dauert in der Regel 10-15 Minuten. Die Linsenkapsel bleibt als natürlicher Halteapparat der Linse erhalten. Die Operation erfolgt in mehreren Schritten:

- 1) Anlegen der Zugänge zum Augeninneren (2 kleine und eine große korneale Inzision)
- 2) Kreisrunde Eröffnung der vorderen Linsenkapsel – Kapsulorhexis
- 3) Umspülen und Mobilisation des Linsenkerns
- 4) Aufarbeitung des Linsenkerns mittels Phakoemulsifikation (Ultraschallenergie)
- 5) Absaugen der Linsenrinde

- 6) Implantation der Kunstlinse in den verbliebenen Kapselsack
- 7) Verschluss der Zugänge

Während der Operation wird die Form des Auges entweder durch Spülflüssigkeit (Balanced Salt Solution (BSS)) oder Gel (Viscoelasticum) aufrechterhalten.

Obwohl die Katarakt-Operation eine der häufigsten Operationen in Deutschland darstellt und der bei der Katarakt-OP induzierte Verlust an EZ ein klinisch sehr relevantes Problem darstellt, sind die Auswirkungen der einzelnen Teilschritte auf das korneale Endothel nur unzureichend bisher untersucht. Die Phakoemulsifikation (intraokulare Ultraschallapplikation) führt zu einer Hydroxylradikalbildung während der Katarakt-OP und scheint beim EZZ-Verlust die bedeutendste Rolle zu spielen (Takahashi 2016). Ob aber der hydrostatische Druck der Spüllösung auch einen schädigenden Einfluss haben könnte, ist bisher weitestgehend unklar.

1.4 Modell der organotypisch kultivierten Schweinehornhaut

Humane Spenderhornhäute werden zumeist für Hornhauttransplantationen verwendet. Wegen des Mangels an Spenderhornhäuten und aus ethischen Gesichtspunkten können für experimentelle Untersuchungen diese daher nicht verwendet werden.

Die Forschungsgruppe um Prof. Spitzer hat deshalb in der Vergangenheit eine Methode entwickelt nicht humane Hornhäute zu kultivieren. Wegen dem sehr guten Zugang zu Schweineaugen erfolgte die Etablierung mit porkinen Hornhäuten.

Generell zeigen humane und porkine Hornhäute vergleichbare Eigenschaften (Sanchez et al. 2011; Kim and Hara 2015; Elsheikh, Alhasso, and Rama 2008). Ein großer Unterschied besteht jedoch in der Hornhautdicke. Humane Hornhäute besitzen im Zentrum eine Dicke um die 530 μm (Doughty and Zaman 2000), porkine Hornhäute hingegen je nach Literaturangabe zwischen 666 bis ca. 1000 μm (Sanchez et al. 2011; Jay et al. 2008; Menduni et al. 2018; Lee et al. 2014). Die hohe Streubreite in den Dickenangaben sind bedingt durch unterschiedliche Schweinerassen/ -alter und unterschiedliche Messmethoden. Im Vergleich zu humanen Korneas ist die Dickenzunahme insbesondere durch ein deutlich dickeres Hornhaut-Stroma bedingt. Während der Kultivierung geht regelhaft auch bei der humanen Hornhaut das Epithel verloren, so dass eine kultivierte humane Hornhaut hauptsächlich aus Hornhautstroma, der Bowman- und Deszementmembran sowie dem Endothel besteht. Das Nichtvorhandensein der Bowman.-Membran bei Schweinen stellt jedoch den zweiten wichtigen Unterschied zwischen human und porkinen Hornhäuten dar (Sanchez et al. 2011; Kim

and Hara 2015; Elsheikh, Alhasso, and Rama 2008). Deshalb besteht eine kultivierte porkine Hornhaut aus Hornhautstroma, der Deszementmembran sowie dem Endothel. Bei der Kultivierung sowohl der humanen als auch der porkinen Hornhaut kommt es zu einem Anschwellen des Hornhautstromas. In Folge der Ausdehnung des Stromas kommt es zu einer Wellung im Bereich der Deszement-Membran und somit zu einer vermehrten Spannung im Bereich der Deszementmembran(Kunzmann et al. 2018). Diese Wellung ist bei den humanen Hornhäuten jedoch nur gering ausgeprägt, so dass es zu keiner Schädigung des Endothelrasens kommt. Bei einer Kultivierung von porkinen Hornhäuten nach Vorbild der humanen Hornhäuten (gleiches Medium, gleiche Kultivierungsbedingungen, gleiche Präparation in Form von korneoskleralen buttons) jedoch, kam es insbesondere im Bereich der „Berge und der Täler“ der Deszementfalten zu einem vermehrten Endothelverlust(Kunzmann et al. 2018). Da dieser nicht standardisiert werden kann, waren porkine Hornhäute zur langfristigen Kultivierung und als in-vitro Modell vor der Etablierung durch die Forschungsgruppe von Prof. Spitzer nicht geeignet.

In der Etablierungsarbeit von Kunzmann et al. wurden deshalb unterschiedliche Präparationsmethoden mit einander untersucht und verglichen um porkine Hornhäute doch zur organotypischen Kultivierung zu nutzen (siehe Abbildung 1)(Kunzmann et al. 2018):

- „corneoscleral buttons“ (Exzidate bestehend aus der gesamten Hornhaut und einem Skleralring; entspricht der Methode bei humanen Spenderhornhäuten)
- „(non-split-) corneal buttons“ (Stanzen der Hornhaut ohne Skleralring (ø 7,5 mm))
- „split corneal buttons“ (lamellierte Stanzen der Hornhaut (ø 7,5 mm), bei denen 300µm des Stromas von der Epithelseite aus exzidiert worden ist)

Die „split corneal buttons“ zeigten hier den geringsten EZZ-Verlust nach einer 2-wöchigen Kultivierung (siehe Abbildung 2) (-11,1 % „split corneal buttons“ vs. -15,9 % „corneal buttons“) (siehe Abbildung 2)(Kunzmann et al. 2018). Der zusätzliche EZZ-Verlust bei den „corneal buttons“ ist am ehesten auf das vermehrte Aufquellen des Hornhautstromas zurückzuführen(Kunzmann et al. 2018).

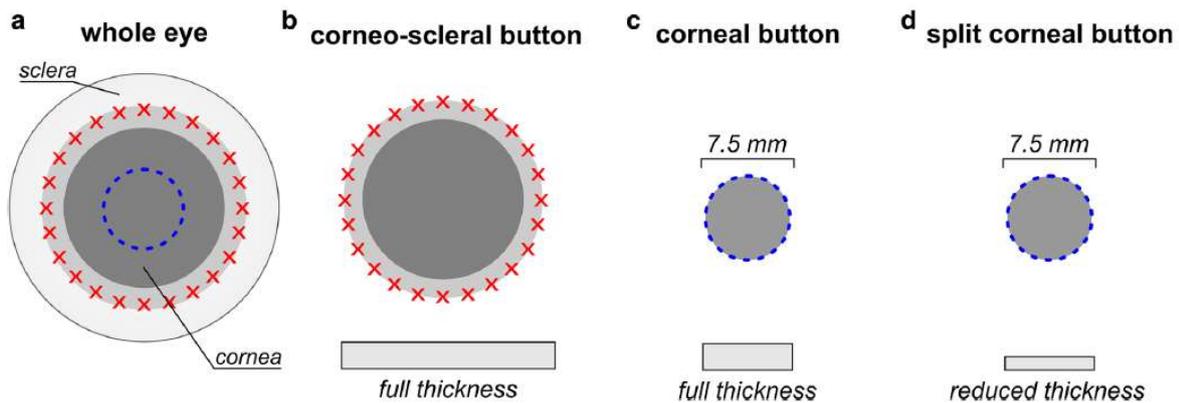


Abbildung 1 – Unterschiedliche Präparationsmethoden von porcinen Hornhäuten

Ganzes Auge (a, whole eye), korneosklerale Exzidate (b, “corneo-scleral buttons”), korneale Stanzen (c, “non-split corneal buttons”), lamellierte korneale Stanzen (d, “split corneal buttons”). In Abbildung a werden die unterschiedlichen Schnittländer auf einem ganzen Auge gezeigt. In den Abbildungen b-d werden die unterschiedlichen Präparationsmethoden dargestellt. Unter den jeweiligen Präparaten ist zudem die Dicke der Hornhaut relativ dargestellt (Kunzmann et al. 2018).

Mit freundlicher Genehmigung von Kunzmann et al. (2018)

Auch in der Auswertung der morphologischen Parameter zeigten die „split corneal buttons“ weniger Pleomorphismen (Polymegathismus (Variabilität der Zellgröße) und Polymorphismen (Variabilität der Zellform), Rosetten- und Reformations-Figuren (Aufreffen von mehr als 3 Zellen an einem Punkt; Aufeinandertreffen von drei Zellen würde der physiologischen hexagonalen Anordnung der Endothelzellen entsprechen) als die „corneal buttons“ (siehe Abbildung 3) (Kunzmann et al. 2018).

Korneoskleralen Präparate waren nach 15 Tagen Kultivierung sehr stark aufquollen, zeigten eine massive Faltenbildung und wiesen ubiquitär Areale ohne verbliebene EZ auf, so dass das eine repräsentative Auszählung wegen der starken Schäden nicht möglich war (siehe Abbildung 4).

Mit den „split corneal buttons“ besteht nun eine Kultivierungsmethode, die auch mit nicht humanen Hornhäuten eine organotypische Kultivierung bezogen auf die Hornhautendothelzellen ermöglicht. Deshalb habe ich diese Kultivierungsmethode in meiner Doktorarbeit verwendet.

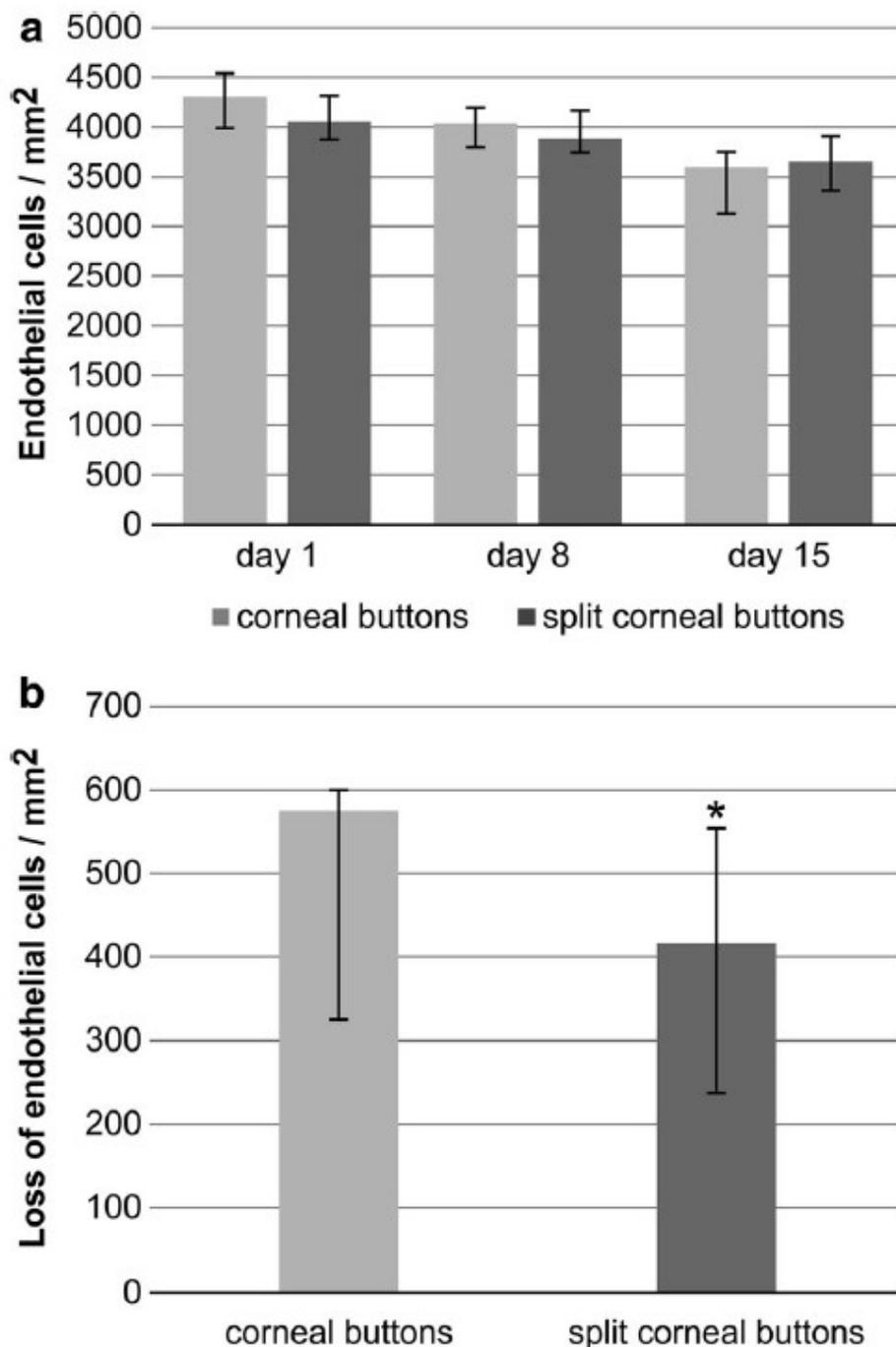


Abbildung 2 – Entwicklung der Anzahl an Endothelzellen

In den Balkendiagrammen sind in (a) die absolute Endothelzellzahl (EZZ) und in (b) der EZZ-Verlust an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 von „corneal buttons“ (hellgrau) und „split corneal buttons“ (dunkelgrau) dargestellt. Der EZZ-Verlust in „split corneal buttons“ ist signifikant geringer als in „corneal buttons“. (Kunzmann et al. 2018)

Mit freundlicher Genehmigung von
Kunzmann et al. (2018)

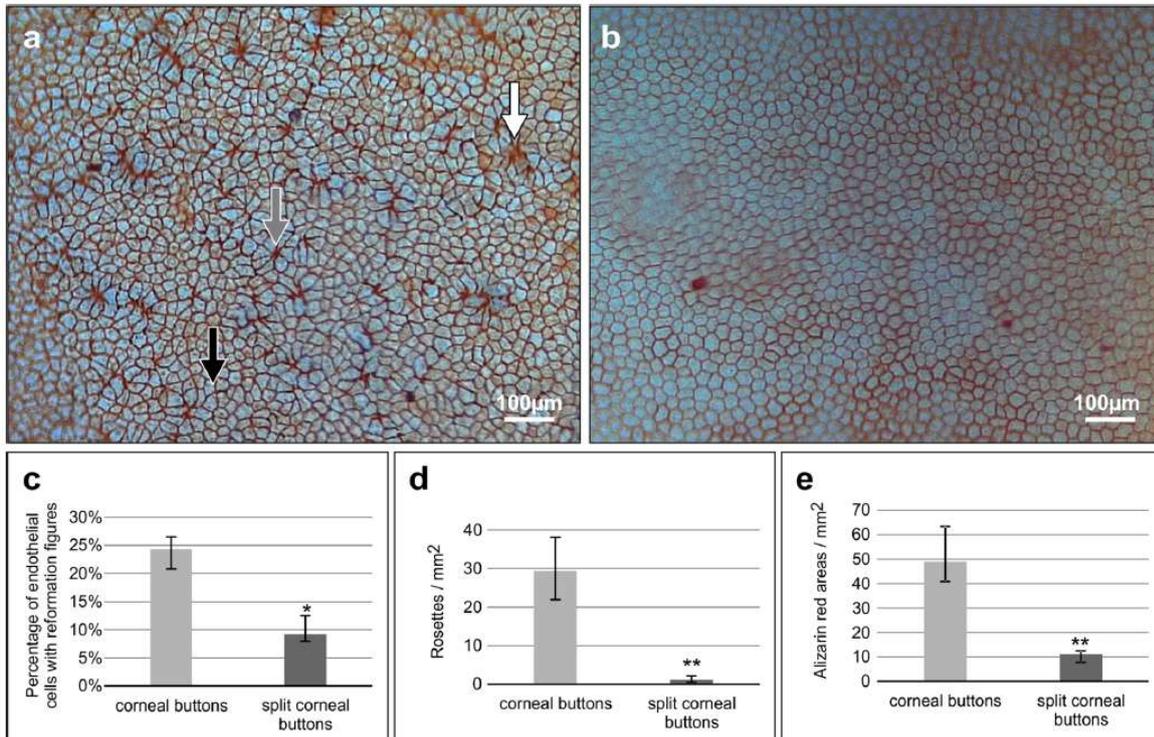


Abbildung 3 – Morphologische Veränderungen der Endothelzellen

In den Abbildungen (a) und (b) sind repräsentative Fotos des Endothelrasens bei „corneal buttons“ (a) und „split corneal buttons“ (b) dargestellt. Inferior sind die Graphen der Auswertung der Reformationsfiguren (c), der Rosettenformationen (d) sowie der Areale denudierter Descemet-Membran in Folge von lokalem Endothelverlust (e) („alizarin red areas“) aufgeführt. (Kunzmann et al. 2018)

Mit freundlicher Genehmigung von Kunzmann et al. (2018)

1.5 Simulation einer Katarakt-Operation zur standardisierten Untersuchung einzelner Teilschritte

Durch die Kultivierung porkiner Schweinhornhäute in einer organotypischen Kultur in Form von „split corneal buttons“ besteht die Möglichkeit die langfristigen Folgen bezogen auf das Hornhautendothel nach einer simulierten Katarakt-Operation an enukleierten Schweineaugen zu untersuchen. Hierbei können insbesondere einzelne, möglicherweise schädigende Faktoren der Katarakt-Operation unabhängig voneinander untersucht werden.

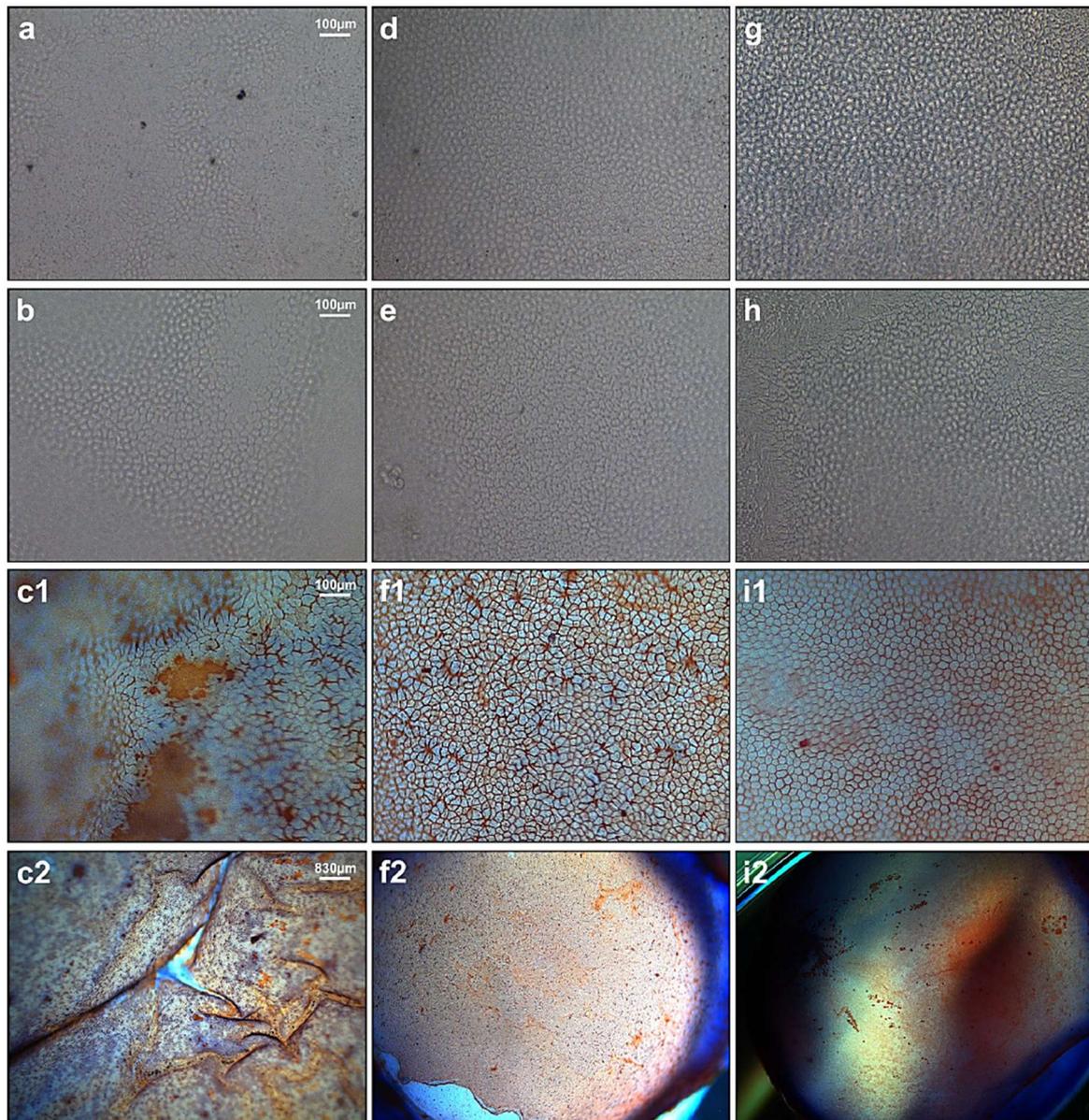


Abbildung 4 – Endothelrasen bei den unterschiedlichen Präparationsmethoden

Die Fotos zeigen die Entwicklung des Endothelrasens über einen Zeitraum von 15 Tagen: „corneoscleral buttons“ (a-c2), „corneal buttons“ (d-f2), „split corneal buttons“ (g-i2). Aufnahmen an Tag 1 (erste Reihe), Tag 8 (zweite Reihe), Tag 15 (dritte Reihe) und Übersichtsaufnahmen an Tag 15 (vierte Reihe).(Kunzmann et al. 2018)

Voraussetzung hierfür ist eine standardisierte Durchführung der Kataraktoperation ohne die Linse zu verletzen, da Linsenfragmente nicht standardisiert abgesaugt und von intraokular entfernt werden können. Deshalb habe ich in meiner Doktorarbeit die Katarakt-Operation in gleicherweise simuliert wie dies in der Etablierungsarbeit von

Kunzmann et al. beschrieben worden ist. Ich applizierte jedoch keine Ultraschallenergie.(Kunzmann et al. 2020)

Bei dieser vorausgegangenen Arbeit wurde nach Anlage der kornealen Inzisionen zur Einführung der Instrumente die Nadel des Phakoemulsifikationsgerätes unter stetiger Irrigation (105 cmH₂O) in der Mitte der Pupillarebene platziert.(Kunzmann et al. 2020) Anschließend erfolgte jeweils in 10 Sekunden Zeitintervallen entweder eine reine Irrigation oder eine Irrigation mit Aspiration (200 mmHg) und Freisetzung von Ultraschall-Energie (30 %).(Kunzmann et al. 2020) Bei einer Gesamtdauer von 5 Minuten Ultraschallenergie zeigte sich sowohl eine Schädigung des Endothels in der Färbung an Tag 15 der Gewebekultur als auch eine Reduktion der EZZ um 22,3% im Vergleich zu den Kontroll-Hornhäuten.(Kunzmann et al. 2020) Bei einer Höhe von 105 cm der Infusionslösung zeigte sich jedoch keine signifikante Reduktion der EZZ (Irrigationsgruppe: 11,8 % ± 5,3 / 2,6% vs. Kontrollgruppe: 10,2 ± 3,2 / 4,6 %).(Kunzmann et al. 2020) Deshalb wurde als Ausgangspunkt für meine Doktorarbeit eine Infusionsfläschenhöhe von 100cm gewählt, da bei diesem hydrostatischen Perfusionsdruck von keiner Endothelschädigung auszugehen war.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Schweineaugen

Die Schweineaugen stellen Schlachtabfälle dar, weshalb kein Ethikvotum oder ein Tierversuchsantrag notwendig war. Die Augen wurden unmittelbar nach der Tötung der Tiere durch die Angestellten eines lokalen Schlachtbetriebes (Itzehoe, Niedersachsen, Deutschland) vor einer thermischen Behandlung der Tiere entnommen und per Taxi in die Hornhautbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gebracht. Alle dargestellten Experimente erfolgten innerhalb von 24 Stunden nach der Tötung des Tieres.

2.1.2 Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
Povidon-Jod 7,5 %, Braunol®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Dulbecco's PBS (1X), #14190094	Gibco®, Paisley, Großbritannien
Culture Medium 1, #F9016	Biochrom GmbH, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS), S0415-GA	Biochrom GmbH, Berlin
Amphotericin B 250 µg/ml, A 2612	Biochrom GmbH, Berlin
Hypotone balancierte Salzlösung (Balanced Salt Solution), hBSS	Klinikinterne Apotheke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Trypanblau 0,4 %, #93595	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Alizarinrot S, #A5533-25G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natronlauge (NaOH) 0,1 M	laboreigene Ansetzung
Salzsäurelösung (HCl) 0,1 M	laboreigene Ansetzung
Natriumchlorid (NaCl), 0,9 %, 100 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Balanced Salt Solution	Alcon, Texas, USA
Viscoelasticum	Ophthalmo Pro, Deutschland

Tabelle 1 – Verwendete Substanzen

2.1.3 Instrumente und Verbrauchsmaterial

Gegenstand	Hersteller
Petrischalen	VWR International, Radnor, USA
Urinbecher (steril)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Millex®GV Filter Unit 0,22 µm	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland
Spritze, 5 ml	BD, Franklin Lakes, USA
Stumpfe Kanüle mit Filter (5 µm) 18G	BD, Franklin Lakes, USA
Einmal-Skalpell (flach)	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Kolibripinzette	Geuder AG, Heidelberg
Hockey-Messer	Geuder AG, Heidelberg

Fadenpinzette	Geuder AG, Heidelberg
Nadelhalter	Geuder AG, Heidelberg
Fadenschere	Geuder AG, Heidelberg
Präparationsschere	Geuder AG, Heidelberg
Federschere	Geuder AG, Heidelberg
Trepan, ø 7,5 mm	Geuder AG, Heidelberg
Faden 10-0, Ethilon Polyamid 6	Ethicon Inc., Somerville, USA
Accu-jet® pro	Brand GmbH, Wertheim
Serologische Pipette, 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Serologische Pipette, 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Bulbushalter	L. Klein
Zellkulturtestplatten (12-Well)	Corning Inc., Corning, USA
Handschuhe (steril), Peha-micron Plus	Hartmann GmbH, Heidenheim
OP-Kopfhaube	FarStar® medical GmbH, Barsbüttel
OP-Gesichtsmaske	FarStar® medical GmbH, Barsbüttel
Steriles Abdecktuch, Foliodrape®	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Eppendorf-Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Wägebapier	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Faltenfilter, ø 185 mm	Whatman, Maidstone, Vereinigtes Königreich
Laborgewindeflasche, 100 ml	Schott AG, Mainz
Rührfisch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Becherglas, 50 ml	Schott AG, Mainz
30° Phako-Tip	Fritz-Ruck GmbH, Deutschland
Phako Silikon-Sleeve	Fritz-Ruck GmbH, Deutschland
Irrigations- und Aspirationsschläuche für die Pentasys II	Fritz-Ruck GmbH, Deutschland

Tabelle 2 – Verwendete Instrumente und Verbrauchsmaterial

2.1.4 Geräte & Software

Gegenstand	Hersteller
Binokulares OP-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena
Kaltlichtquelle KL 1500	Schott AG, Mainz
Sicherheitswerkbank LaminaAir® HB2472	Heraeus GmbH, Hanau
Inkubationsschrank	Heraeus GmbH, Hanau
Feinwaage	Ohaus Europe GmbH, Greifensee, Schweiz
Magnetrührer mit Heizfunktion	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
pH-Meter pHenomenal	VWR International, Radnor, USA
Autoklav	Fedegari S.p.A., Albuzzano, Italien
Inverses Phasenkontrastmikroskop, Eclipse Ti phase-contrast microscope	Nikon GmbH, Tokio, Japan
Endothelium analysis software,	Robin Solutions, Haan, Germany
R (Software)	R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vi- enna, Austria; https://www.R-project.org/
Pentayses II	Fritz-Ruck GmbH, Deutschland

Tabelle 3 – Verwendete Geräte und Software

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der Schweineaugen

Nur optisch unversehrte Schweineaugen wurden für die Versuche verwendet. Die Schweinebulbi wurden von jeglichem periorbitalen Gewebe gereinigt und anschließend in einer 1:20 verdünnten Jodlösung für 5 Minuten in einem sterilen Urinbecher desinfiziert (3 ml Jod (Braunol®, Povidon-Jod 7,5 %) mit 57 ml PBS-Lösung (Dulbecco's PBS, Gibco®)). Anschließend erfolgte ein Spülvorgang in einem mit PBS gefüllten sterilen Urinbecher.

2.2.2 Vorbereitung des Kulturmediums

Bei der Kultivierung der „split corneal buttons“ wurde das Hornhautmedium verwendet, das ebenfalls bei der Kultivierung von humanen Hornhäuten in der Hornhautbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwendet wird.

Mittels einer 5ml Spritze (BD, USA) und einer stumpfen Kanüle (BD, USA) werden 2 ml FCS (fetal calf serum, fetales Kälberserum, Biochrom, Berlin) aufgenommen und über einen Spritzenfilter (Millex®GV Filter Unit 0,22 µm, Merck Millipore Ltd.) sterilfiltriert und zu 80 ml Kulturmedium I (Culture Medium I, ohne Dextran, Biochrom, Berlin) hinzugegeben. Um einer möglichen Kontamination mit Pilzen entgegenzuwirken wird das Medium zudem mit 0,8 ml Amphotericin B (250 µg/ml, Biochrom GmbH, Berlin) versetzt.

Von dieser Stocklösung werden anschließend 3ml in jedes Well einer 12-Well Zellkulturplatte pipettiert, in denen dann die „split corneal buttons“ kultiviert werden können.

2.2.3 Simulation der Katarakt-Operation

Zur Entnahme der Hornhäute wurden die Augen aus der PBS-Lösung entnommen und im sterilen Umfeld (steriles Tuch, Handschuhe, Kopf-/Mundschutz) auf einem Bulbushalter (L. Klein) platziert. Als Operations-Maschine wurde eine Pentasys II (Fritz-Ruck GmbH, Deutschland) verwendet. Zum Erhalt der Transparenz und der Verhinderung eines Austrocknens der Hornhaut wurde Viscoelasticum (Ophthamo Pro, Deutschland) zentral auf die Hornhaut gegeben. Unter einem OP-Mikroskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) wurde ein 2,75 mm breiter TUNEL-Schnitt (Mani, Utsonomya, Japan) am korneoskleralen Übergang gesetzt. Anschließend wurde ein 30° Phako-Tip (Fritz-Ruck, Deutschland), der von einem Silikon-Sleeve (Fritz-Ruck, Deutschland) zur Irrigation umgeben war vorsichtig unter dauerhafter Perfusion in das Auge eingeführt. Der Phako-Tip wurde mit der Öffnung nach unten, mittig in der Pupillarebene platziert. Anschließend erfolgte jeweils in 10 Sekunden Zeitintervallen die Aktivierung bzw. Nicht-Applikation der Aspiration (200 mmHg) für insgesamt 10 Minuten. Die Höhe der Perfusionsflasche zur Irrigation des Auges wurde variiert (150-, 125-, 100 cm). Diese Höhe gibt immer die Wassersäule an, die über dem Niveau des Auges steht. Zudem

wurde eine Versuchsreihe mit einer Höhe von 150cm der Perfusionsflasche durchgeführt, bei dem vor Einführen des Phakotips die Vorderkammer mit Viscoelasticum gefüllt worden ist. Als Kontrollgruppe wurden „split corneal buttons“ ohne simulierte Katarakt-OP verwendet.

Die unterschiedlichen Versuchsgruppen sind im Folgenden zusammengefasst (siehe Abb. 5):

- **Kontrolle** (n = 13);
- **BH100** (I/A, Flaschenhöhe 100 cm über dem Augenlevel; n = 12);
- **BH125** (I/A, Flaschenhöhe 125 cm über dem Augenlevel; n = 14);
- **BH150** (I/A, Flaschenhöhe 150 cm über dem Augenlevel; n = 13);
- **BH150+V** (I/A + Viscoelasticum, Flaschenhöhe 150 cm über dem Augenlevel; n = 14).

Am Ende der Simulation der Katarakt-OP – also vor Präparation des „split corneal buttons“ - wurde die Vorderkammer mit Viscoelasticum gefüllt um eine iatrogene Schädigung des Endothels (durch Abflachung der Vorderkammer) bei der Trepanierung zu verhindern.

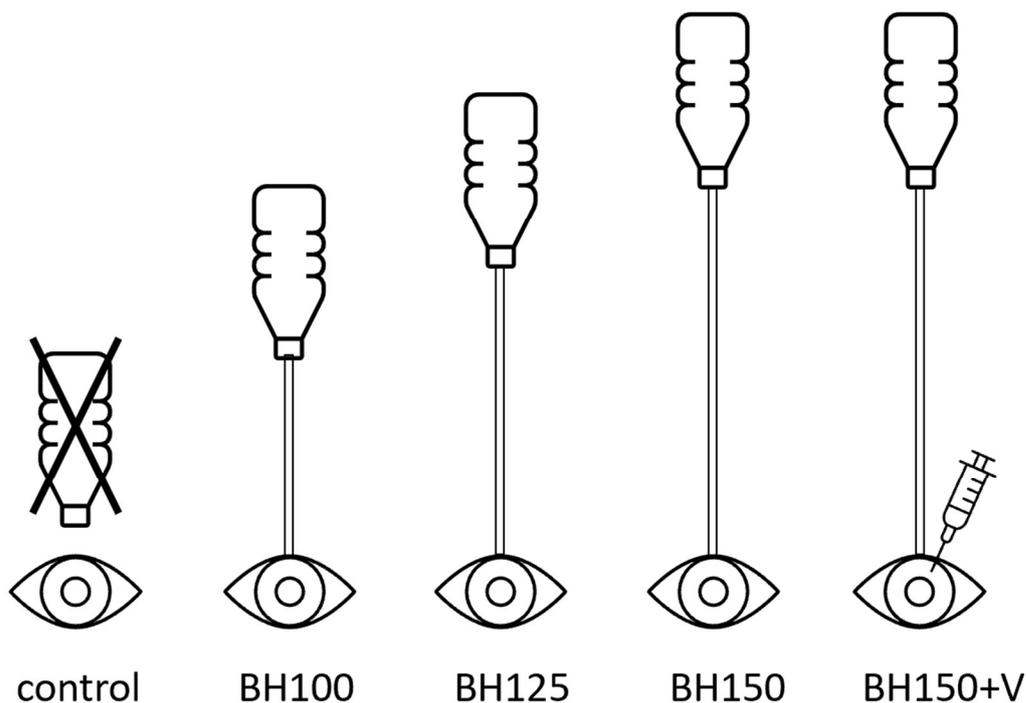


Abbildung 5 - Schematische Darstellung der Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 5 unterschiedliche Versuchsgruppen miteinander verglichen. Kontrollen erhielten keine Simulation der Katarakt-OP. Die Flaschenhöhe (BH) wurde je nach Versuchsgruppe bei der simulierten Katarakt-OP zwischen 100 und 150cm Wassersäule variiert (BH100, BH125, BH150). In der letzten Versuchsgruppe wurde zudem vor der Einführung des Phako-Tips und dem Beginn der Irrigation Viscoelasticum in die Vorderkammer eingegeben (BH150+V). Bei dieser Versuchsgruppe betrug die Flaschenhöhe 150 cm.

2.2.4 Exzision der porkinen Hornhautlamellen („split corneal buttons“)

In vorangehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch die Präparation eines „split corneal buttons“ (Reduktion der Hornhautdicke um 300 µm) es zu einem verminderten Aufquellen des Hornhautstromas kommt (im Vergleich zu nicht lamellierten Hornhautstanzen) und hierdurch bei der Kultivierung ein geringerer EZZ-Verlust zu verzeichnen ist. (Kunzmann et al. 2018) Die einzelnen Schritte der Präparation sowie ein „split corneal button“ sind in Abbildung 6 und 7 schematisch illustriert.

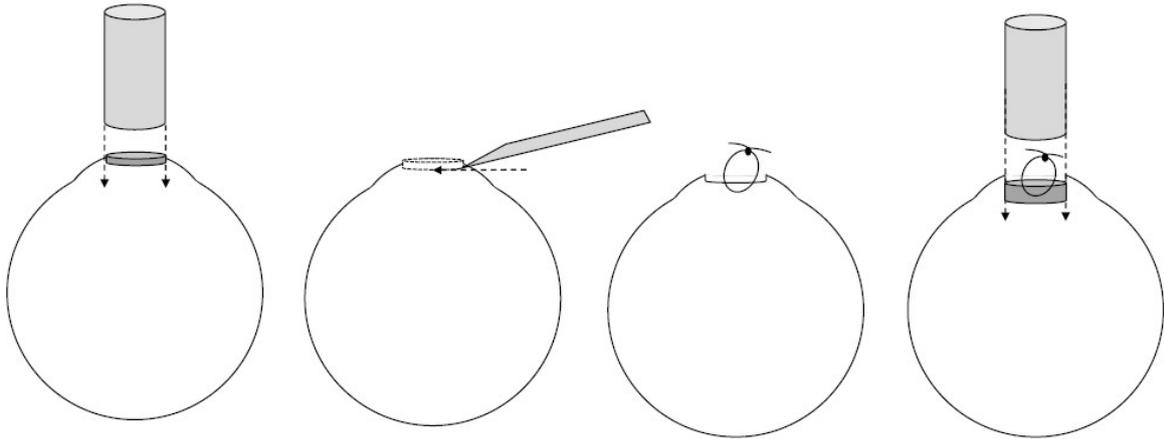


Abbildung 6 - Schematische Darstellung der Präparation eines split corneal buttons

300 µm tiefe Stanzung der Hornhaut mit einem Trepan (ø 7,5mm); Abtragung des epithelseitigen Hornhautstromas am Grund der Vorstanzung (in 300µm Tiefe); Applikation einer Faden-Markierung und schließlich vollständige Trepanisierung zur Erstellung eines freien „split corneal buttons“.

Mit freundlicher Genehmigung von Wenzel et al. (2019)

Zur standardisierten Lamellierung erfolgte zuerst eine Stanzung mit einem Trepan (ø 7,5 mm), der lediglich 300µm tief in die Hornhaut eindringen kann. Anschließend wird unter dem Präparationsmikroskop (Carl Zeiss AG, Jena) am Grund des Trepan­schnittes das epithelseitige Stroma mit einem geraden Einmal-Skalpell (Aesculap, Tuttlingen) exzidiert.

Danach wird zur Unterscheidung zwischen der Stroma- bzw. der Endothelseite eine Markierung mittels eines chirurgischer Fadens (Ethilon Polyamid 6, 10-0, Ethicon Inc., USA) gesetzt. Hierfür wird mittels eines Nadelhalters und einer Fadenpinzette der Faden locker auf der Stromaseite geknüpft ohne Spannung auf das Gewebe auszuüben. Sollte hierbei die Lamelle mit der Nadel durchsto­chen worden sein, wurde der Bulbus verworfen.

Anschließend erfolgte mit einem weiteren Trepan (ø 7,5 mm) die vollständige Trepanisierung der Hornhaut. Der nun freie „split corneal button“ wurde mit einer Kolibri-Pinzette gegriffen, etwaige Gewebebrücken mit der Westcott-Schere durchtrennt und anschließend in das bereits mit Kulturmedium gefüllte Well der 12-Well-

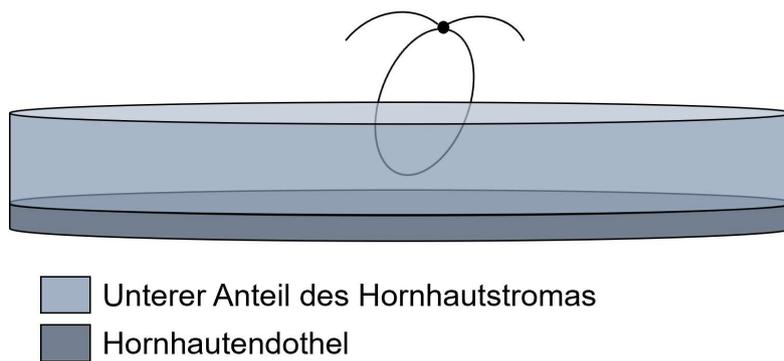


Abbildung 7 - Schematische Darstellung eines split corneal buttons

Die lockere Fadenmarkierung ohne Verziehung des Gewebes befindet sich auf der Stromaseite des split corneal buttons. Das Hornhautendothel bleibt während der gesamten Präparation unangetastet.

Mit freundlicher Genehmigung von Wenzel et al. (2019)

Kulturplatte gegeben. Die Kultivierung erfolgt unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) in einem Brutschrank (Heraeus GmbH, Hanau) wie dies auch bei humanen Korneas erfolgt (Schroeter et al. 2009).

Die Endothelseite des „split corneal buttons“ wurde wenn möglich zu keinem Zeitpunkt berührt. Zudem wurde sehr genau darauf geachtet, dass der „split corneal button“ mit dem Faden zum Well-Boden hingelagert wurde. Die Lagerung wurde nach jeder Bewegung der 12-Well-Kulturplatte geprüft, da ansonsten Lagerungsschäden mit konsekutiven Verlust des Endothels entstehen können. Zudem wurde jedem „split corneal button“ eine eindeutige Identifikationsnummer zugeordnet.

2.2.5 Wechsel des Kulturmediums

Beim Wechsel des Kulturmediums nach 8 Tagen wird ebenfalls als Basis das Dextranfreie Kultur-Medium 1 (Culture Medium I, w/o Dextran, Biochrom GmbH, Berlin) verwendet. Das Kulturmedium (80ml) wird erneut vor dem Wechsel des Kulturmediums mit 2 ml fetalem Kälberserum (Biochrom GmbH, Berlin) aber nicht mit Amphotericin B versetzt.

Der Wechsel des Kulturmediums erfolgt stets am 8. Tag. Dies entspricht auch dem normalen Ablauf der Kultivierung von humanen Spenderhornhäuten. (Filev et al. 2018)

Hierbei wird bei jedem Well das alte Zellkulturmedium mit einer Pipette abgesaugt. Dabei wird stets darauf geachtet, dass sich der „split corneal button“ nicht umdreht und die Fadenmarkierung immer zum Boden zeigt. Anschließend erfolgte je Well die Zugabe von 3ml des neu angesetzten Kulturmediums ohne Amphotericin B.

Bestand in einem Well der Zellkulturplatte eine Verfärbung des pH-Indikators (Gelbfärbung) oder war das Kulturmedium nicht mehr klar sondern trübe, wurde die gesamte Platte wegen der Gefahr der Verunreinigung der Proben (Pilz- oder Bakterienbefall) verworfen.

Substanz	Menge	Medium Tag 0	Medium Tag 8
Culture Medium 1	80 ml	✓	✓
Fetales Kälberserum	2,0 ml	✓	✓
Amphotericin B	0,8 ml	✓	-

Tabelle 4 – Zusammensetzung des Kulturmediums an Tag 0 und Tag 8

2.2.6 Mikroskopie der porkinen Hornhautlamellen

Der endotheliale Zellrasen wurde an Tag 1 und Tag 15 mittels eines inversen Phasenkontrastmikroskops (Nicon Eclipse Ti phase-contrast microscope) fotografiert und anschließend analysiert. Vor der Mikroskopie wurde jeder split corneal button für 1-2 min in 3ml hypotoner BSS- Lösung (hBSS, hypotonic balanced salt solution; pro 1 Liter H₂O: NaCl 4,9 g; KCl 0,75 g; CaCl x H₂O 0,49 g; MgCl₂ x H₂O 0,3 g; Sodium Acetat x 3 H₂O 3,9 g; Sodium Citrat x 2 H₂O 1,7 g; bei einem pH von 7,2 beträgt die Osmolarität 0,25 osmol/kg) inkubiert um die EZ sichtbar zu machen. Durch die Inkubation von kornealen EZ in hBSS kommt es zu einem Anschwellen der EZ, wodurch die Zellgrenzen gesehen werden können. Dies stellt auch die Routine bei der Begutachtung von humanen Spenderhornhäuten dar. Für die Inkubation wurde erneut eine 12 Well Zellkulturplatte verwendet.

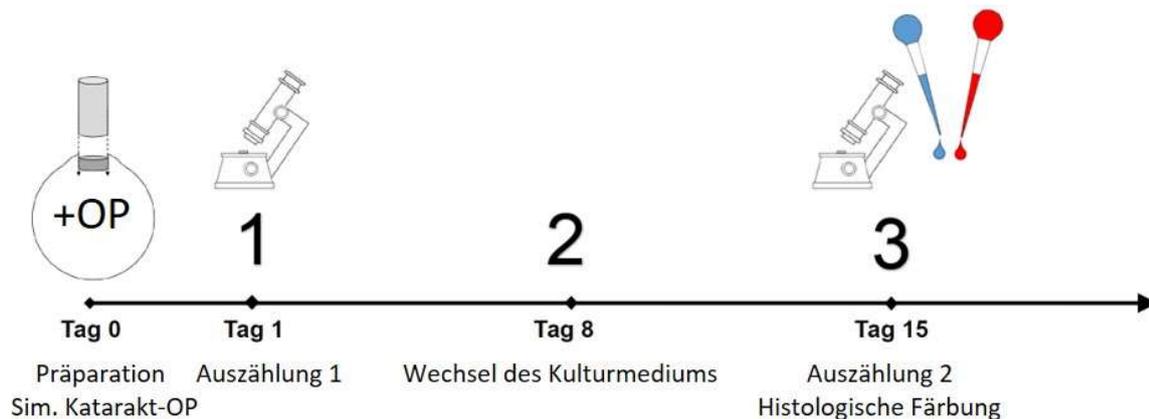


Abbildung 8 – Versuchsablauf

Vor der Präparation erfolgte außer bei den Kontrollaugen die Simulation einer Katarakt-Operation. Nach Präparation und Einbettung in Kulturmedium an Tag 0 erfolgte je eine Auszählung an Tag 1 und Tag 15. Zusätzlich wurden die Präparate nach der ungefärbten Auszählung an Tag 15 mit einer 0,25 %-Trypanblau-Lösung und 0,2 %-Alizarinrot S-Lösung für die morphologische Auswertung gefärbt.

Da es sich um ein inverses Phasenkontrastmikroskop handelte, wurden die „split corneal buttons“ mit dem Endothel zum Boden des Wells positioniert. Um eine mechanische Alteration der „split corneal buttons“ zu verhindern wurden Bewegungen so gut es ging vermieden. Zudem wurde darauf geachtet, dass ein „split corneal button“ niemals länger als 5 Minuten hBSS ausgesetzt war. (Wolf et al. 2009)

Je „split corneal button“ wurden 3 unterschiedliche Areale fotografiert (200-fache Vergrößerung). Zur Auszählung der EZZ wurden anschließend je Endothelfoto 2 Quadrate mit einer Fläche von $100 \mu\text{m}^2$ verwendet. Hierdurch erfolgte die Bestimmung der EZZ je „split corneal button“ durch die Auszählung von insgesamt $6 \times 100 \mu\text{m}^2$ großen Quadraten. In der täglichen Routine bei humanen Spenderhornhäuten erfolgt die Bestimmung der EZZ mit nur einem Auszählquadrat mit einer Fläche von $100 \mu\text{m}^2$. Durch das Auszählen von insgesamt 6 Quadraten sollte die EZZ möglichst genau bestimmt werden und somit lokale Schwankungen in der EZZ ausgeglichen werden um stabilere und repräsentativere Ergebnisse zu erhalten. Zudem wurde eine semi-automatisierte EZZ-Zähl-Software (Endothelium analysis software, Robin Solutions, Germany) verwendet um die Auszählung möglichst objektiv zu gestalten. Nach Bildung

des Mittelwertes der EZZ wurde dieser mit dem Faktor 100 multipliziert um eine Darstellung der EZZ pro mm² zu ermöglichen.

Für die Auswertung der morphologischen Parameter wurden mit Trypan Blau und Alizarinrot gefärbte split corneal buttons verwendet (siehe folgendes Kapitel). Die Auszählung der Reformationsfiguren, der Rosettenformationen und der Alizarin-roten Areale erfolgte in Analogie zur Bestimmung der EZZ.

2.2.7 Färbung der „split corneal buttons“

Die Färbung der „split corneal buttons“ erfolgte ausschließlich an Tag 15, da die verwendeten Färbemittel (Alizarin-rot) zytotoxisch sind und somit eine weitere Kultivierung nicht möglich gewesen wäre.

In Analogie zur Methode von Taylor & Hunt erfolgte die Färbung mit einer 0,25 %-Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, USA) und 0,2 %-Alizarinrot S-Lösung (Sigma-Aldrich, USA). (Taylor and Hunt 1981)

Hierbei wird die Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, USA) durch Zugabe von 0,9 %iger NaCl-Lösung auf eine 0,25 %-Lösung verdünnt. Zur Herstellung der 0,2 %-Alizarinrot S-Lösung (Sigma-Aldrich, USA) wurden 100 mg des Alizarinrot S-Pulvers abgewogen und in 50 ml 0,9 %iger-NaCl-Lösung aufgelöst. Dies erfolgte unter ständigen Rühren (mit Hilfe eines Rührfisches) und einer Erhitzung auf ca. 50 °C. Nachdem die Lösung optisch klar war, erfolgte eine Filtrierung der Lösung durch einen Faltenfilter zur Beseitigung von verbliebenen Klumpen. Um ein bestmögliches Färbeverhalten zu erreichen wurde zum Schluss die Lösung durch die Zugabe von 0,1 M Natronlauge-Lösung bzw. 0,1 M Salzsäure-Lösung auf einen pH von 4,2 titriert. (Taylor and Hunt 1981)

Nach Fertigstellung der Färbelösungen erfolgte die Färbung wie im Folgenden dargestellt:

1. Positionierung des „split corneal buttons“ mit der Endothelseite nach oben (Fadenmarkierung unten) in einer Petrischale
2. Applikation (Beträufeln) der 0,25 %igen Trypanblaulösung für 90 s
3. Spülen des „split corneal buttons“ durch das Schwenken des „split corneal buttons“ in einem mit 0,9 % NaCl gefüllten Becherglas. Hierbei wird der „split corneal button“ mittels einer Kolibri-Pinzette im Bereich des Stromas gegriffen

4. Erneute Positionierung des „split corneal buttons“ mit der Endothelseite nach oben (Fadenmarkierung unten) in einer Petrischale
5. Applikation (Beträufeln) der 0,2 %igen Alizarinrot-S-Lösung für 90 s
6. Erneutes Spülen des „split corneal buttons“ durch das Schwenken des „split corneal buttons“ in einem mit 0,9 % NaCl gefüllten Becherglas.
7. Positionierung des „split corneal buttons“ in einer 12 Well Zellkulturplatte mit hBSS mit der Endothelseite zum Boden (Fadenmarkierung oben)

Die Fotografien wurden anschließend wieder wie bei der Auszählung der EZZ angefertigt.

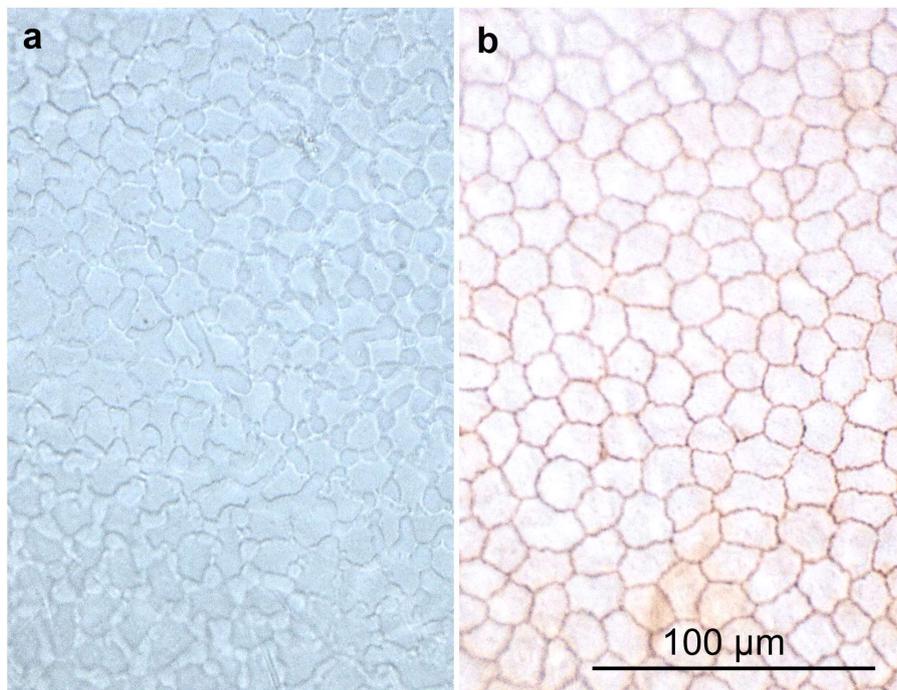


Abbildung 9 – Hornhautendothel ohne (a) und mit (b) Färbung

Die Färbung erfolgte mit Trypanblau und Alizarinrot S.

Mit freundlicher Genehmigung von Wenzel et al. (2019)

2.2.8 Auswertung der Morphologie

Der Untergang von EZ führt dazu, dass weniger Zellen in Folge von kompensatorischer Vergrößerung eine hexagonale Struktur vorweisen. Des Weiteren erfolgen Umbauvor-

gänge des Endothelrasens um diesen möglichst weiterhin geschlossen zu halten. Deshalb sind in der Literatur insbesondere 3 unterschiedliche morphologische Kriterien benutzt worden um EZ-Untergang und –Reorganisation indirekt zu quantifizieren (siehe Abbildung 1010:

- **Reformationsfiguren** – hierbei treffen in Folge von Zelluntergang mindestens 4 Zellen in einem Punkt zusammen
- **Rosettenformation** – hierbei haben sich mindestens 5 Zellen in Form einer Rosette um eine untergehende Zelle angeordnet
- **Alizarin-rote Areale** – diese Areale stellen eine denudierte Descemet-Membran dar

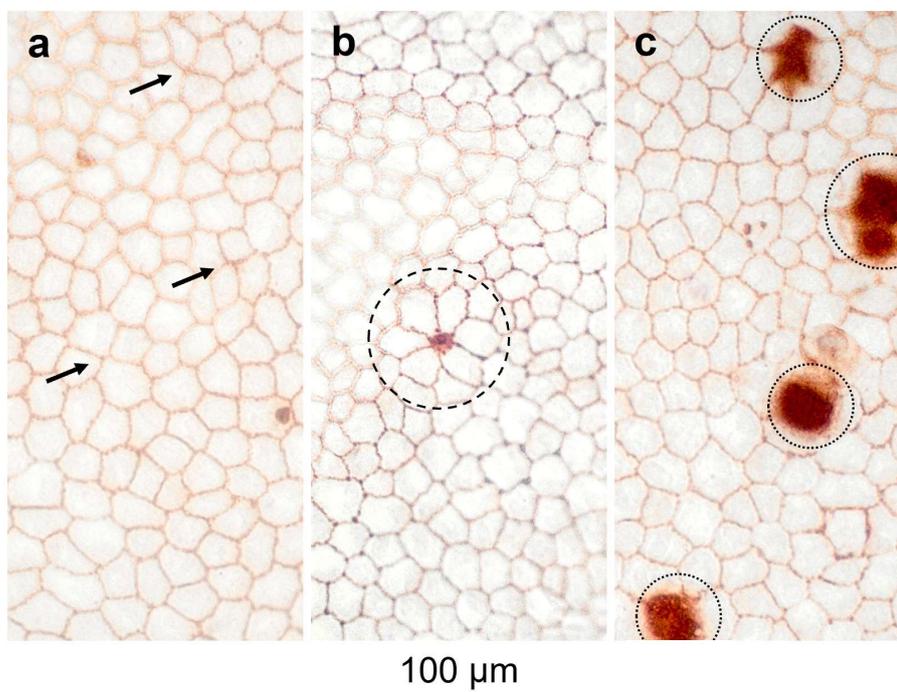


Abbildung 10 – Verwendete morphologische Kriterien

(a) Reformationsfiguren (b) Rosettenformationen (c) Alizarin-rote Areale

Mit freundlicher Genehmigung von Wenzel et al. (2019)

2.2.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde von dem Statistiker der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Herrn Vasył Druchkiv, durchgeführt.

Um signifikante Unterschiede bezüglich der EZZ zwischen den Gruppen zu detektieren wurde eine ANOVA-Analyse durchgeführt. Die Unterschiede innerhalb der Gruppen

wurden mit dem gepaarten T-Test untersucht. In beiden Fällen wurde die Annahmen der Normalität und Homogenität der Varianzen mittels Kolmogorov - und Levene Test geprüft und bestätigt ($p < 0,05$). Die p-Werte aus den Vergleichen wurden mit der Bonferroni-Korrektur adjustiert. Die Unterschiede der relativen EZZ-Verluste an Tag 15 wurden durch eine gemischte Regressionsanalyse mit folgendem paarweisen Vergleich analysiert. Die sich aus den Modellen ergebenden p-Werte wurden mit der Bonferroni-Methode korrigiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm die Standardabweichung. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert $\leq 0,05$ nach erfolgter Bonferroni-Korrektur angenommen. Alle Analysen erfolgten mit R Core Team (2019).

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 66 Hornhautpräparate (split corneal buttons) in der endgültigen Analyse berücksichtigt. Insbesondere an Tag 1 waren teilweise die EZ nicht gut sichtbar, so dass keine ausreichenden Fotos für die Auswertung angefertigt werden konnten. Da ein fehlender Ausgangswert eine Beurteilung bezüglich der Entwicklung des „split corneal buttons“ unmöglich macht, mussten diese aus der Auswertung herausgenommen werden (Kontrolle $n = 3$; BH125mmHg $n = 2$; BH150 mmHg $n = 3$).

3.1 Endothelzellzahl

Die Absolute EZZ war an Tag 1 sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der BH125 Gruppe signifikant niedriger gewesen als in den restlichen Gruppen. Alle Gruppen jedoch zeigten einen sehr gut erhaltenen Endothelrasen in der mikroskopischen Begutachtung. Zudem war der Unterschied in der absoluten EZZ trotz der bestehenden Signifikanz eher gering und nicht auf eine generelle Schädigung der EZ in den entsprechenden Gruppen zurückzuführen. Der geringste Mittelwert der absoluten EZZ hatte die Gruppe BH125 mit 3909 ± 379 und den höchsten Mittelwert die Gruppe BH100 mit 4356 ± 300 (siehe Tabelle 5).

	Kontrolle (N=13)	BH100 (N=12)	BH125 (N=14)	BH150 (N=13)	BH150+V (N=14)
Tag 1					
Range	3747 - 4526	3626 - 4928	3394 - 4480	3991 - 4648	3927 - 4575
Mittelwert (SD)	3999 (230)	4356 (300)	3909 (379)	4324 (241)	4319 (188)
Tag 15					
Range	3230 - 3838	3337 - 4538	2281 - 3887	2579 - 3930	3346 - 4295
Mittelwert (SD)	3611 (195)	3934 (312)	3149 (549)	3373 (403)	3848 (258)

Tabelle 5 – Endothelzellzahlen der einzelnen Gruppen

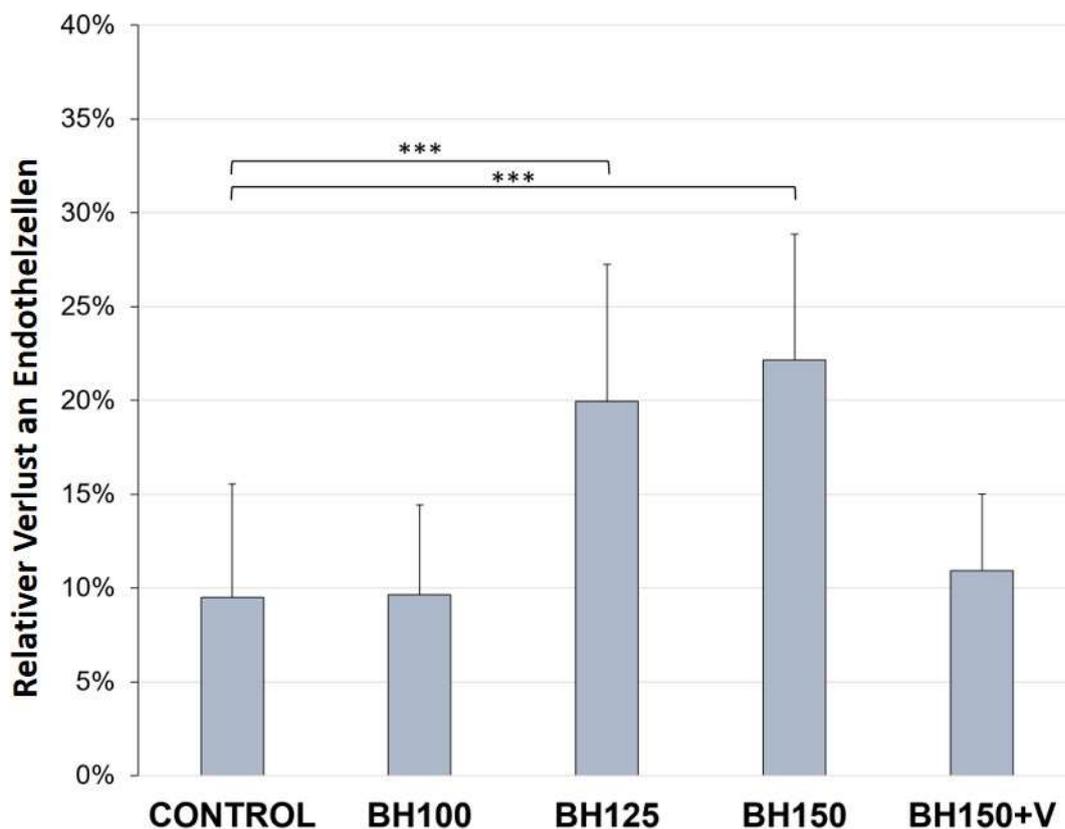


Abbildung 11 - Relativer Verlust an Endothelzellen

Das Balkendiagramm stellt den relativen Verlust an Endothelzellen für jede Versuchsgruppe dar. Hierbei wurde die Endothelzellzahl an Tag 15 mit der von Tag 1 verglichen und so der relative Verlust für jede Gruppe berechnet. Der relative Verlust an Endothelzellen ist dargestellt als Mittelwert \pm die Standardabweichung. (***) $p < 0,001$)

Da die Betrachtung der absoluten EZZ daher ggf. zu falschen Rückschlüssen geführt hätte, wurde im Weiteren nur der prozentuale EZZ-Verlust von Tag 15 im Vergleich zu Tag 1 (relativer Verlust an EZ) berechnet und ausgewertet.

Jede Gruppe für sich alleine zeigte einen signifikanten Verlust an EZ während der 15 tägigen Kultivierung ($p < 0,05$).

3.2 Relativer Verlust an Endothelzellen

Der relative Abfall der EZZ war in den Gruppen BH100 und BH150+V vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe (siehe Abb. 11). Einen signifikant größeren relativen Verlust an EZ zeigten jedoch die Gruppen BH125 und BH150 ($p < 0,001$) (siehe Abb. 11). Im Detail, nahm der relative Verlust an EZ von $9,69\% \pm 6,03$ in der Kontrollgruppe auf $19,44\% \pm 7,30$ bzw. $21,99\% \pm 6,70$ in der BH125 bzw. BH150 Gruppe zu. Die Zugabe von Viscoelasticum vor dem Beginn der Spülversuche hingegen konnte die schädigende Wirkung des höheren hydrostatischen Druckes der Infusionslösung verhindern und den relativen Verlust von EZ von $21,99 \pm 6,70$ auf $10,92 \pm 4,09$ reduzieren (siehe Abb. 11).

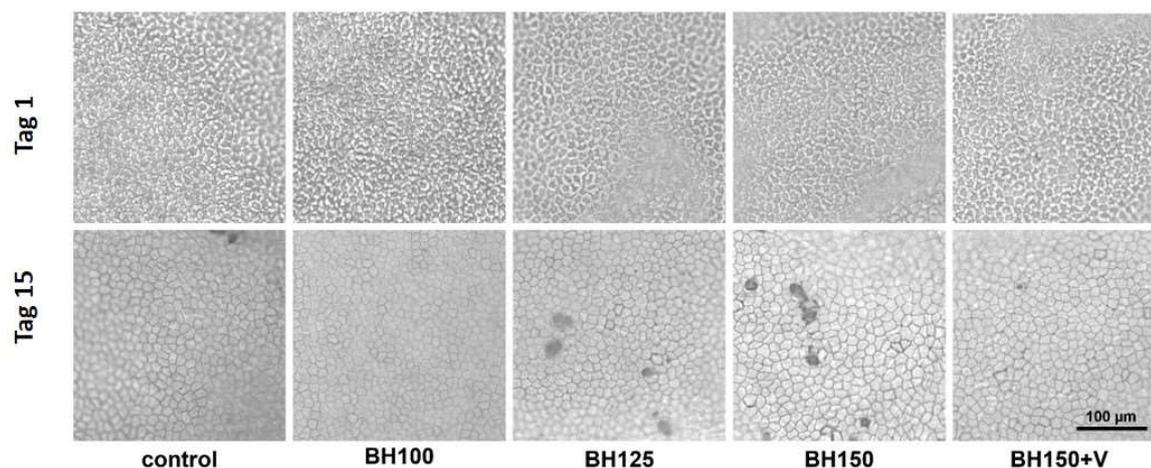


Abbildung 12 - Repräsentative Bilder des Endothelrasens an Tag 1 und Tag 15

Die Endothelzellen wurden an Tag 1 und Tag 15 fotografiert. Die Fotos an Tag 1 sind an ungefärbten split corneal buttons und an Tag 15 an gefärbten Präparaten (Doppelfärbung mit Alizarinrot und Trypanblau) durchgeführt worden. Bei den Gruppen BH125 und BH150 sind an Tag 15 sind Alizarinrote Areale sichtbar, die wegen der Schwarz-Weiß Fotografie grau erscheinen.

3.3 Morphologie des Endothels

Der Endothelrasen war bei allen Gruppen sowohl an Tag 1 als auch an Tag 15 erhalten (siehe Abb. 12). An Tag 15 scheinen jedoch die EZ in der Gruppe BH125 und BH150 größer zu sein (siehe Abb. 12). Die Auswertung der morphologischen Kriterien (Rosettenformationen, Reformationsfiguren, Alizarinrote Areale) hat keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigen können. Aus Übersichtsgründen und wegen der fehlenden Konsequenzen wurden die Daten deshalb nicht dargestellt.

4 Diskussion:

4.1 Auswertbarkeit der Daten

4.1.1 Stabile Ausgangsbedingungen

Alle Gruppen zeigten an Tag 1 der Auswertung einen durchgehend erhaltenen Endothelrasen (repräsentative Ausschnitte siehe Abb. 12). Die Kontrollgruppe, sowie die Gruppen ohne einen signifikanten prozentualen Verlust an EZ im Vergleich zur Kontrolle (BH100, BH150+V) zeigten einen Verlust von ca. 10% EZ innerhalb der 2 Wochen Kultivierungsdauer. Dieser Wert ist vergleichbar mit bereits publizierten Daten, die ebenfalls mit „split corneal buttons“ gearbeitet haben und denen von kultivierten menschlichen Hornhäuten. Allgemein wird ein EZ-Verlust von um die 10% während

Studie	Mensch/Schwein	Zellverlust/ 2 Woche
Pels & Schuchard (1983)	Mensch	-10,0%
Borderie et al. (1995)	Mensch	-9,4%
Linke et al. (2013)	Mensch	-11,4%
Kunzmann et al. (2018)	Schwein („split corneal buttons“)	-10,2%
Kunzmann et al. (2020)	Schwein („split corneal buttons“)	-10,2%
Wenzel et al. (2019)	Schwein („split corneal buttons“)	-9,4%
Wenzel et al. (2019)	Schwein („split corneal buttons“)	-9,8%
diese Arbeit	Schwein („split corneal buttons“)	-9,7%

Tabelle 6 – Prozentualer Endothelzellverlust

Verglichen werden Studien mit kultivierten menschlichen Hornhäuten und kultivierten Schweinehornhäuten, die keinerlei Behandlung unterzogen waren. Teilweise sind die Daten unter der Annahme eines linearen Verlustes auf 2 Wochen hochgerechnet worden.

einer 2-wöchigen Kultivierung als normal angesehen (siehe Tabelle 6)(Kunzmann et al. 2018; Kunzmann et al. 2020; Wenzel, Kunzmann, Steinhorst, et al. 2019; Wenzel, Kunzmann, Druchkiv, et al. 2019; Pels and Schuchard 1983; Borderie et al. 1995; Linke et al. 2013). Es bestanden somit stabile Ausgangsbedingungen für die Versuchsreihe.

4.1.2 Einfluss der Färbung auf die Quantifizierung der Endothelzellichte

Die Kombination von ungefärbten (Tag 1) und gefärbten (Tag 15) „split corneal buttons“ zur Ermittlung der EZZ erfolgte, da in einer vorherigen Publikation gezeigt werden konnte, dass bei gefärbten und nicht gefärbten „split corneal buttons“ eine nicht signifikant unterschiedliche EZZ erzielt wurde(Wenzel, Kunzmann, Spitzer, et al. 2019). Die Auszählung ungefärbter Zellen ist daher im Vergleich zu Auszählung gefärbter Zellen nicht ungenauer und führt ebenso zu einer validen Beurteilung der EZZ. Für die Bewertung morphologischer Kriterien wie zum Beispiel von Reformationsfiguren, Rosettenformationen oder Alizarin-roten Arealen sind deren Quantifizierung ohne eine Färbung nicht möglich. Deshalb wurden die Präparate bei der Auszählung an Tag 15 vor der fotografischen Dokumentation angefärbt.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

Eine Reduktion des iatrogen induzierten Operationstraumas ist generell erstrebenswert. Insbesondere jedoch bei sehr harten Linsen, die eine längere Operationszeit und mehr Applikation von Ultraschallenergie erforderlich machen, und bei Patienten mit bereits präoperativ reduzierter EZZ sollte der Verlust an EZ so gering wie möglich gehalten werden um eine Hornhauttransplantation nicht zu provozieren. Bisher gibt es keine veröffentlichten Daten, die den hydrostatischen Druck in der Infusionslösung als alleinige Variable bei der Katarakt-OP auf die Abnahme der EZZ untersucht haben.

Die Ergebnisse zeigen, dass ab einer Infusionsflaschenhöhe von 125 cm und ohne Verwendung von Viscoelasticum die EZZ im Verlauf der Kultivierungsphase über 2 Wochen im Vergleich zur Kontrolle signifikant abnimmt ($p < 0,001$). Da die prozentuale Abnahme der EZZ bei 100 cm keinen signifikanten Abfall im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass bei einer Katarakt-Operation eine Infusionsflaschenhöhe von ≤ 100 cm auch bei längerer Operationsdauer zu kei-

nem perfusionsbedingten EZZ-Verlust führt. Zwischen 100 cm und 125 cm scheint jedoch die Grenze zu liegen, bei der es zu einem perfusionsbedingten Verlust an Endothelzellen kommen kann. Diese Werte sind allerdings nur bei einer Katarakt-OP ohne Viscoelasticum zu berücksichtigen, da es bei initialer Viscoelasticum-Gabe auch bei 150 cm zu keinem signifikanten EZZ-Verlust nach 15 Tagen im Vergleich zu Kontrollgruppe gekommen ist. Als ursächliche Mechanismen für den EZZ-Verlust ab 125 cm Infusionsflaschenhöhe kommen ein erhöhter intraokularer Druck, gesteigerte intraokulare Turbulenzen und die Dauer der Vorderkammerspülung in Frage.

4.2.1 Intraokularer Druck als Risikofaktor für Endothelverlust

Zur besseren Einordnung ob der EZZ-Verlust bei BH125 und BH150 durch den erhöhten intraokularen Druck bedingt sein könnte, stellt sich die Frage, ob es bei Glaukomen zu einem EZZ-Verlust kommt oder nicht. In der Literatur gibt es teilweise widersprüchliche Daten darüber ob bei den unterschiedlichen Glaukomarten die EZZ reduziert ist oder nicht.(Verma et al. 2018; Cho et al. 2009; Gagnon et al. 1997; Lee et al. 2015; Varadaraj et al. 2017; Tham et al. 2006) Je nach betrachteter Studien werden unterschiedliche signifikante oder nicht signifikante Ergebnisse gesehen.(Verma et al. 2018; Cho et al. 2009; Gagnon et al. 1997; Lee et al. 2015) Es wird vermutet, dass möglicherweise ein Verlust an Hornhautendothelzellen durch langfristig deutlich erhöhte Augeninnendrucksteigerungen, durch Laseroperationen oder durch die Applikation lokaler Antiglaukomatosa bedingt sein könnte. Wegen dieser widersprüchlichen Datenlage ist es deshalb unklar, ob eine kurzfristige Augeninnendrucksteigerungen während einer Katarakt-OP zu einer Reduktion der EZZ führen kann.(Verma et al. 2018; Cho et al. 2009; Gagnon et al. 1997; Lee et al. 2015; Varadaraj et al. 2017; Tham et al. 2006) In einem Tierversuch mit Ratten konnte jedoch nach einer Erhöhung des Augeninnendruckes auf 83 mmHg für 2 Stunden eine Abnahme der EZZ von ca. 9% beobachtet werden.(Li et al. 2017) In unseren Versuchen wurde der intraokulare Augendruck durch die 10 Sekunden dauernde Aspiration immer wieder gesenkt. Zudem kommt es im Bereich der Inzisionen immer zu einem gewissen Verlust an Spülflüssigkeit, was ebenfalls den Augeninnendruck reduziert. Da es bei einem höheren Vakuum als 200 mmHg zu einem Verlust der Vorderkammerstabilität bei einer Infusionsflaschenhöhe von 105 cm gekommen war(Kunzmann et al. 2020), ist davon auszugehen, dass bei 100 cm Infusi-

onsflaschenhöhe ein normotones Auge bestand (ca. 14 mmHg). Während einer eingeschalteten Aspiration und einer Infusionsflaschenhöhe von 150 cm stieg der Augeninnendruck auf ca. 50 mmHg ($50 \text{ cm H}_2\text{O} = 36,8 \text{ mmHg} + 14 \text{ mmHg}$). Ohne eine eingeschaltete Aspiration jedoch betrug der intraokulare Augendruck sicherlich ca. 100 mmHg ($150 \text{ cm H}_2\text{O} = 110,3 \text{ mmHg}$). Somit betrug der intraokulare Augeninnendruck in 10 Sekunden-Intervallen schätzungsweise 50 mmHg bzw. 100 mmHg bei den Gruppen BH150 und BH150+V für insgesamt 10 Minuten. Dies stellt eine viel geringere Zeitspanne dar als bei den bereits erwähnten Versuchen an Ratten (83 mmHg für 2 Stunden)(Li et al. 2017) sowie bei einem Glaukomanfall, wo die Augeninnendrucksteigerung mit ca. 100 mmHg durchaus noch stärker ausgeprägt ist. Wegen der sehr guten protektiven Wirkung des Viscoelasticums ist aber davon auszugehen, dass der beobachtete EZ-Verlust nicht direkt auf den erhöhten Augeninnendruck zurückzuführen ist. Im Vergleich zur Spüllösung ist das Viscoelasticum deutlich visköser. Dies bedingt, dass der Verlust an Spüllösung im Bereich der Inzisionen bei der Gruppe BH150+V eher geringer gewesen sein muss als bei der Gruppe BH150. Deshalb ist davon auszugehen, dass bei der Gruppe BH150+V tendenziell sogar eher ein geringfügig höherer Augeninnendruck bestanden haben muss als bei der Gruppe BH150. Somit ist die Ursache für den EZZ-Verlust eher bei den erhöhten Flussgeschwindigkeiten bzw. Turbulenzen in Folge des gesteigerten hydrostatischen Druckes und nicht beim erhöhten intraokularen Druck zu suchen.

4.2.2 Fließgeschwindigkeit und Turbulenzen als Risikofaktor für Endothelverlust

Bei der Einordnung der Fließgeschwindigkeit und Turbulenzen als Mechanismen für den beobachteten EZZ-Verlust bei den Gruppen BH125 und BH150 ist es wichtig zu berücksichtigen, dass andere Ursachen bei unserem Modell ausgeschlossen werden können. Hierdurch ermöglicht unser Modell das Schädigungspotential von intraokularen Turbulenzen durch die applizierte Infusionslösung getrennt von anderen Faktoren zu betrachten. In klinischen Studien kann zwar die Höhe der Infusionsflasche oder das Ausmaß der Vorderkammerspülung durch unterschiedliche Fluidik-Parameter variiert werden, die restlichen möglicherweise pathophysiologisch bedeutenden Mechanismen und Variablen (unterschiedliche Dauer und Menge an Ultraschallallergie, ein unter-

schiedlicher und nicht konstanter Abstand der Phakonadel zum Hornhautendothel, unterschiedlich stark ausgeprägte Linsentrübungen, herumschwirrende Linsenfragmente, unterschiedliches Alter der Patienten, unterschiedliche EZZ, eine schwankende operative Performance des Operateurs) existieren aber weiterhin und können daher die Ergebnisse beeinflussen. Zudem muss berücksichtigt werden, dass in klinischen Studien meistens harte Linsen exkludiert werden, da diese nur sehr schlecht standardisierbar sind. Dies hat zur Folge, dass der EZZ-Verlust meistens – wie im Folgenden dargestellt - nur sehr gering ist und die Standardabweichung fast immer deutlich größer, teilweise 3x so groß ist wie der EZZ-Verlust. Dies macht die Beobachtung signifikanter Effekte statistisch fast unmöglich. Allein deshalb sind klinische Untersuchung von Einzelfaktoren bei der Katarakt-OP eher ungeeignet. Auf der anderen Seite spiegeln die klinischen Studien die Realität im Patienten wieder. Da dieses Thema jedoch bisher fast ausschließlich in klinischen Studien untersucht worden ist, möchte ich die relevanten klinischen Studien zu diesem Thema kurz skizzieren und diskutieren.

In einer numerischen Strömungssimulation konnte gezeigt werden, dass höhere Flussraten während einer Katarakt-OP zu stärkeren Turbulenzen führen, die ihrerseits ggf. einen schädigenden Effekt auf die Hornhautendothelzellen haben können (Abouali et al. 2011). In den bisherigen klinischen Studien konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass höhere intraokulare Turbulenzen zu einem gesteigerten EZZ-Verlust führen. In einer prospektiv, randomisierten, doppelt verblindeten Studie wurde der Effekt von niedrigen (Aspirations-Fluss-Rate 25 cc/min; Infusionsflaschenhöhe 70 cm und 90 cm; Vakuum \leq 400mmHg) und hohen (Aspirations-Fluss-Rate 40 cc/min; Infusionsflaschenhöhe 90 cm und 100 cm; Vakuum \leq 650mmHg) Fluidik-Parametern untersucht. In Bezug auf die EZZ (niedrige Gruppe: -4.67 ± 0.15 % vs. hohe Gruppe: -5.22 ± 2.84 % ($p = 0.45$)) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (Vasavada et al. 2010). Lediglich indirekte Parameter wie der postoperative Tyndall-Effekt, der Zellreiz in der Vorderkammer und die Klarheit der Hornhaut waren direkt nach der Operation in der Gruppe mit den niedrigen Fluidik-Parametern signifikant besser (Vasavada et al. 2010). Übereinstimmend mit dieser Studie zeigte ebenfalls eine klinische Studie aus 2009 keinen signifikanten Effekt auf die EZZ nach einer Katarakt-OP mit niedrigen (Vakuum 200 mmHg, Fluss-Rate 20 cc/min) und hohen Fluidik-Parametern (Vakuum 400 mmHg, flow rate 40 cc/min) (Baradaran-Rafii et

al. 2009). Die Höhe der Infusionsflasche war bei 100cm festgelegt worden(Baradaran-Rafii et al. 2009). In einer weiteren klinischen Studie, bei der jedoch neben der Variation der Fluidik-Parameter (niedrig (Flussrate: 20 cc/min; Infusionsflaschenhöhe: 70 cm; Vakuum 400 mmHg); hoch (Flussrate: 35 cc/min; Infusionsflaschenhöhe: 70 cm; Vakuum 500 mmHg)) zudem auch unterschiedliche Phako-Tips verwendet worden sind, konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den Bezug auf die EZZ zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden (niedrige Gruppe: 4.92 ± 10.94 % vs. hohe Gruppe: 6.26 ± 15.48 %; $p = 0.696$)(Schriebl, Stifter, and Menapace 2014). Durch die Verwendung unterschiedlicher Phako-Tips müssen sich aber auch unterschiedliche Turbulenzen im Auge ausgebildet haben. Dies reduziert die Aussagekraft dieser Studie. Suzuki et al variierte in einer klinischen Studie die Infusionsflaschenhöhe bei einer Katarakt-OP zwischen 30 und 60 cm. Diese Studie konnte einen signifikant größeren EZZ-Verlust in der Gruppe von 60 cm Infusionsflaschenhöhe zu allen postoperativen Zeitpunkten nachweisen.(Suzuki et al. 2009) Diese Studie muss aber aufgrund der gleichzeitig durchgeführten Katarakt-OP kritisch beurteilt werden. Des Weiteren war die Infusionshöhe mit maximal 60 cm bereits relativ niedrig gewählt und die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Daten meiner Doktorarbeit, den bereits publizierten Daten aus der Forschungsgruppe von Prof. Spitzer sowie den restlichen Studien zu diesem Thema. (Kunzmann et al. 2020) Alle hier dargestellten Studien haben vor Beginn der Phakoemulsifikation Viscoelastica in das Auge hineingegeben und die Infusionsflaschenhöhe betrug maximal 110 cm. Deshalb sind die negativen Ergebnisse der klinischen Studien im Einklang mit unseren Ergebnissen zu sehen. Unglücklicherweise gibt aber keine der Studien die durchschnittliche Irrigationsdauer an, was die Vergleichbarkeit mit unseren Daten einschränkt.

Neben der Infusionsflaschenhöhe könnte die Infusionsdauer ebenfalls einen schädigenden Einfluss auf die EZZ haben. Diese Fragestellung wurde in einer kürzlich veröffentlichten Tier-Studie (Kaninchen) durch Ungricht et al. untersucht. Hierbei wurde bei einer fixierten Durchflussrate (50ml pro Minute) unterschiedliche Volumina (250ml und 500ml) durch die vordere Augenkammer des Auges gespült(Ungricht et al. 2021). Es konnte kein signifikant unterschiedlicher EZZ-Verlust zwischen den Gruppen sowie der Kontrollgruppe nachgewiesen werden(Ungricht et al. 2021). Folglich schlussfolgern die Autoren, dass die alleinige Dauer der Infusion keinen Einfluss auf den EZZ-Verlust zu haben scheint(Ungricht et al. 2021). Anzumerken ist jedoch, dass die Augen

direkt nach der Irrigation enukleiert und analysiert worden sind, wodurch keine Aussagen bezüglich langsamer, apoptotischer Zelluntergänge getroffen werden können. Zudem bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen und den Kontrollaugen. Dies bedeutet, dass die gewählten Fluidik-Parameter in keiner Gruppe irgendeinen Schaden verursacht haben, weshalb durch diese Studie auch keine Aussage über die Auswirkungen der Dauer der Vorderkammerspülung auf die EZZ getätigt werden kann. Nur wenn die 250ml Gruppe die EZZ signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert hätte und das gleiche Schädigungsausmaß bei der Gruppe mit 500ml ebenfalls beobachtet worden wäre, hätte dieser Rückschluss getätigt werden dürfen. Deshalb ist es derzeit unklar, ob die Dauer der Vorderkammerspülung einen Effekt auf den EZZ-Verlust hat.

4.2.3 Schwachpunkte der Doktorarbeit

Für die in-vitro Versuche wurden porkine und nicht humane Hornhäute verwendet. Dies schränkt die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse in die klinische Situation ein. Zudem handelt es sich um in-vitro und nicht um in-vivo Versuche. Als weiteren Schwachpunkt in unserer Analyse war eine EZZ-Bestimmung erst nach Durchführung der simulierten Katarakt-OP bzw. Vorderkammerspülung möglich. Wegen des erhaltenen Zellrasens in allen Präparaten an Tag 1 gehen wir jedoch nicht davon aus, dass die EZZ prä- und postoperativ signifikant unterschiedlich gewesen ist – ansonsten hätten Areale ohne Endothelzellen bestehen müssen. Als weiterer wichtiger Unterschied zwischen unseren Versuchsbedingungen und denen in einer klinischen Situation ist in dem eher niedrigen Aspirationsdruck mit 200 mmHg zu sehen. Wie oben dargestellt, liegt dieses Vakuum eher am unteren Rand des klinisch verwendeten Vakuums. Ein höheres Vakuum konnte jedoch nicht verwendet werden, da dies zu einer Instabilität der Vorderkammer bei einer Infusionsflaschenhöhe von 105cm geführt hätte (Kunzmann et al. 2020). Da die Turbulenzen bei höherem Vakuum auf Grund des gesteigerten Durchflusses zunehmen würden, wäre eine derartige Untersuchung – ggf. mit einer anderen Operationsmaschine von großem Interesse.

Erstaunlicherweise konnten keine signifikanten Veränderungen bei der Veränderung der Morphologie beobachtet werden. Dies ist ggf. dadurch begründet, dass der prozentuale Verlust an Endothelzellen zu gering war um diesen auch in einer Verände-

rung der Morphologie beobachten zu können. Dennoch wäre es wünschenswert gewesen, die beobachteten Unterschiede in der EZZ ebenfalls in der Analyse der Morphologie zumindest teilweise zu bestätigen.

4.2.4 Konsequenzen für die klinische Anwendung

Ein signifikanter Verlust an EZ konnte in dieser Arbeit erst ab einer Perfusionshöhe von 125 cm bei einer insgesamten Applikationsdauer von 5 Minuten beobachtet werden. Bei der Übertragung der Ergebnisse auf die klinische Situation ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Spülung des Auges ausschließlich mit einem Phako-Tip durchgeführt wurde und der Phako-Tip stets mittig in der Pupillarebene gehalten wurde um einen möglichst gut standardisierten Effekt zu erzielen. In der klinischen Situation wäre jedoch der Phako-Tip im Auge in Bewegung und der Abstand zu der Hornhaut würde variieren. Zudem wurde ein coaxiales Irrigations-/Aspirations-Set verwendet, bei dem sowohl die Irrigation als auch die Aspiration in einem Handstück vereinigt sind. Es gibt jedoch auch bimanuelle Irrigations-/Aspirations-Sets, die sich sowohl von den Volumina als auch den intraokularen Strömungsverhältnissen sicherlich von dem verwendeten Instrumentarium unterscheiden werden. Als weiteren Unterschied werden im Alltag auch unterschiedlich große Phakonadeln mit entsprechend angepassten Phako-Sleeves benutzt. Desto größer der Innendurchmesser der verwendeten Phakonadeln ist, desto größere Flüssigkeitsvolumina werden intraoperativ aspiriert und desto größer werden auch die insgesamt durch das Auge gespülten Flüssigkeitsvolumina sein. Es ist bekannt, dass sich die in-vivo beobachteten Turbulenzen während des Irrigations-Aspirationsprozesses je nach verwendetem Operationsbesteck unterscheiden (Abouali et al. 2011). Typischerweise werden von den Herstellern nur die notwendigen Inzisionsbreiten angegeben und nicht die exakten Innendurchmesser der Phako-Nadeln. Gängige Inzisionsbreiten variieren jedoch durchaus zwischen 1,8 mm und 2,75 mm. In diesem Versuchsaufbau wurde ein Standard-Phako-Tip verwendet, der eine Inzisionsbreite von 2,75mm benötigt und der sich auch heutzutage noch häufig im alltäglichen Gebrauch befindet. Die Größe des Phako-Tips war deshalb an der oberen Grenze gewählt.

Zudem ist darauf hinzuweisen, dass der Schaden nur nachgewiesen werden konnte, wenn vor der Durchführung der Perfusion kein Viscoelasticum gegeben wurde. Bei

einem normalen intraoperativen Vorgehen wird jedoch für die Anfertigung der Kapsulorhexis, also vor Beginn der Spülung des Auges, Viscoelasticum in die Vorderkammer gegeben.

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass die Ergebnisse nicht 1:1 in die Klinik und auf jedes Operationssetting übertragen werden können, obwohl es sich um ein sehr nah an der Klinik orientiertes in-vitro Modell der Katarakt-OP handelt. Dennoch sollte aufgrund unserer Ergebnisse in der klinischen Situation eine Infusionsflaschenhöhe von mehr als 100 cm über dem Augenniveau vermieden werden, da es ansonsten zu einer möglichen Hornhautendothelschädigung kommen könnte. Dies gilt insbesondere, wenn kein Viscoelasticum verwendet wird oder das Viscoelasticum bereits wegen einer langen OP-Dauer ggf. aus dem Auge ausgespült worden ist. Bei Verwendung von Viscoelasticum zu Beginn einer Katarakt-OP und einer OP-Dauer von unter 10 Minuten scheint jedoch kein EZZ-Verlust durch die Spülvorgänge einzutreten. Bei langer OP-Dauer sollte ggf. die endothelschützende Viscoelasticum-Schicht nach 5-10 Minuten Perfusionsdauer erneuert werden.

Insbesondere sehr erfahrene Operateure neigen teilweise zu sehr hohen Perfusionshöhen um mit einer stärkeren Aspiration während der Katarakt-OP arbeiten zu können und so Zeit zu sparen. Bei dieser Gruppe an Operateuren beträgt die Phakoemulsifikationsdauer meistens unter 5 Minuten, aber unglücklicherweise sind diese Operateure auch jene, die ohne jegliches Viscoelasticum die Katarakt-OP teilweise durchführen. Ein derartiges Vorgehen würden wir anhand der Ergebnisse nicht empfehlen.

Leider können wir mit unseren Ergebnissen keine Aussagen bezüglich der möglichen Auswirkungen auf das Hornhautendothel bei Verwendung einer Druckinfusion während einer Katarakt-OP tätigen. Da hierbei die Vorderkammer aber nochmals deutlich stabiler sein soll, als bei der passiven Perfusion (in Folge des hydrostatischen Gefälles zwischen Infusionsflasche und Auge), kann davon ausgegangen werden, dass die Flussgeschwindigkeiten mindestens so hoch sind wie bei der passiven Perfusion. Da bei der Druckinfusion im Vergleich zur passiven Infusion nur der verwendete intraokulare Druck aber wahrscheinlich nicht die Infusionsgeschwindigkeit niedriger ist, sind bei der Druckinfusion äquivalente Ergebnisse zu erwarten. Diese Schlussfolgerung kann gezogen werden, da offensichtlich der reine Augendruck keinen Einfluss auf den EZZ-Verlust hat, da die BH150+V Gruppe keinen erhöhten EZZ-Verlust im Vergleich zu den Kontrollen zeigte.

Auf der Basis der hier ermittelten Ergebnisse muss dazu geraten werden bei jeder Katarakt-OP Viscoelasticum zum Schutz des Endothels zu verwenden und unnötig hohe Flussgeschwindigkeiten der Spüllösungen intraoperativ zu vermeiden.

4.3 Analyse potentiell schädigenden Mechanismen der Katarakt-OP mittels Schweinehornhautkultur

Der durch eine Katarakt-OP induzierte EZZ-Verlust stellt für jeden Katarakt-Operateur ein zentrales Problem dar. Bei Patienten mit per se bereits präoperativ reduzierter EZZ, wie bei Patienten mit einer Cornea guttata oder auch bei Patienten mit sehr harter Linse und damit erhöhter Reduktion der EZZ durch die Katarakt-OP, ist dies nochmals von besonderer Bedeutung. Durch die Kultivierung von „split corneal buttons“ nach erfolgter, simulierter Katarakt-OP konnte erstmals ein ex-vivo Modell zur Evaluierung der Katarakt-OP mit postoperativer Langzeitbeobachtung etabliert werden (Kunzmann et al. 2020). Hierbei konnte durch eine simulierte Katarakt-OP sehr zuverlässig eine Reduktion der ECD von 32,5 % erzielt werden (Kunzmann et al. 2020). Die hierbei verwendete Flascheninfusionshöhe betrug 105 cm und die Aspiration wurde auf 200 mmHg festgesetzt. In diesem Etablierungspaper wurde bei der Perfusionsgruppe ohne Applikation von Ultraschallenergie gezeigt, dass es durch die reine Perfusion zu keinem gesteigerten EZZ-Verlust im Vergleich zur Kontrollgruppe gekommen war (Kunzmann et al. 2020). Die hierbei verwendeten Perfusionsparameter sollten daher nicht zu dem induzierten Verlust an EZ bei der Simulation der Katarakt-OP beigetragen haben.

Durch die Modifikation der simulierten Katarakt-OP und Betonung einzelner Teilschritte – wie in dieser Arbeit erfolgt – besteht somit erstmals die Möglichkeit einzelne potentiell schädigende Mechanismen detailliert zu untersuchen. Durch die lange Nachbeobachtungsdauer können auch langsame, apoptotische Prozesse abgewartet und in die Analyse mit einbezogen werden. Dies ist ein entscheidender Vorteil im Vergleich zu einem 2018 publizierten Katarakt-Simulationsmodell, das eine Nachbeobachtungszeit von nur 4 Stunden hat und somit nur nekrotische Prozesse in der Analyse berücksichtigen kann (Rouhbakhshzaeri et al. 2019). Hierbei wurde die Katarakt-OP ebenfalls an Schweineaugen simuliert (Rouhbakhshzaeri et al. 2019).

Eine weitere Möglichkeit für ein in-vitro-Modell bestünde in der Verwendung von Zellkulturen von humanen kornealen Endothelzellen. Hierbei kommt es jedoch zu einer

Endothel-Mesenchymalen Transition, die dazu führt, dass die Endothelzellen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie entwickeln und Eigenschaften wie die Polarisation verlieren (Roy et al. 2015). Zudem würden bei Zellkulturversuchen die korrekten anatomischen Verhältnisse nicht berücksichtigt werden können. Hierdurch wären die intraokularen Fluiditäten und die Energie-Applikation während der Phakoemulsifikation sehr artifiziell und würden nicht der in-vivo Situation entsprechen. Deshalb wäre eine Translation von Ergebnissen, die mit einer solchen Methode erhoben worden sind, in die klinische Situation meistens nur sehr bedingt möglich.

Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit wegen des Mangels sinnvoller in-vitro Modelle bei der Analyse der Katarakt-OP meistens Tierversuche durchgeführt oder klinische Daten ausgewertet. Der Endothelverlust ist aber bei den meisten Patienten so gering, dass ein signifikanter Unterschied meistens nicht detektiert werden kann bzw. die Standardabweichung in den Gruppen wegen der unterschiedlich harten Linsen im Vergleich zum induzierten Schaden sehr groß ist. Zudem spielen bei der Katarakt-OP immer mehrere potentiell schädigende Mechanismen zusammen, so dass die Analyse der Teilschritte in einer echten in-vivo Situation am Menschen fast unmöglich ist. Deshalb können durch das nun etablierte Katarakt-OP Simulationsmodell mit anschließender Kultivierung der „split corneal buttons“ erstmalig die einzelnen Teilschritte der Katarakt-OP unter standardisierten Bedingungen untersucht und analysiert werden.

5 Zusammenfassung

Bei der Katarakt-Operation wird die natürliche Linse durch eine Kunstlinse ersetzt. Hierbei kommt es iatrogen zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten Verlust an Hornhaut-Endothelzellen (EZ). Die EZ sorgen durch einen aktiven vom Stroma in Richtung intraokular gerichteten Wassertransport für die Klarheit der Hornhaut. Eine zu geringe Endothelzellzahl (EZZ) führt zu einer insuffizienten Pumpfunktion des Endothels und zum Aufquellen der Hornhaut – sie „dekompensiert“. Hierdurch können die in das Auge einfallenden Lichtstrahlen im Bereich der Makula nicht mehr gebündelt werden und dadurch sinkt die Auflösungsfähigkeit des Auges und steigt die Blendempfindlichkeit. Die postoperative Hornhautdekomensation nach einer Katarakt-Operation ist heutzutage einer der wichtigsten Gründe für die Durchführung einer Hornhauttransplantation und stellt somit ein sehr relevantes klinisches Problem dar.

Bisher ist es unklar, welche Einzelparameter der Katarakt-Operation in welchem Ausmaß zu einer Endothelschädigung führen. Bei der Katarakt-Operation wird die Form des Auges und damit auch die Form des vorderen Augenabschnitts kontinuierlich durch eine Infusion von Spüllösung aufrechterhalten. Hierfür wird die Infusionsflasche mit der Spüllösung in unterschiedlicher Höhe über dem Auge platziert, so dass die Spüllösung passiv in Folge des hydrostatischen Druckgefälles nachfließen kann. Die Infusionshöhe hat daher eine Auswirkung sowohl auf den intraokularen Augendruck als auch auf die Fließgeschwindigkeit der Spüllösung und die im Auge induzierten Turbulenzen. Alle Faktoren könnten prinzipiell zu einer EZ-Schädigung führen. Deshalb stellt der hydrostatische Druck der Spüllösung einen potentiellen Risikofaktor bei einer Katarakt-Operation dar.

In meiner Doktorarbeit habe ich deshalb den Effekt des hydrostatischen Irrigationsdruckes der Spüllösung auf einen möglichen EZZ-Verlust bei unterschiedlichen Spüllösungsinfusionshöhen (100cm, 125cm, 150cm) in einem standardisierten porcinen in-vitro Katarakt-Simulations-Modell untersucht (Gruppen: BH100, BH125, BH150). Zudem wurde bei einer weiteren Versuchsgruppe vor der Spülung des Auges mit einer Spüllösungsinfusionshöhe von 150 cm Viscoelasticum in die Vorderkammer eingegeben (Gruppe: BH150+V). Die Eingabe von Viscoelasticum zu Beginn der OP entspricht dem routinemäßigen Vorgehen beim Menschen. Die Spülung erfolgte für insgesamt 10 Minuten. Hierbei wurde in 10-Sekunden Intervallen eine Aspiration von 200 mmHg

appliziert. Als Kontrollen dienten nicht operierte Schweineaugen. Anschließend erfolgte mittels Lamellierung des Hornhautstromas die Präparation von sogenannten „split corneal buttons“. Diese wurden anschließend für 15 Tagen kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen entsprachen denen von humane Hornhaut vor einer Hornhauttransplantation. Eine Auszählung der EZZ erfolgte an Tag 1 und Tag 15.

Da an Tag 1 signifikant unterschiedliche EZZ zwischen den Gruppen bestanden wurde im weiteren Verlauf nur der relative EZZ-Verlust betrachtet. Dieser stellt den prozentualen Verlust an EZ im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 1 der jeweiligen Gruppe dar. Hierbei zeigte sich in den Gruppen BH100 und BH150+V ein vergleichbarer EZZ-Verlust wie bei der Kontrollgruppe. Einen signifikant größeren relativen Verlust an EZ zeigten jedoch die Gruppen BH125 und BH150 ($p < 0,001$) (Kontrollen: $9.69\% \pm 6.03$; BH125: $19,44\% \pm 7.30$; BH150: $21,99\% \pm 6.70$). Die Zugabe von Viscoelasticum vor dem Beginn der Spülversuche verhinderte aber den relativen Verlust an EZ bei einer Spüllösungsinfusionshöhe von 150cm (BH150: 21.99 ± 6.70 vs. BH150+V: 10.92 ± 4.09).

Aus den Ergebnissen kann man deshalb schlussfolgern, dass ab einer Infusionsflaschenhöhe von 125 cm bei porkinen Augen und in dem von uns verwendeten Katarakt-OP Simulations-Modell ein EZZ-Verlust durch die Spülung des Auges hervorgerufen wird. Da bei den Gruppen BH150 und BH150+V von einem intraoperativ vergleichbaren Augeninnendruck ausgegangen werden kann, scheint der alleinige Augeninnendruck keinen direkten Einfluss auf einen EZZ-Verlust bei der Katarakt-OP zu haben. Deshalb ist eher davon auszugehen, dass die gesteigerte Fließgeschwindigkeit bzw. die erhöhten Turbulenzen bei den Gruppen BH125 und BH150 zu den gesteigerten EZZ-Verlusten geführt haben.

Da in einer klinischen Situation normalerweise mit einer höheren Aspiration als 200mmHg gearbeitet wird und hierdurch indirekt auch die Turbulenzen und die Fließgeschwindigkeit gesteigert werden, sollte die Infusionsflaschenhöhe nach unseren Daten möglichst nicht über 100cm betragen.

Summary:

Cataract surgery results iatrogenically in corneal endothelial cell loss, which are necessary to maintain the clarity of the cornea. If the endothelial cell count drops to low,

the cornea swells and “decompensates”. In consequence, the vision is blurred and corneal transplantation is necessary to restore vision. Corneal decompensation is one of the most important reasons for corneal transplantation and therefore resembles a very relevant clinical problem.

Up to date it is unclear which parameter of the cataract surgery induces a damaging effect on the corneal endothelial cells. During cataract surgery the anterior chamber is maintained by a continuous infusion of irrigation solution. The infusion follows passively the hydrostatic pressure between the infusion bottle and the eye level. The height of the bottle influences the intraocular pressure and the intraocular fluidics including the induced turbulences. Those factors might induce corneal endothelial cell loss and resemble potential risk factors in cataract surgery.

In my doctoral theses, I investigated the effect of the hydrostatic pressure of the irrigation solution on the corneal endothelial cells. The height of the infusion bottle was varied (100cm, 125cm, 150cm) in a standardized porcine cataract-surgery model (groups: BH100, BH125, BH150). Additionally, a group at 150cm bottle height received an injection of viscoelasticum at the beginning of the surgery, which is also routinely performed in humans. Aspiration (200 mmHg) was turned on and switched off every 10 seconds during a total surgery time of 10 minutes. As controls served porcine eyes without surgery. “Split corneal buttons” were prepared and cultivated for 15 days under standard conditions. Endothelial cell count was performed on day 1 and day 15.

Due to significant differences in endothelial cell count on day 1, only the relative endothelial cells loss was further evaluated. In comparison to controls, the relative endothelial cells loss was only significantly increased in group BH125 and BH150 ($p < 0,001$) (controls: $9.69\% \pm 6.03$; BH125: $19,44\% \pm 7.30$; BH150: $21,99\% \pm 6.70$). The injection of viscoelasticum ameliorated the damaging effect at an infusion height of 150cm (BH150: 21.99 ± 6.70 ; BH150+V: 10.92 ± 4.09).

In conclusion, in our porcine cataract-surgery model endothelial cell loss was induced from an infusion height of 125cm onwards. The injection of viscoelasticum ameliorated this damaging effect at 150cm bottle height. Therefore, the elevated intraocular pressure seems not to be the only reason for this effect. Consequently, the enhanced intraocular turbulences and flow velocities at higher hydrostatic pressure might lead to the observed endothelial cells loss.

In daily routine the aspiration pressure is normally higher than 200 mmHg, which induces indirectly higher intraocular flow velocities and turbulences. Therefore, our results cannot be transferred to the clinics, but an infusion height of more than 100 cm should be avoided in cataract surgery.

6 Literaturverzeichnis

- Abouali, O., D. Bayatpour, A. Ghaffariyeh, and G. Ahmadi. 2011. 'Simulation of flow field during irrigation/aspiration in phacoemulsification using computational fluid dynamics', *J Cataract Refract Surg*, 37: 1530-8.
- Baradaran-Rafii, A., M. Rahmati-Kamel, M. Eslani, V. Kiavash, and F. Karimian. 2009. 'Effect of hydrodynamic parameters on corneal endothelial cell loss after phacoemulsification', *J Cataract Refract Surg*, 35: 732-7.
- Borderie, V. M., B. M. Kantelip, B. Y. Delbosc, M. T. Oppermann, and L. Laroche. 1995. 'Morphology, histology, and ultrastructure of human C31 organ-cultured corneas', *Cornea*, 14: 300-10.
- Bourne, W. M., L. R. Nelson, and D. O. Hodge. 1997. 'Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38: 779-82.
- Cho, S. W., J. M. Kim, C. Y. Choi, and K. H. Park. 2009. 'Changes in corneal endothelial cell density in patients with normal-tension glaucoma', *Jpn J Ophthalmol*, 53: 569-73.
- DelMonte, D. W., and T. Kim. 2011. 'Anatomy and physiology of the cornea', *J Cataract Refract Surg*, 37: 588-98.
- Dick, H. B., T. Kohnen, F. K. Jacobi, and K. W. Jacobi. 1996. 'Long-term endothelial cell loss following phacoemulsification through a temporal clear corneal incision', *J Cataract Refract Surg*, 22: 63-71.
- Doughty, M. J., and M. L. Zaman. 2000. 'Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach', *Surv Ophthalmol*, 44: 367-408.
- Dua, H. S., L. A. Faraj, D. G. Said, T. Gray, and J. Lowe. 2013. 'Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer)', *Ophthalmology*, 120: 1778-85.
- Edelhauser, H. F. 2006. 'The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47: 1754-67.
- Elsheikh, A., D. Alhasso, and P. Rama. 2008. 'Biomechanical properties of human and porcine corneas', *Exp Eye Res*, 86: 783-90.
- Filev, F., O. J. C. Hellwinkel, M. T. Eddy, S. J. Linke, and B. Wulff. 2018. 'Endothelial Cell Count in Eye Bank Corneal Grafts: Impact of Death Cause and Donor Diseases', *Semin Ophthalmol*, 33: 338-44.

- Fischbarg, J., and D. M. Maurice. 2004. 'An update on corneal hydration control', *Exp Eye Res*, 78: 537-41.
- Gagnon, M. M., H. M. Boisjoly, I. Brunette, M. Charest, and M. Amyot. 1997. 'Corneal endothelial cell density in glaucoma', *Cornea*, 16: 314-8.
- Geroski, D. H., and H. F. Edelhauser. 1984. 'Quantitation of Na/K ATPase pump sites in the rabbit corneal endothelium', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25: 1056-60.
- Gogate, P., P. Ambardekar, S. Kulkarni, R. Deshpande, S. Joshi, and M. Deshpande. 2010. 'Comparison of endothelial cell loss after cataract surgery: phacoemulsification versus manual small-incision cataract surgery: six-week results of a randomized control trial', *J Cataract Refract Surg*, 36: 247-53.
- He, Z., F. Forest, P. Gain, D. Rageade, A. Bernard, S. Acquart, M. Peoc'h, D. M. Defoe, and G. Thuret. 2016. '3D map of the human corneal endothelial cell', *Sci Rep*, 6: 29047.
- Hollingsworth, J., I. Perez-Gomez, H. A. Mutalib, and N. Efron. 2001. 'A population study of the normal cornea using an in vivo, slit-scanning confocal microscope', *Optom Vis Sci*, 78: 706-11.
- Hos, D., M. Matthaei, F. Bock, K. Maruyama, M. Notara, T. Clahsen, Y. Hou, V. N. H. Le, A. C. Salabarría, J. Horstmann, B. O. Bachmann, and C. Cursiefen. 2019. 'Immune reactions after modern lamellar (DALK, DSAEK, DMEK) versus conventional penetrating corneal transplantation', *Prog Retin Eye Res*, 73: 100768.
- Jay, L., A. Brocas, K. Singh, J. C. Kieffer, I. Brunette, and T. Ozaki. 2008. 'Determination of porcine corneal layers with high spatial resolution by simultaneous second and third harmonic generation microscopy', *Opt Express*, 16: 16284-93.
- Jeang, L. J., C. E. Margo, and E. M. Espana. 2021. 'Diseases of the corneal endothelium', *Exp Eye Res*, 205: 108495.
- Joyce, N. C. 2003. 'Proliferative capacity of the corneal endothelium', *Prog Retin Eye Res*, 22: 359-89.
- Joyce, N. C., S. E. Navon, S. Roy, and J. D. Zieske. 1996. 'Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium in situ', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37: 1566-75.
- Kim, M. K., and H. Hara. 2015. 'Current status of corneal xenotransplantation', *Int J Surg*, 23: 255-60.

- Krohn, J., and G. Hovding. 2005. 'The influence of donor age and cause of death on corneal endothelial cell density', *Acta Ophthalmol Scand*, 83: 746-50.
- Kunzmann, B. C., O. J. C. Hellwinkel, C. Klameth, D. Wenzel, K. U. Bartz-Schmidt, M. S. Spitzer, and M. Schultheiss. 2018. 'Establishment of a porcine corneal endothelial organ culture model for research purposes', *Cell Tissue Bank*, 19: 269-76.
- Kunzmann, B. C., D. A. Wenzel, K. U. Bartz-Schmidt, M. S. Spitzer, and M. Schultheiss. 2020. 'Effects of ultrasound energy on the porcine corneal endothelium - Establishment of a phacoemulsification damage model', *Acta Ophthalmol*, 98: e155-e60.
- Lee, J. W., R. L. Wong, J. C. Chan, I. Y. Wong, and J. S. Lai. 2015. 'Differences in corneal parameters between normal tension glaucoma and primary open-angle glaucoma', *Int Ophthalmol*, 35: 67-72.
- Lee, S. E., R. Mehra, M. Fujita, D. S. Roh, C. Long, W. Lee, J. L. Funderburgh, D. L. Ayares, D. K. Cooper, and H. Hara. 2014. 'Characterization of porcine corneal endothelium for xenotransplantation', *Semin Ophthalmol*, 29: 127-35.
- Li, X., Z. Zhang, L. Ye, J. Meng, Z. Zhao, Z. Liu, and J. Hu. 2017. 'Acute ocular hypertension disrupts barrier integrity and pump function in rat corneal endothelial cells', *Sci Rep*, 7: 6951.
- Linke, S. J., M. T. Eddy, J. Bednarz, O. H. Fricke, B. Wulff, A. S. Schröder, A. Hassenstein, M. Klemm, K. Püschel, G. Richard, and O. J. Hellwinkel. 2013. 'Thirty years of cornea cultivation: long-term experience in a single eye bank', *Acta Ophthalmol*, 91: 571-8.
- Matthaei, M., H. Sandhaeger, M. Hermel, W. Adler, A. S. Jun, C. Cursiefen, and L. M. Heindl. 2017. 'Changing Indications in Penetrating Keratoplasty: A Systematic Review of 34 Years of Global Reporting', *Transplantation*, 101: 1387-99.
- Matthaei, M., S. Schrittenlocher, D. Hos, S. Siebelmann, F. Bucher, F. Schaub, R. Hoerster, R. Siggel, S. Roters, L. M. Heindl, B. Bachmann, and C. Cursiefen. 2019. '[10 years of Descemet membrane endothelial keratoplasty in Fuchs endothelial corneal dystrophy : What have we learned?]', *Ophthalmologe*, 116: 236-42.
- Menduni, F., L. N. Davies, D. Madrid-Costa, A. Fratini, and J. S. Wolffsohn. 2018. 'Characterisation of the porcine eyeball as an in-vitro model for dry eye', *Cont Lens Anterior Eye*, 41: 13-17.

- Mergler, S., and U. Pleyer. 2007. 'The human corneal endothelium: new insights into electrophysiology and ion channels', *Prog Retin Eye Res*, 26: 359-78.
- Pels, E., and Y. Schuchard. 1983. 'Organ-culture preservation of human corneas', *Doc Ophthalmol*, 56: 147-53.
- Rouhbakhshzaeri, M., B. Rabiee, N. Azar, E. Ghahari, I. Putra, M. Eslani, and A. R. Djalilian. 2019. 'New ex vivo model of corneal endothelial phacoemulsification injury and rescue therapy with mesenchymal stromal cell secretome', *J Cataract Refract Surg*, 45: 361-66.
- Roy, O., V. B. Leclerc, J. M. Bourget, M. Theriault, and S. Proulx. 2015. 'Understanding the process of corneal endothelial morphological change in vitro', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56: 1228-37.
- Sanchez, I., R. Martin, F. Ussa, and I. Fernandez-Bueno. 2011. 'The parameters of the porcine eyeball', *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 249: 475-82.
- Schriefl, S. M., E. Stifter, and R. Menapace. 2014. 'Impact of low versus high fluidic settings on the efficacy and safety of phacoemulsification', *Acta Ophthalmol*, 92: e454-7.
- Schroeter, J., P. Maier, J. Bednarz, K. Bluthner, M. Quenzel, A. Pruss, and T. Reinhard. 2009. '[Procedural guidelines. Good tissue practice for cornea banks]', *Ophthalmologe*, 106: 265-74, 76.
- Schroeter, J., and P. Rieck. 2009. 'Endothelial evaluation in the cornea bank', *Dev Ophthalmol*, 43: 47-62.
- Shimazaki, J., S. Amano, T. Uno, N. Maeda, N. Yokoi, and Group Japan Bullous Keratopathy Study. 2007. 'National survey on bullous keratopathy in Japan', *Cornea*, 26: 274-8.
- Suzuki, H., K. Oki, T. Shiwa, H. Oharazawa, and H. Takahashi. 2009. 'Effect of bottle height on the corneal endothelium during phacoemulsification', *J Cataract Refract Surg*, 35: 2014-7.
- Takahashi, H. 2016. 'Corneal Endothelium and Phacoemulsification', *Cornea*, 35 Suppl 1: S3-S7.
- Taylor, M. J., and C. J. Hunt. 1981. 'Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction', *Br J Ophthalmol*, 65: 815-9.

- Tham, C. C., Y. Y. Kwong, J. S. Lai, and D. S. Lam. 2006. 'Effect of a previous acute angle closure attack on the corneal endothelial cell density in chronic angle closure glaucoma patients', *J Glaucoma*, 15: 482-5.
- Ungricht, E. L., C. Culp, P. Qu, J. T. Harris, B. J. Brintz, N. Mamalis, R. J. Olson, and L. Werner. 2021. 'The effect of phacoemulsification fluid flow on the corneal endothelium: An experimental study in rabbit eyes', *J Cataract Refract Surg*.
- Varadaraj, V., S. Sengupta, K. Palaniswamy, K. Srinivasan, M. A. Kader, G. Raman, S. Reddy, P. Y. Ramulu, and R. Venkatesh. 2017. 'Evaluation of Angle Closure as a Risk Factor for Reduced Corneal Endothelial Cell Density', *J Glaucoma*, 26: 566-70.
- Vasavada, A. R., M. R. Praveen, V. A. Vasavada, V. A. Vasavada, S. M. Raj, P. K. Asnani, and V. S. Garg. 2010. 'Impact of high and low aspiration parameters on postoperative outcomes of phacoemulsification: randomized clinical trial', *J Cataract Refract Surg*, 36: 588-93.
- Verma, S., M. E. Nongpiur, R. Husain, T. T. Wong, P. Y. Boey, D. Quek, S. A. Perera, and T. Aung. 2018. 'Characteristics of the Corneal Endothelium Across the Primary Angle Closure Disease Spectrum', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 59: 4525-30.
- Walkow, T., N. Anders, and S. Klebe. 2000. 'Endothelial cell loss after phacoemulsification: relation to preoperative and intraoperative parameters', *J Cataract Refract Surg*, 26: 727-32.
- Wenzel, D. A., B. C. Kunzmann, V. Druchkiv, O. Hellwinkel, M. S. Spitzer, and M. Schultheiss. 2019. 'Effects of Perfluorobutylpentane (F4H5) on Corneal Endothelial Cells', *Curr Eye Res*, 44: 823-31.
- Wenzel, D. A., B. C. Kunzmann, M. S. Spitzer, and M. Schultheiss. 2019. 'Staining of endothelial cells does not change the result of cell density', *Cell Tissue Bank*, 20: 327-28.
- Wenzel, D. A., B. C. Kunzmann, N. A. Steinhorst, M. S. Spitzer, and M. Schultheiss. 2019. 'A Porcine Corneal Endothelial Organ Culture Model Using Split Corneal Buttons', *J Vis Exp*.
- Wolf, A. H., U. C. Welge-Lussen, S. Priglinger, D. Kook, M. Grueterich, K. Hartmann, A. Kampik, and A. S. Neubauer. 2009. 'Optimizing the deswelling process of organ-cultured corneas', *Cornea*, 28: 524-9.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

EZ	Endothelzellen
EZZ	Endothelzellzahl
EZD	Endothelzelldichte
BSS	Balanced Salt Solution
hBSS	hypotones BSS
BH	Flaschenhöhe

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Verwendete Substanzen

Seite 15

Tabelle 2 – Verwendete Instrumente und Verbrauchsmaterial

Seite 15

Tabelle 3 – Verwendete Geräte und Software

Seite 17

Tabelle 4 – Zusammensetzung des Kulturmediums an Tag 0 und Tag 8

Seite 23

Tabelle 5 – Endothelzellzahlen der einzelnen Gruppen

Seite 29

Tabelle 6 – Prozentualer Endothelzellverlust

Verglichen werden Studien mit kultivierten menschlichen Hornhäuten und kultivierten Schweinehornhäuten, die keinerlei Behandlung unterzogen waren. Teilweise sind die Daten unter der Annahme eines linearen Verlustes auf 2 Wochen hochgerechnet worden.

Seite 31

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Unterschiedliche Präparationsmethoden von porkinen Hornhäuten

Ganzes Auge (a, whole eye), korneosklerale Exzidate (b, "corneo-scleral buttons"), korneale Stanzen (c, "non-split corneal buttons"), lamellierte korneale Stanzen (d, "split corneal buttons"). In Abbildung a werden die unterschiedlichen Schnittränder auf einem ganzen Auge gezeigt. In den Abbildungen b-d werden die unterschiedlichen Präparationsmethoden dargestellt. Unter den jeweiligen Präparaten ist zudem die Dicke der Hornhaut relativ dargestellt (Kunzmann et al. 2018).

Seite 10

Abbildung 2 – Entwicklung der Anzahl an Endothelzellen

In den Balkendiagrammen sind in (a) die absolute Endothelzellzahl (EZZ) und in (b) der EZZ-Verlust an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 von „corneal buttons“ (hellgrau) und „split corneal buttons“ (dunkelgrau) dargestellt. Der EZZ-Verlust in „split corneal buttons“ ist signifikant geringer als in „corneal buttons“ (Kunzmann et al. 2018)

Seite 11

Abbildung 3 – Morphologische Veränderungen der Endothelzellen

In den Abbildungen (a) und (b) sind repräsentative Photos des Endothelrasens bei „corneal buttons“ (a) und „split corneal buttons“ (b) dargestellt. Inferior sind die Graphen der Auswertung der Reformationsfiguren (c), der Rosettenformationen (d) sowie der Areale denudierter Descement-Membran in Folge von lokalen Endothelverlusten (e) („alizarin red areas“) aufgeführt (Kunzmann et al. 2018)

Seite 12

Abbildung 4 – Endothelrasen bei den unterschiedlichen Präparationsmethoden

Die Fotos zeigen die Entwicklung des Endothelrasens über einen Zeitraum von 15 Tagen: „corneal buttons“ (a-c2), „corneal buttons“ (d-f2), „split corneal buttons“ (g-i2). Aufnahmen an Tag 1 (erste Reihe), Tag 8 (zweite Reihe), Tag 15 (dritte Reihe) und Übersichtsaufnahmen an Tag 15 (vierte Reihe) (Kunzmann et al. 2018; Kunzmann et al. 2020)

Seite 13

Abbildung 5 - Schematische Darstellung der Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 5 unterschiedliche Versuchsgruppen miteinander verglichen. Kontrollen erhielten keine Simulation der Katarakt-OP. Die Flaschenhöhe (BH) wurde je nach Versuchsgruppe bei der simulierten Katarakt-OP zwischen 100 und 150cm Wassersäule variiert (BH100, BH125, BH150). In der letzten Versuchsgruppe wurde zudem vor der Einführung des Phako-Tips und dem Beginn der Irrigation Viskoelastikum in die Vorderkammer eingegeben (BH150+V). Bei dieser Versuchsgruppe betrug die BH 150 cm.

Seite 20

Abbildung 6 - Schematische Darstellung der Präparation eines "split corneal buttons"

300 µm tiefe Stanzung der Hornhaut mit einem Trepan (ø 7,5mm); Abtragung des epithelseitigen Hornhautstromas am Grund der Vorstanzung (in 300µm Tiefe); Applikation einer Fadenmarkierung und schließlich vollständige Trepanisierung zur Erstellung eines freien "split corneal buttons".

Seite 21

Abbildung 7 - Schematische Darstellung eines "split corneal buttons"

Die lockere Fadenmarkierung ohne Verziehung des Gewebes befindet sich auf der Stromaseite des "split corneal buttons". Das Hornhautendothel bleibt während der gesamten Präparation unangetastet.

Seite 22

Abbildung 8 – Versuchsablauf

Vor der Präparation erfolgte außer bei den Kontrollaugen die Simulation einer Katarakt-Operation. Nach Präparation und Einbettung in Kulturmedium an Tag 0 erfolgte je eine Auszählung an Tag 1 und Tag 15. Zusätzlich wurden die Präparate nach der ungefärbten Auszählung an Tag 15 mit einer 0,25 %-Trypanblau-Lösung und 0,2 %-Alizarinrot S-Lösung für die morphologische Auswertung gefärbt.

Seite 24

Abbildung 9 – Hornhautendothel ohne (a) und mit (b) Färbung

Die Färbung erfolgte mit Trypanblau und Alizarinrot S.

Seite 26

Abbildung 10 – Verwendete morphologische Kriterien

(a) Reformationsfiguren (b) Rosettenformationen (c) Alizarinrote Areale

Seite 27

Abbildung 11 - Relativer Verlust an Endothelzellen

Das Balkendiagramm stellt den relativen Verlust an Endothelzellen für jede Versuchsgruppe dar. Hierbei wurde die Endothelzellzahl an Tag 15 mit der von Tag 1 verglichen und so der relative Verlust für jede Gruppe berechnet. Der relative Verlust an Endothelzellen ist dargestellt als Mittelwert \pm die Standardabweichung. ***p < 0,001)

Seite 29

Abbildung 12 - Repräsentative Bilder des Endothelrasens an Tag 1 und Tag 15

Die Endothelzellen wurden an Tag 1 und Tag 15 fotografiert. Die Fotos an Tag 1 sind an ungefärbten "split corneal buttons" und an Tag 15 an gefärbten Präparaten (Doppelfärbung mit Alizarinrot und Trypanblau) durchgeführt worden. Bei den Gruppen BH125 und BH150 sind an Tag 15 Alizarinrote Areale sichtbar, die wegen der Schwarz-Weiß Fotografie grau erscheinen.

Seite 30

9 Danksagung

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Doktorarbeit möchte ich mich ganz herzlich insbesondere bei Dr. Daniel Wenzel bedanken. Er hat mich sowohl in die Methodik eingearbeitet als auch die simulierten Katarakt-Operationen gemeinsam mit mir größtenteils durchgeführt. Ebenso danke ich Vasyl Druchkiv für die statistische Auswertung meiner Daten. Für die sehr gute Zusammenarbeit, die stets vorhandene Unterstützung und die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Hornhautbank, Alexander Steinhorst und PD Dr. Olaf Hellwinkel ganz herzlich bedanken.

Ohne die Betreuung und Unterstützung durch Prof. Dr. Martin S. Spitzer und ohne die Förderung des Projektes durch den Karl Robert Brauns Preis wäre die Durchführung der Doktorarbeit jedoch nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich ebenfalls meinen allerherzlichsten Dank aussprechen!

Zum Schluss möchte ich mich noch besonders bei meiner Familie bedanken, die mich mit viel Geduld und Verständnis bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben!

8 Lebenslauf

Cand. med. Constanze Schultheiß

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: