

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
Klinikum rechts der Isar**

Histologische Untersuchungen zum Schneideverhalten des Pocket-Delaminator-Systems für die refraktive Chirurgie

Konrad R. Koch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. Chr.-P. Lohmann
2. Priv.-Doz. Dr. A. Wegner

Die Dissertation wurde am 01.03.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.09.2010 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Refraktion des Auges.....	1
1.1.1 Grundlagen.....	1
1.1.2 Myopie	3
1.1.3 Hyperopie.....	3
1.1.4 Astigmatismus	4
1.2 Anatomischer und funktioneller Aufbau der Hornhaut.....	5
1.2.1 Allgemeines	5
1.2.2 Epithel.....	6
1.2.3 Epitheliale Basalmembran	6
1.2.4 Bowman-Membran	7
1.2.5 Korneales Stroma.....	7
1.2.6 Endothel und Descemet-Membran	8
1.3 Nicht operative Korrektur der Fehlsichtigkeit.....	8
1.3.1 Historisches.....	8
1.3.2 Brillenkorrektur	9
1.3.3 Kontaktlinsen.....	9
1.4 Verfahren der refraktiven Chirurgie.....	10
1.4.1 Refraktive Linsen Chirurgie	11
1.4.1.1 Clear Lens Extraction	11
1.4.1.2 Phake Intraokularlinsen	11
1.4.2 Formverändernde Hornhautchirurgie	12
1.4.2.1 Radiäre Keratotomie.....	13
1.4.2.2 Verfahren zur Korrektur der Hyperopie	13
1.4.2.3 Intrakorneale Ringsegmente (Intacs).....	14
1.4.3 Subtraktive Hornhautchirurgie	15
1.4.3.1 Keratomileusis.....	15
1.4.3.2 Keratomileusis-in-situ	16
1.4.4 Excimerlaser-Verfahren.....	16
1.4.4.1 Photorefraktive Keratektomie.....	17
1.4.4.2 Laser-in-situ-Keratomileusis	17
1.4.4.3 Epi-LASIK.....	18
1.4.4.4 Laserepitheliale Keratomileusis (LASEK).....	18
1.4.5 Additive Hornhautchirurgie.....	19
1.4.5.1 Keratophakie.....	19
1.4.5.2 Epikeratophakie.....	19
1.4.5.3 Korneale Inlays (alloplastische Keratophakie).....	21
1.4.6 Aktuelle refraktive Verfahren und ihre Anwendungsgebiete	21

1.5	Korneale Onlays (alloplastische Epikeratophakie)	23
1.5.1	Ein neues Konzept	23
1.5.2	Verzicht auf korneales Spendermaterial	24
1.6	Positionierung und Befestigung kornealer Onlays	25
1.6.1	Bisherige Konzepte zur Befestigung	25
1.6.2	Herstellung einer subepithelialen Tasche	26
1.7	Entwicklung eines Keratoms: das Pocket-Delaminator-System	27
1.8	Problemstellung	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Das Pocket-Delaminator-System - Aufbau und Funktionsweise	29
2.1.1	Gehäuse mit Antriebsaggregat	30
2.1.2	Schneidekopf	31
2.1.3	Saugring	32
2.1.4	Klingenhalter	32
2.1.5	Klinge	33
2.2	Versuchsmaterial	34
2.3	Anwendung des PDS	34
2.4	Präparation der Hornhäute	35
2.5	Aufbereitung der Präparate für die Lichtmikroskopie	36
2.5.1	Fixierung in Paraformaldehyd	36
2.5.2	Weiterer Zuschnitt der fixierten Hornhäute	36
2.5.3	Einbettung in Paraffin	37
2.5.4	Schneiden der eingebetteten Präparate	38
2.5.5	Entparaffinierung	38
2.5.6	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	39
2.5.6.1	Grundlagen	39
2.5.6.2	Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	40
2.5.7	Immunhistochemische Färbung	41
2.5.7.1	Die Streptavidin-Biotin-Methode	41
2.5.7.2	Ablauf der immunhistochemischen Färbung	43
2.5.8	Lichtmikroskopische Beurteilung und Fotografie	45
2.6	Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie	46
2.6.1	Fixierung in Karnovsky-Fixans	46
2.6.2	Weiterer Zuschnitt der Präparate	47
2.6.3	Einbettung im Kunstharz (Epon)	47
2.6.4	Anfertigung von Semidünnpräparaten	48
2.6.5	Anfertigung von Ultradünnschnitten	49
2.6.6	Elektronenmikroskopische Beurteilung und Fotografie	50
2.7	Auflistung der Materialien	51
2.7.1	Reagenzien und Chemikalien	51
2.7.2	Verbrauchsmaterialien	52
2.7.3	Laborgeräte	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Handhabbarkeit des PDS	53
3.2	Ergebnisse unter Verwendung von Schweinehornhäuten	53
3.2.1	Orientierende Begutachtung vor und nach Verwendung des PDS	53
3.2.2	Lichtmikroskopie der porkinen Präparate	54
3.2.3	Immunhistochemische Anfärbung der porkinen Präparate	55
3.2.4	Elektronenmikroskopie der porkinen Präparate	56

3.3	Ergebnisse unter Verwendung von humanen Hornhäuten	58
3.3.1	Orientierende Begutachtung vor und nach Verwendung des PDS	58
3.3.2	Lichtmikroskopie der humanen Präparate	58
3.3.3	Immunhistochemische Anfärbung humaner Präparate	61
3.3.4	Elektronenmikroskopie der humanen Präparate	62
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	63
3.4.1	Porkine Hornhäute	64
3.4.2	Humane Hornhäute	64
4	Diskussion	67
4.1	Eine alloplastische Variante der Epikeratophakie	67
4.1.1	Ein additives Verfahren	67
4.1.2	Geringe Invasivität	69
4.2	Korneale Onlays	70
4.2.1	Anforderungen an ein synthetisches Implantat	70
4.2.2	Geschichte der Entwicklung synthetischer Hornhautimplantate	71
4.2.3	Stand der Entwicklung synthetischer Hornhautimplantate	73
4.3	Erzeugung einer subepithelialen Tasche	74
4.3.1	Wundheilungsvorgänge in der Hornhaut	75
4.3.2	Korneale Wundheilung nach refraktiver Chirurgie	76
4.3.3	Konsequenzen für die Erzeugung einer subepithelialen Tasche	77
4.3.4	Weitere Anforderungen an die Erzeugung einer Hornhaut-Tasche	78
4.4	Schneiderverhalten des Pocket-Delaminator-Systems	79
4.4.1	Beurteilung der technischen Handhabbarkeit des PDS	79
4.4.2	Möglichkeiten und Grenzen des Hornhautmodells zur Evaluation des PDS	80
4.4.2.1	Porkine Hornhäute als Modell	80
4.4.2.2	Humane Kadaveraugen als Modell	81
4.4.2.3	Fallzahlen	83
4.4.2.4	Ergänzende methodische Schritte	84
4.4.3	Relevanz der Ergebnisse	85
4.4.3.1	Porkine Präparate	85
4.4.3.2	Humane Präparate	85
4.4.3.3	Zusammenfassende Bewertung	86
4.4.3.4	Ausblick	88
5	Zusammenfassung	89
6	Literatur	90
	Danksagung	108

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Strukturen des dioptrischen Apparates.....	1
Abb. 1-2: Refraktionszustand der Emmetropie	2
Abb. 1-3: Refraktionszustand der Myopie	3
Abb. 1-4: Refraktionszustand der Hyperopie.....	4
Abb. 1-5: Refraktionszustand des Astigmatismus.....	4
Abb. 2-1: Grundaufbau des PDS	30
Abb. 2-2: Ansicht des PDS von unten.....	30
Abb. 2-3: Schneidekopf und Saugring des PDS.....	31
Abb. 2-4: Schneidekopf und Klingenthaler des PDS	32
Abb. 2-5: Klinge des PDS	33
Abb. 2-6: Gewinnung der Hornhautpräparate	35
Abb. 2-7: Weiterer Zuschnitt der Hornhäute für die Lichtmikroskopie.....	36
Abb. 2-8: Molekularer Aufbau von Hämalaun und Eosin.....	40
Abb. 2-9: Streptavidin-Biotin-Methode	42
Abb. 2-10: Weiterer Zuschnitt der Präparate für die Elektronenmikroskopie	47
Abb. 3-1: Ausschnitt des Präparates HH _p 3.1.....	54
Abb. 3-2: Anfärbung von Kollagen-VII.....	55
Abb. 3-3: Markierung von Kollagen-VII auf der stromalen Seite des Keratomschnittes	56
Abb. 3-4: Schnittverlauf durch Basalzellen.....	57
Abb. 3-5: Schnittverlauf durch Basalzellen.....	57
Abb. 3-6: Schnittverlauf entlang der Basalmembran	57
Abb. 3-7: Abtrennung gleichmäßig im Bereich von Basalmembran und Bowman- Membran.....	59
Abb. 3-8: Epithelreste auf der Stromaseite des Schnittes.....	60
Abb. 3-9: Der Schnitt verläuft streckenweise durch die Epithelzellschicht	60
Abb. 3-10: Stromaler Einschnitt.....	60
Abb. 3-11: Links Markierung von Laminin, rechts Markierung von Kollagen-VII	61
Abb. 3-12: Immunfärbung von Laminin (links) bzw. Kollagen-VII (rechts)	62
Abb. 3-13: Schnittverlauf entlang der Basalmembran	63
Abb. 3-14: Schnittverlauf im Bereich der Bowman-Membran	63

Quelle:

Abbildungen 2-1 bis einschließlich 2-5 (links) mit freundlicher Genehmigung der Gebauer Medizintechnik GmbH, Deutschland. Alle übrigen Abbildungen (s. auch Tab. 1-1) wurden für die vorliegende Arbeit selbst angefertigt.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Aktuelle Verfahren der refraktiven Chirurgie.....	22
Tab. 2-1: Fixierung und Einbettung der Präparate	38
Tab. 2-2: Gewebepreparation zur nachfolgenden Färbung.....	39
Tab. 2-3: Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	41
Tab. 2-4: Verdünnung der Primärantikörper	43
Tab. 2-5: Ablauf der immunhistochemischen Färbungen	45
Tab. 2-6: Ablauf der Fixierung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie.....	48
Tab. 3-1: Zusammenfassung der Ergebnisse.....	65

Abkürzungsverzeichnis

AEC	Amino-Ethyl-Carbazol
AK	Antikörper
ALK	Automatisierte lamelläre Keratoplastik
Aqua dest	Destilliertes Wasser
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
BKS	Barraquer-Krumeich-Swinger
CK	Konduktive Keratoplastik
CLE	Clear lens extraction
cm	Zentimeter
DDSA	Dodecenyln-Bernsteinsäure-Anhydrid
DMP-30	2,4,6-Tris-(Dimethylaminomethyl)-Phenol
dpt	Dioptrie
EGF	Epithelialer Wachstumsfaktor
Epi-LASIK	Epitheliale Laser-in-situ-Keratomileusis
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
HE	Haematoxylin-Eosin
HEMA	Hydroxy-Ethyl-Meth-Acrylat
HKL	Hinterkammerlinse
HH	Hornhaut
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICL	Intraokulare Kontaktlinse (intraocular contact lens)
ICRS	Intrakorneale Ringsegmente
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-1	Interleukin-1
Intacs	<i>siehe ICRS</i>
IOL	Intraokularlinse
KGF	Keratinocyte growth factor
KRC	Kommission Refraktive Chirurgie
LASEK	Laserepitheliale Keratomileusis

LASIK	Laser-in-situ-Keratomileusis
LTK	Laser-Thermo-Keratoplastik
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MNA	Methyl-Norbonen-2,3-Dicarbonsäure-Anhydrid
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
OCT	Optische Kohärenz-Tomographie
PFPE	Perfluoropolyether
pIOL	Phake Intraokularlinse
PBS	Phosphate buffered saline
PMMA	Poly-Methyl-Meth-Acrylat
PRK	Photorefraktive Keratektomie
RGP	Rigid gas permeable
RK	Radiäre Keratotomie
TGF-β	Transformierender Wachstumfaktor β
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
UBM	Ultraschall-Biomikroskopie

1 Einleitung

1.1 Die Refraktion des Auges

1.1.1 Grundlagen

Das menschliche Auge hat, wie andere Sinnesorgane auch, die Funktion, bestimmte Sinnesreize aus der Umwelt aufzunehmen, sie in elektrische Impulse umzuwandeln und diese schließlich an das Gehirn weiterzuleiten. Somit dient es der Verknüpfung von Gehirn und Außenwelt.

Da das menschliche Gehirn über 80 % aller Informationen auf visuellem Weg aufnimmt, erklärt sich die besondere Bedeutung des Sinnesorgans Auge für den Menschen. Den adäquaten Reiz für das menschliche Auge stellt elektromagnetische Strahlung dar, die eine Wellenlänge von 400 bis 750 nm besitzt.

Der dioptrische Apparat, der sich aus den brechenden Strukturen des Auges zusammensetzt, ermöglicht es, scharfe und klare Abbilder von Gegenständen der Außenwelt auf die Netzhaut zu projizieren. Zu diesen brechenden Medien zählen, wie die Abb. 1-1 zeigt, die Hornhaut (1), die von Kammerwasser gefüllte Vorderkammer (2), die Linse (3) sowie der dahinter befindliche Glaskörper (4).

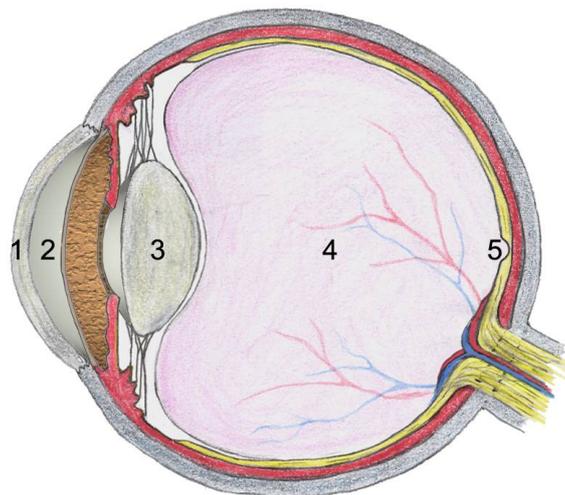


Abb. 1-1: Strukturen des dioptrischen Apparates
(1: Hornhaut, 2: Vorderkammer, 3: Linse, 4: Glaskörper, 5: Netzhaut)

Um zur Netzhaut (5) zu gelangen, müssen die Lichtstrahlen in ihrer Summe diese Medien in obiger Reihenfolge passieren und werden, in Abhängigkeit von der Krümmung und den *Brechungsindices* der verschiedenen Komponenten, mehrfach gebrochen. Letztere ergeben sich aus den unterschiedlichen Geschwindigkeiten, die Licht, abhängig von den Materialeigenschaften im jeweiligen Medium, zurücklegen kann.

Gemäß den Gesetzmäßigkeiten der Physik besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Brechkraft eines optischen Systems und der Bildweite b , die definiert ist als der Abstand zwischen der Optik und der dahinter befindlichen Projektionsebene, in der ein scharfes Bild eines Gegenstandes entsteht. Idealerweise befindet sich die Netzhaut, auf der dieses Bild entstehen soll, genau im Abstand b vom optischen System des Auges entfernt. Eine scharfe Abbildung und die damit verbundene Eindeutigkeit der Information, die an das Gehirn weitergeleitet werden kann, setzt also eine zur Brechkraft des dioptrischen Apparates passende Bulbuslänge voraus.

Die Relation zwischen beiden Größen ist für die Leistungsfähigkeit des Auges entscheidend und wird als *Refraktion* bezeichnet.

Ist das Verhältnis zwischen Brechkraft und Achsenlänge ausgeglichen, so ist das Auge in der Lage, eine klare und scharfe Projektion eines Gegenstandes aus der Außenwelt auf der Netzhaut abzubilden. Ein solches Auge bezeichnet man als *emmetrop* oder *normalsichtig* (Abb. 1-2).

Eine Gesamtbrechkraft von 62 dpt, von der allein rund 43 dpt auf die Hornhaut entfallen, und ein Abstand zwischen Hornhautscheitel und *Fovea centralis* von 24,4 mm entsprechen Durchschnittswerten eines emmetropen Auges. Diese Bedingungen sind allerdings nur bei einer begrenzten Anzahl von Menschen erfüllt.

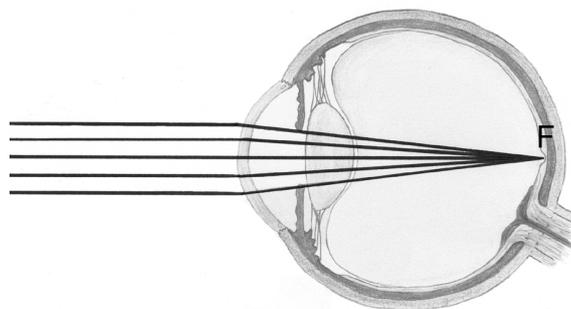


Abb. 1-2: Refraktionszustand der Emmetropie

Für alle Anderen gilt, dass die Augen – in Akkommodationsruhe – aufgrund eines ungünstigen Verhältnisses zwischen Brechkraft und Länge der optischen Achse keine scharfen Bilder auf die Retina projizieren können. In diesem Fall spricht man von Fehlsichtigkeiten oder *Ametropien*, wobei ursächlich sowohl eine stark von Durchschnittswerten abweichende Achsenlänge als auch eine abweichende Brechkraft im Vordergrund stehen kann.

Ametropie lässt sich weiter untergliedern in *Myopie* oder Kurzsichtigkeit, *Hyperopie* oder Übersichtigkeit sowie den so genannten *Astigmatismus* beziehungsweise Stabsichtigkeit.

1.1.2 Myopie

Die *Myopie* ist die Form der Fehlsichtigkeit, bei der der Bulbus und damit die Achsenlänge des Auges in Relation zur Gesamtbrechkraft zu lang ist. Der Brennpunkt F , in dem sich alle parallel auf eine Linse treffenden Lichtstrahlen vereinigen, befindet sich deshalb im Glaskörperraum vor der Netzhaut (Abb. 1-3). Die Abbildung eines fern gelegenen Gegenstandes, von dem ein solcher paralleler Strahlenverlauf in Richtung der Hornhaut ausgeht, ist unscharf.

Eine Myopie kann sowohl durch eine zu starke Krümmung der brechenden Medien zustande kommen (*Brechungsmyopie*) als auch durch einen im Vergleich zum emmetropen Auge zu langen Bulbus (*Achsenmyopie*).

Soll der Brennpunkt zum Zwecke eines scharfen, klaren Bildes auf die Netzhaut verlagert werden, so müssen zunächst parallele Strahlen in einen divergenten Verlauf gebracht werden. Dies kann durch eine Zerstreuungslinse erreicht werden.

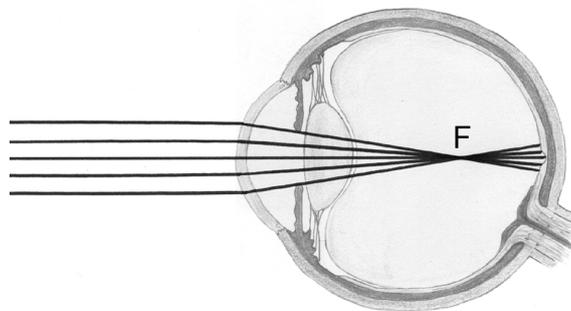


Abb. 1-3: Refraktionszustand der Myopie

1.1.3 Hyperopie

Im Falle der *Hyperopie* (Übersichtigkeit) ist die optische Achse in Bezug zur Brechkraft des Auges zu kurz. Ursächlich trennt man auch hier, abhängig davon, ob insbesondere der Bulbus zu kurz oder die Brechkraft zu gering ist, zwischen einer Achsenhyperopie und einer Brechungshyperopie.

Der Brennpunkt parallel einfallender Lichtstrahlen liegt im hyperopen Auge hinter der Retina (Abb. 1-4). Daher bedarf es bereits beim Betrachten von in der Ferne gelegenen Gegenständen einer Muskelanstrengung des Ziliarkörpers, mit nachfolgender Entspannung der Zonulafasern und Krümmungszunahme der Linse, um ein scharfes Bild auf der Netzhaut entstehen zu lassen. Unter dieser kompensatorischen Inanspruchnahme der Akkommodation in der Ferne leidet allerdings die Nahsicht. Der Nahpunkt, definiert als der Punkt mit dem kürzesten Abstand zum Auge, der noch gerade scharf auf der Retina abgebildet werden kann, rückt vom Auge weg. Eine Korrektur kann durch Verstärkung der Brechkraft erfolgen, wie beispielsweise durch Sammellinsen (Konvexgläser).

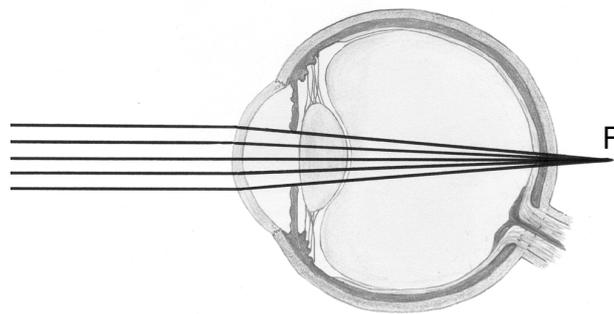


Abb. 1-4: Refraktionszustand der Hyperopie

1.1.4 Astigmatismus

Beim *Astigmatismus* ist die Krümmung der Hornhaut nicht in allen Meridianen gleich. Die Hornhautmitte entspricht dann nicht einem Kugelabschnitt, sondern vielmehr der Form eines Fasses, bei dem bekanntlich die Fassreifen stärker gekrümmt sind als die Fassdauben.

Dadurch wird ein Bündel von Lichtstrahlen, die im am stärksten gekrümmten Meridian auf die Hornhaut treffen, stärker gebrochen als solche, die im dazu senkrechten Meridian einfallen (Abb. 1-5). Ein auf das Auge auftreffendes paralleles Strahlenbündel wird nicht in einem Brennpunkt vereinigt. Vielmehr entsteht ein konvergierendes Strahlenbündel mit zwei Brennlinien und einem zwischen ihnen liegenden Kreis kleinster Verwirrung, das so genannte *Sturmsche Konoid* (Sturm, 1838). Je nach Abstand der Projektionsfläche wird ein Gegenstandspunkt daher als Linie oder als Zerstreungskreis abgebildet. Von der in bestimmten Fällen stabförmigen Abbildung eines Punktes leitet sich der Begriff *Stabsichtigkeit* ab.

Eine Korrektur der Stabsichtigkeit ist durch den Einsatz torischer Linsen erreichbar, die genau wie das betroffene Auge auch unterschiedliche Krümmungsradien in zueinander senkrecht stehenden Meridianen besitzen. Durch die Überlagerung des stärker gekrümmten Meridians der Linse mit dem schwächer gekrümmten Meridian des Auges entsteht im stabsichtigen Auge durch Kompensation des Astigmatismus eine scharfe Abbildung und damit statt zweier Brennlinien F_1 und F_2 ein einheitlicher Brennpunkt F .

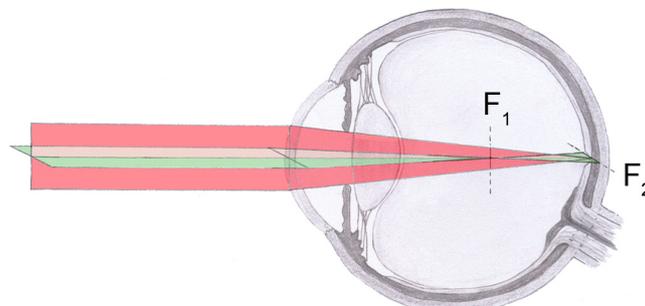


Abb. 1-5: Refraktionszustand des Astigmatismus
(F_1 , F_2 : Brennlinien des Astigmatismus)

1.2 Anatomischer und funktioneller Aufbau der Hornhaut

Die Hornhaut des Auges hat aufgrund ihres großen Anteils an der okularen Gesamtbrechkraft und ihrer exponierten oberflächlichen Lage eine herausragende Stellung als Zielorgan bei der operativen Korrektur von Fehsichtigkeiten. Zudem steht sie im Mittelpunkt eines neuen, noch präklinischen Operationskonzeptes, mit dem sich die vorliegende Arbeit beschäftigt.

Daher soll an dieser Stelle zunächst eine Übersicht der Hornhautanatomie mit besonderer Berücksichtigung des makromolekularen Aufbaus ihrer oberflächlichen Anteile gegeben werden.

1.2.1 Allgemeines

Die menschliche Hornhaut lässt sich in ihrer Topographie oder Krümmung als Ausschnitt einer Ellipse interpretieren. Dem spitzeren Ende eines Eies gleich ist die korneale Krümmung im Regelfall im zentralen Bereich am stärksten und nimmt zur Peripherie hin ab. Die zentrale oder auch apikale Zone, die ungefähr einen Durchmesser von 3-4 mm hat, zeichnet sich dabei durch die stärkste Symmetrie aus. Diese kann am ehesten als sphärisch betrachtet werden und besitzt einen Krümmungsradius von ungefähr 7,7 mm. Der über der Pupillenöffnung befindliche Teil der zentralen Zone, der einen etwas geringeren Durchmesser aufweist, wird durch seine besondere Bedeutung für das zentrale Sehvermögen auch als funktionelle optische Zone bezeichnet. Der Gesamtdurchmesser der Hornhaut im Limbusbereich beträgt horizontal etwa 11,7 mm, vertikal etwa 10,6 mm.

Die Hornhautdicke, deren Messung als *Pachymetrie* bezeichnet wird, hat in der Mehrzahl der Augen mit etwa 520 µm den geringsten Wert im kornealen Zentrum und steigt zum Limbus hin auf Werte um 670 µm an (Funk et al., 1997, S. 24).

Die Hornhaut besitzt lediglich im limbalen Bereich ein vaskuläres Randschlingennetz und ist darüber hinaus frei von Blutgefäßen. Die Versorgung mit Nährstoffen wie *Glucose* erfolgt deshalb fast ausschließlich über Diffusion aus dem Kammerwasser (Bock & Maumenee, 1953, S. 282; Thoft et al., 1971a, S. 467; Thoft et al., 1971b, S. 685). Der Sauerstoffbedarf wird hingegen durch Diffusion in entgegengesetzter Richtung aus dem Tränenfilm gedeckt (Holden & Mertz, 1984, S. 1161; Holden et al., 1984, S. 476).

Die Kornea verfügt über eine dichte Innervation mit cholinergen sensiblen Nervenfasern. Marklose Dendriten ziehen bis in die Basalmembran hinein. Zum Teil verästeln sie sich auch zwischen den Epithelzellen bis nahe an die korneale Oberfläche heran (Klyce & Beuerman, 1988, S. 3). Durch Reaktion auf Schmerz, Druck und Temperaturänderungen besitzen sie eine wichtige Schutzfunktion. Daneben üben korneale Nervenendigungen über die Sekretion unterschiedlicher Neurotransmitter wie *Substanz P* und *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1) einen bedeutenden Einfluss auf die epitheliale Schrankenfunktion und die Proliferation von Epithelzellen aus (Kuwayama & Stone, 1987, S. 1947; Stone & McGlenn, 1988, S. 305; Baker et al., 1993, S. 137; Nakamura et al., 2003a, S. 839; 2003b, S. 2937).

1.2.2 Epithel

Die Oberfläche der Kornea wird von einem 5- bis 6-schichtigen unverhornten und 40-60 μm dicken Plattenepithel gebildet, das wie alle epithelialen Zellverbände mit seiner Basalzellschicht unmittelbar einer Basalmembran aufliegt. Die hochprismatischen Basalzellen, die durch Desmosomen untereinander und durch Hemidesmosomen an ihrer Unterlage fixiert sind, sorgen durch ihre Teilungsfähigkeit für die fortlaufende Erneuerung des Zellverbandes. Neu entstandene Zellen gelangen durch die kontinuierlichen basalen Teilungsvorgänge mit der Zeit als Superfizialzellen an die korneale Oberfläche und flachen sich währenddessen immer weiter ab. Die nur noch 0,5 μm hohen Zellen werden schließlich in den Tränenfilm abgeschilfert. Die Barrierefunktion des Epithels wird durch zwischen den Superfizialzellen gelegene *Tight Junctions* gewährleistet (McLaughlin et al., 1985, S. 951).

Neben der geschilderten *vertikalen* Dynamik existiert ferner eine *horizontale* Dynamik im Epithelzellverband. Durch eine im limbalen Bereich höhere Teilungsrate werden Basalzellen fortlaufend entlang der Basalmembran von der Hornhautperipherie zur Hornhautmitte, also in zentripetaler Richtung, vorgeschoben.

Beide Mechanismen bedingen gemeinsam, dass sich ein lokalisierter Epithelschaden mit Verlust der Basalzellen im Rahmen der Wundheilung unter Wiederherstellung eines 5-6 schichtigen Zellverbandes wieder schließen kann (Thoft & Friend, 1983, S. 1442; McDermott, 1994, S. 4.1).

1.2.3 Epitheliale Basalmembran

Die der Epithelbasis anliegende und 40-60 nm dicke Basalmembran dient in erster Linie der mechanischen Verankerung der Epithelzellen an ihrer Unterlage. Daneben scheinen Basalmembranbestandteile wie das *Laminin-V* auch einen modulierenden Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Migration der Epithelzellen zu besitzen (Ebihara et al., 2000, S. 69).

Die Basalmembran setzt sich aus einem Netzwerk verschiedener Matrixproteine und Proteoglykane zusammen. Durch charakteristische Verteilung der verschiedenen Bestandteile lässt sie sich ultrastrukturell noch weiter in eine oberflächliche *Lamina lucida* und eine tiefe *Lamina densa* unterteilen.

Die *Lamina lucida* wird unter anderem aus den am Hemidesmosomen-Komplex beteiligten $\beta 4$ -Integrinen sowie aus *Fibronektin* und *Kalinin* aufgebaut, während die *Lamina densa* als Hauptkomponenten *Laminin*, *Entactin-1/Nidogen-1*, *Kollagen-IV* und *Heparansulfat* enthält (Rousselle et al., 1991, S. 567; Erickson & Couchman, 2000, S. 1291; Citron, 1997, S. 5.3). Die Synthese der Hauptbestandteile *Laminin* und *Kollagen-IV* erfolgt durch die Epithelzellen (Pulhorn & Thiel, 1973, S. 21; Fujikawa et al., 1984, S. 128; Nishida, 1997, S. 10; Suzuki et al., 2000, S. 2495).

1.2.4 Bowman-Membran

Vom kornealen Stroma wird der Epithelverband in der menschlichen Hornhaut durch eine weitere zellfreie, 8-14 µm dicke Schicht getrennt, die als Bowman-Membran (*Lamina limitans externa*) bezeichnet wird. Sie setzt sich vornehmlich aus zufällig angeordneten heterotypischen Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von 18-22 nm zusammen, die aus *Kollagen-I* und *Kollagen-V* aufgebaut sind (Linsenmayer et al., 1998, S. 231 u. S. 248). Darüber hinaus enthält sie charakteristische Verankerungsfilamente aus *Kollagen-VII*, welche über Ausstrahlung in die posteriore *Lamina densa* für die Fixierung der Basalmembran und somit mittelbar auch für die des Epithels an der stromalen Unterlage verantwortlich sind (Citron, 1997, S. 5.3).

Eine mikroskopisch eindeutig und scharf vom kornealen Stroma abgrenzbare Bowman-Membran wie beim Menschen ist nicht bei allen Säugetierspezies vorhanden, beispielsweise auch nicht bei der Schweinehornhaut, welche im Rahmen dieser Arbeit als Modell Verwendung fand (Camber et al., 1987, S. 127; Merindano et al., 2002, S. 133). Nichtsdestotrotz stimmen humane und porkine Hornhaut insofern überein, als auch beim Schwein die geordnete, streng lamelläre Anordnung der Kollagenfibrillen des Stromas (s. Kap. 1.2.5) im Grenzbereich zwischen Stroma und Basalmembran verloren geht und zudem die charakteristischen Verankerungsfilamente aus Kollagen-VII in diesem Bereich nachweisbar sind.

1.2.5 Korneales Stroma

Das korneale Stroma, auch als *Substantia propria* bezeichnet, macht 9/10 der Hornhautdicke aus. Es enthält wie die Bowman-Membran als Hauptkomponente Kollagenfibrillen, die vornehmlich aus *Kollagen-I* und *-V* aufgebaut sind. Daneben kommen auch die Kollagen-Typen II, III, VI und IX in geringerer Menge vor (Linsenmayer et al., 1998, S. 237).

Die stromalen Fibrillen sind mit einem Durchmesser von 24 nm jedoch dicker als jene in der Bowman-Membran. Sie schließen sich an der Grenze zwischen Bowman-Membran und Stroma vermehrt zu Bündeln zusammen, um dann im Stroma selbst eine in höchstem Maße geordnete, lamelläre Schichtung einzunehmen (Craig & Parry, 1981, S. 232). Innerhalb einer solchen Lamelle verlaufen sämtliche Kollagenfibrillen parallel, wohingegen sich die benachbarten Lamellen im Winkel von 90° kreuzen.

Zwischen den Lamellen befinden sich Keratozyten, die über lange Zytoplasmaausläufer einen synzytialen Verbund bilden. Die verbleibenden Zwischenräume werden von Proteoglykanen wie Chondroitinsulfat und Keratansulfat gefüllt, welche durch zahlreiche Oberflächenladungen eine hohe Wasserbindungskapazität und damit Quellfähigkeit besitzen. Diese ist neben der regelmäßigen Fibrillenordnung für die Transparenz und den Brechungsindex der Hornhaut verantwortlich (Maurice, 1957, S. 263; Goldman & Benedek, 1967, S. 574; Goldman et al., 1968, S. 501).

1.2.6 Endothel und Descemet-Membran

An die Vorderkammer des Auges grenzt die Hornhaut mit dem *Endothel*, einem einschichtigen Verband hexagonaler, sehr stoffwechselaktiver Zellen, welcher in der ca. 10 µm dicken *Descemet-Membran (Lamina limitans interna)* eine spezialisierte und besonders breite Basalmembran besitzt. Das Endothel verfügt über eine wesentlich höhere Durchlässigkeit für Wasser und andere Moleküle als das Epithel. Durch aktive, Energie verbrauchende Pumpmechanismen ist das Endothel auch in der Lage, dem passiven Einstrom entgegengesetzt, Wasser aus der kornealen Matrix in die Vorderkammer zurückzupumpen. Der Wassergehalt des Stromas und mit ihm der Brechungsindex der Hornhaut können somit in engen Grenzen stabil gehalten werden.

Das Endothel ist nach den ersten Lebensmonaten nicht mehr teilungsfähig, weshalb nach Zelluntergängen ein weiterhin zusammenhängender Zellverbund nur durch Hypertrophie angrenzender intakter Zellen geschehen kann. So sinkt die Zellzahl im Laufe des Lebens von 3500/mm² bei jungen Erwachsenen auf Werte um 2000/mm² im hohen Alter. Eine Mindestzahl von 400-700 Zellen/mm² ist erforderlich, um einen gleichbleibenden Hydratationszustand zu erhalten und eine Eintrübung durch die Entstehung eines Stromaödems zu verhindern (Svedbergh & Bill, 1972, S. 321; Bourne & Kaufman, 1976, S. 319)

1.3 Nicht operative Korrektur der Fehlsichtigkeit

1.3.1 Historisches

Die ersten Versuche, Fehlsichtigkeiten und insbesondere Myopien wirksam zu therapieren, reichen in der Menschheitsgeschichte weit zurück. Im alten China versuchte man zum Beispiel dadurch, dass man im Schlaf Sandsäcke auf die geschlossenen Augen legte, eine Abflachung der Hornhaut mit zumindest vorübergehender Reduzierung der Myopie zu erzielen. Auf einen ebenso mechanischen Effekt zielten viel später die Herren Dr. Ball um 1850 und Charles Tyrrell um 1900 ab.

Ball entwickelte einen Augenbecher, in dem ein auf einer Sprungfeder befestigter kleiner Holzhammer durch die geschlossenen Augenlider wiederholte kleine Schläge auf die Hornhaut ausüben konnte. Der von Tyrrell konstruierte „*Ideal Sight Restorer*“ funktionierte ähnlich, allerdings auf der Basis eines Überdruckes, der auf die Hornhaut einwirkte (Ferry, 1986, S. 1246; Bores, 2001b, S. 6). Diese Maßnahmen waren genauso wenig von dauerhaftem Erfolg wie andere Konzepte, die auf der Verwendung von auf Kräuterbasis hergestellten Salben beruhten, welche in der topischen Anwendung die Kurzsichtigkeit reduzieren sollten (Woo & Wilson, 1990, S. 719). Durchsetzen konnten sich bis heute unter den verschiedenen Ansätzen zur konservativen Korrektur der Fehlsichtigkeit allein die Brille sowie die Kontaktlinsen.

1.3.2 Brillenkorrektur

Um das Jahr 1276 wurden in Venedig erstmals Brillengläser zur Korrektur von Refraktionsfehlern gefertigt. Es ist jedoch weder bekannt, wer der tatsächliche Erfinder der Brille war, noch, ob die Europäer ihre Kenntnisse den Reiseberichten Marco Polos aus China verdankten oder die Brille davon unabhängig entwickelten.

Wichtige optische Grundlagen für die Entstehung der Brille lieferten die Arbeiten Roger Basons (1214-1294), die er im Jahre 1267 in einem „*Opus majus*“ und einem „*Opus minus*“ zusammenfasste. Er entwickelte zum Beispiel bis zum Jahr 1267 ein Vergrößerungsglas, bestehend aus einer auf der einen Seite planen, auf der anderen Seite konvexen Linse, die als Lesehilfe mit der flachen Seite unmittelbar auf den zu lesenden Text aufgelegt wurde.

Ab dem Jahre 1300 erreichte die Brille immer größere Bekanntheit. Sie besaß damals ein Ledergerüst ohne Bügel und wurde zunächst nur mit konvexen Gläsern zur Behandlung der Presbyopie gefertigt. In dieser Form wurde die Brille allerdings lange, nicht zuletzt durch ihren hohen Preis, kaum eingesetzt.

Es vergingen weitere 200 Jahre, bis sie als optisches Hilfsmittel wirklich populär wurde. In diese Zeit, genauer um 1553, fallen wohl auch die ersten Verschreibungen von Brillen mit konkaven Gläsern für Kurzsichtige durch den Franzosen Hollerius (Hirschberg, 1982). Um 1730 entwarf der Londoner Optiker Edward Scarlett erstmals ein Brillengerüst, das statt Lederriemen über feste Seitenbügel verfügte.

Der Einsatz zylindrischer Gläser zur Korrektur des Astigmatismus ließ aufgrund mangelnder Kenntnisse über die Optik des Auges noch wesentlich länger, bis in das 19. Jahrhundert hinein, auf sich warten.

Die Brille stellt nach wie vor die am häufigsten verwendete Korrekturmethode bei Fehlsichtigkeit dar.

1.3.3 Kontaktlinsen

Gegründet auf die frühen Erkenntnisse Leonardo da Vincis (1608) und René Descartes' (1637), die sich mit der optischen Wirkung unmittelbar vor das Auge gehaltener sphärisch gekrümmter Glaskörper beschäftigten, formulierte der englische Wissenschaftler Sir John Herschel (1829) um das Jahr 1830, dass die Brechkraft eines Auges, an dessen Oberfläche eine Glaslinse unmittelbar anliegt, nicht mehr länger von der Krümmung der Hornhaut, sondern vielmehr vom Krümmungsradius der applizierten Linse abhängt.

Die erste praktische Anwendung dieser Erkenntnisse gelang dem Glasbläser und Hersteller von Kunstaugen, Friedrich Adolf Müller, im Jahre 1887. Er fertigte eine gläserne Hornhautschale mit Sklerateil für einen Patienten an, der diese Schale nach weitgehender, neoplastisch bedingter Zerstörung der Lider eines Auges als protektive Maßnahme tragen sollte. Das Fortschreiten einer *Keratitis e lagophthalmo* konnte auf diese Weise erfolgreich aufgehalten werden. Die Vorläufer der Kontaktlinsen erfüllten somit zunächst mehr einen therapeutischen als optischen Nutzen.

Ihre Weiterentwicklung zu Kontaktlinsen für vornehmlich refraktive Zwecke ist vor allem den Herren Eugen Fick (Fick, 1888, S. 279; Fick, 1892, S. 306), August Müller (Müller, 1889) und Eugene Kalt (Panas, 1888, S. 400; Pearson, 1989, S. 643) zu verdanken. Letzterer entwarf erstmalig Kontaktlinsen ohne einen Skleraanteil und gilt daher heute als Erfinder der modernen Kontaktlinse.

Der entscheidende Schritt zur weit reichenden Einsetzbarkeit und Popularität der Kontaktlinse gelang schließlich der Firma Röhm und Haas im Jahre 1936 mit der kommerziellen Fertigung von Kontaktlinsen aus dem Kunststoff *Poly-Methyl-Meth-Acrylat* (PMMA), auch als Plexiglas bekannt. Von diesem Zeitpunkt an lösten diese formstabilen Linsen die gläsernen Modelle der Firma Zeiss ab.

Die geringe Sauerstoffdurchlässigkeit von harten Kontaktlinsen aus Plexiglas stellte sich mit der Zeit als Nachteil heraus, weshalb in 1970er Jahren neue formstabile Linsendesigns aus gasdurchlässigen Kunststoffen entwickelt wurden, die als RGP-Kontaktlinsen (*Rigid Gas Permeable*) bezeichnet werden.

Erste weiche Kontaktlinsenformen wurden im Laufe der 1960er Jahre, fußend auf den Arbeiten der tschechischen Chemiker Wichterle und Lim (1960, S. 117) entwickelt. Mit der kommerziellen Fertigung solcher Kontaktlinsen aus dem hydrophilen *Hydroxy-Ethyl-Meth-Acrylat* (HEMA) begann die Firma Bausch & Lomb im Jahr 1971. Seither wurden diverse andere hydrophile Polymere, die als *Hydrogele* bezeichnet werden, zur Herstellung weicher Kontaktlinsen erprobt und genutzt. Darüber hinaus sind seit Ende der 1990er Jahre auch weiche Kontaktlinsen aus *Silikon-Hydrogel*-Gemischen erhältlich.

Bei den heute verfügbaren Kontaktlinsen wird nach wie vor zwischen formstabilen und weichen Formen unterschieden. Durch Verwendung formstabiler, harter Kontaktlinsen können neben sphärischen Refraktionsfehlern auch reguläre und irreguläre Astigmatismen korrigiert werden. Sie finden daher auch Verwendung zur visuellen Rehabilitation bei Keratokonus. Für die flexiblen, weichen Kontaktlinsen gilt hingegen, dass ihrem höheren Tragekomfort ein erhöhtes Risiko für die Entstehung bakterieller Keratitiden gegenübersteht (Cheng et al., 1999, S. 181; Bourcier et al., 2003, S. 834).

1.4 Verfahren der refraktiven Chirurgie

Die refraktive Chirurgie verfolgt das Ziel, die Brechkraft des dioptrischen Apparates operativ zu beeinflussen und damit Ametropien zu korrigieren. Dabei können alle Bestandteile der Optik - Hornhaut, Vorderkammer, Linse und Glaskörper - Ziel der chirurgischen Maßnahme sein. Man verändert entweder die Brechkraft der optischen Medien (Linse oder Hornhaut) oder bringt zusätzliche brechende Elemente in das optische System ein, zum Beispiel in das Hornhautstroma, die Vorderkammer oder die Hinterkammer. Die verschiedenen Möglichkeiten derartiger Eingriffe sollen im Folgenden dargestellt werden.

1.4.1 Refraktive Linsen Chirurgie

Die Implantation von Intraokularlinsen stand Pate für die gesamte neuere Entwicklung der refraktiven Chirurgie. Sie stellte die erste funktionierende Methode dar, mit der Fehlsichtigkeiten auf chirurgischem Wege korrigiert werden konnten. Im Rahmen der Kataraktchirurgie konnten erstmals in den 1950er Jahren synthetische Linsen erfolgreich in das Augenninnere implantiert werden (Ridley, 2003, S. 758). Zwar dienten die Operationen primär der Behandlung des grauen Stars. Allerdings war es mittels präoperativer biometrischer Berechnungen möglich, Kunstlinsen mit adäquater Brechkraft auszuwählen. Dadurch konnten präoperativ bestehende Refraktionsfehler, von der Behandlung der Katarakt abgesehen, korrigiert werden.

Hierauf fußend wurden mit der Zeit Operationsverfahren entwickelt, welche, losgelöst von der Behandlung des grauen Stars, allein der Korrektur von Fehlsichtigkeiten dienen. Diese sollen nachfolgend erläutert werden.

1.4.1.1 Clear Lens Extraction

Die Idee, hochgradige Myopien durch Entfernung der an sich funktionstüchtigen und klaren Linse zu erreichen, geht weit zurück auf Überlegungen von Boerhaave zu Beginn des 18. Jahrhunderts (1750). Sie wurde allerdings erst zum Ende des 19. Jahrhunderts wieder aufgegriffen (Fukala, 1890, S. 230).

Hierauf beruht das heutige Verfahren der *Clear Lens Extraction* (CLE). Die Operationstechnik bei der CLE entspricht dem chirurgischen Vorgehen bei der Kataraktextraktion durch Phakoemulsifikation. Die klare Linse wird unter Erhaltung des Kapselsackes durch Ultraschall fragmentiert, emulgiert und anschließend aspiriert. Daraufhin wird eine künstliche Intraokularlinse mit adäquater Brechkraft intrakapsulär implantiert.

Die Implantation einer Kunstlinse nach der CLE hat sich zur Vermeidung postoperativer Komplikationen als vorteilhaft erwiesen (Verzella, 1985, S. 65; Schinz & Schutte, 1991, S. 142; Badr et al., 1995, S. 1139; Ramos et al., 2002, S. 206). Daher wird im Falle einer hochgradigen Myopie auch dann eine plane Kunstlinse (von $\pm 0,0$ dpt) in den Kapselsack implantiert, wenn keine optisch-refraktive Funktion erforderlich ist (Verzella, 1986, S. 347). Sie trägt dazu bei, den Glaskörper postoperativ in seiner Ursprungsposition zu halten, wodurch die Inzidenz rhegmatogener Netzhautablösungen, die aufgrund dehnungsbedingter peripherer Netzhaut-Degenerationen in hochmyopen Augen ohnehin erhöht ist, gesenkt werden kann.

Durch Implantation *torischer* Intraokularlinsen bietet die CLE auch die Möglichkeit, neben sphärischen Refraktionsfehlern reguläre Astigmatismen zu korrigieren.

1.4.1.2 Phake Intraokularlinsen

Eine weitere Möglichkeit der Refraktionsänderung durch Linsen Chirurgie besteht in der Implantation eines zusätzlichen Linsenelements in die Vorder- oder die Hinterkammer unter Er-

halt der körpereigenen Linse. Das hat gerade bei jüngeren Patienten gegenüber der CLE den Vorteil, dass die Akkommodationsfähigkeit erhalten bleibt.

Verschiedene Modelle von phaken Intraokularlinsen (pIOL) sind entwickelt worden, die sich bezüglich der Form und bezüglich ihrer Position im Auge unterscheiden.

Eine Variante ist die kammerwinkelgestützte Vorderkammerlinse. Sie besitzt zwei Haptiken, mit denen sie im Kammerwinkel fixiert wird.

Im Rahmen früher klinischer Anwendungen dieses Linsentyps wurden schwere Komplikationen beobachtet, wie sekundäre Glaukome durch eine Blockade des Kammerwinkels, korneale Dekompensation durch einen massiven, mechanisch bedingten Endothelzelluntergang sowie schwere Iridozyklitiden (Baikoff & Colin, 1990, S. 383; Mimouni et al., 1991, S. 277; Perez-Santonja et al., 1996, S. 183). Durch Verbesserungen des Designs wurden das Auftreten dieser schwerwiegenden Komplikationen verringert (Baikoff et al., 1998, S. 282). Pupillentrübungen, anteriore Uveitiden oder ein geringgradiger Endothelzellverlust treten dennoch gelegentlich postoperativ auf (Kohnen et al., 2005, S. 1003).

Die derzeit am häufigsten verwendete pIOL-Variante ist die von Worst und Fechner entwickelte, so genannte *Iris-Claw-Linse* (Worst, 1980, S. 166; Fechner, 1987, S. 26; Fechner, 1991, S. 860), die in die Vorderkammer eingebracht wird. In ihre krebsscherenartigen, unterbrochenen Haptiken werden Falten der Regenbogenhaut eingeklemmt. Postoperative Endothelzellverluste sind seltener und geringer ausgeprägt als bei Verwendung des kammerwinkelgestützten Linsentyps (Pop & Payette, 2004, S. 309).

Schließlich kommen als weitere Variante auch noch Hinterkammerlinsen (HKL) zum Einsatz, die epilentikulär in den *Sulcus ciliaris* implantiert werden (Zaldivar & Rocha, 1996, S. 107; Davidorf et al., 1998, S. 306; Zaldivar et al., 1998, S. 294). Bei diesem als ICL („*Intraocular Contact Lens*“) bezeichneten Linsentyp wird als mögliche Komplikation die frühzeitige Ausbildung einer Katarakt beschrieben, die auf den unmittelbaren Kontakt zwischen der HKL und der dahinter befindlichen Linse zurückgeführt wird (Menezo et al., 2004, S. 317; Chen et al., 2008a, S. 1181). Diese Komplikation ist allerdings durch Designverbesserungen sehr selten geworden.

1.4.2 Formverändernde Hornhautchirurgie

Die Hornhaut hat aufgrund ihres hohen Anteils an der Gesamtbrechkraft des Auges sowie ihrer exponierten Position eine herausragende Bedeutung als Zielorgan refraktiver Eingriffe.

Versuche, die Brechkraft der Hornhaut chirurgisch zu beeinflussen gehen historisch weit zurück. Lans (1898, S. 117) untersuchte bereits am Ende des 19. Jahrhunderts an Kaninchenhornhäuten den Einfluß gezielter Inzisionen auf die korneale Krümmung. In den 1940er und 1950er Jahren folgten Versuche von Sato mit radiär verlaufenden Einschnitten in das Hornhautstroma (Sato et al., 1953, S. 823), zunächst von der Endothelseite, später auch alternierend auf der Epi- und Endothelseite. Es vergingen noch weitere zwei Jahrzehnte, bis Svatyslav N. Fyodorov in den 1970er Jahren mit der *radiären Keratotomie* (RK) das erste Verfahren

der refraktiven Hornhautchirurgie entwickelte, dass sich breiter Beliebtheit und klinischer Anwendung erfreute (Fyodorov & Durnev, 1979, S. 1885). Dabei gelang es erstmalig, den deformierenden Effekt peripherer, stromaler Inzisionen in Form einer hinreichend steuerbaren und kalkulierbaren Krümmungsänderung der Hornhautmitte nutzbar zu machen.

Operationsverfahren wie die RK, bei denen die optisch relevante Krümmungsänderung der Hornhautmitte indirekt durch chirurgische Maßnahmen in der Hornhautperipherie erzielt wird, sollen hier unter dem Begriff der *formverändernden Hornhautchirurgie* zusammengefasst werden. Sie werden im Folgenden aufgezählt.

1.4.2.1 Radiäre Keratotomie

Bei der RK nach Fjodorov wird die Hornhaut, unter Freilassung der zentralen optischen Zone, mit 4-16 radiär verlaufenden und in ihrer Tiefe bis dicht vor die Descemet-Membran reichenden Inzisionen versehen. Aufgrund dieser Einschnitte wird die Hornhautperipherie im Inzisionsbereich ausgebeult und die Krümmung des Zentrums flacher, wobei Tiefe und Anzahl der Einschnitte einen entscheidenden Einfluss auf das refraktive Ergebnis haben (Jester et al., 1981, S. 153; Salz et al., 1983, S. 655; Haverbeke & Levy, 1990; Raja & Niazi, 2004, S. 361).

Die besten Ergebnisse erzielte man bei der Korrektur von Myopien bis zu $-4,0$ dpt. Bei höhergradiger Kurzsichtigkeit traten postoperativ häufig Unterkorrekturen auf (Waring et al., 1991, S. 1164).

Die RK stellte lange die am häufigsten praktizierte refraktive Operationsmethode in den westlichen Industrienationen dar. Aufgrund ihrer geringeren Genauigkeit verlor sie jedoch, vor allem durch die rasante Entwicklung laserchirurgischer Techniken, in den letzten Jahren stark an Bedeutung (Duffey & Leaming, 2005, S. 742).

1.4.2.2 Verfahren zur Korrektur der Hyperopie

Eine Methode, an deren Entwicklung Svatyslav N. Fyodorov ebenso maßgeblich beteiligt war, ist die *Laser-Thermo-Keratoplastik* (LTK). Sie beruht auf der Applikation kreisförmig angeordneter punktförmiger Verbrennungsherde, die man in der mittleren Peripherie der Hornhaut mit einem Holmiumlaser setzt. Da sich die Hornhaut im Bereich der peripheren Herde während der Wundheilung zusammenzieht, kommt es gleichzeitig zu einer peripheren Abflachung und einer zentralen Aufsteilung der Hornhaut, die man zur Behandlung einer Hyperopie nutzen kann (Seiler et al., 1990, S. 335; Neumann et al., 1990, S. 404; Neumann et al., 1991, S. 830). Verschiedene Untersuchungen wurden bezüglich der günstigsten Anordnung und Anzahl der Laserherde durchgeführt, um eine möglichst genaue Hyperopie-Korrektur zu erzielen (Kohnen et al., 1996, S. 427; Kohnen et al., 1997, S. 702). Die Vorhersagbarkeit und Langzeitstabilität der refraktiven Ergebnisse nach LTK hat sich jedoch insgesamt als begrenzt herausgestellt. Eine postoperative Regression war häufig zu beobachten (Nano & Muzzin, 1998, S. 751; Vinciguerra et al., 1998, S. 21).

Auf diesen klinischen Erfahrungen aufbauend entwickelten McDonald und andere (Asbell et al., 2001, S. 79; McDonald, 2002, S. 1583) die Methode der *konduktiven Keratoplastik* (CK). Anstelle von Laserherden werden hier Hitzeherde mit Radiofrequenzwellen in der mittleren Peripherie der Kornea appliziert. In den bisherigen Langzeitbeobachtungen konnte mit der CK eine effektive Korrektur leicht- bis mittelgradiger Hyperopien erzielt werden, wobei die Regressionstendenz geringer zu sein scheint als bei der LTK (McDonald, 2005, S. 512; Pallikaris et al., 2005, S. 1520).

1.4.2.3 Intrakorneale Ringsegmente (Intacs)

Der Optometrist A.E. Reynolds entwickelte in den späten 1970er Jahren erstmals ein ringförmiges Element aus PMMA mit dem Ziel, dieses in die Hornhaut einzupflanzen und den Einfluss auf die korneale Krümmung zu untersuchen. Der Effekt, der nach Implantation eines solchen Ringes beobachtet werden konnte, war eine Abflachung der zentralen Hornhaut, die sich proportional zur Dicke des implantierten Rings verhielt. Histologisch konnte gezeigt werden, dass dies auf einer Volumenverschiebung - einer peripheren Gewebekompression mit gleichzeitig zentraler Gewebeexpansion - beruht (Fleming et al., 1989, S. 146; Burris et al., 1991, S. 46; Burris et al., 1993, S. 182).

Aus einem anfänglich zusammenhängenden 360° umfassenden Ring, der an einer Stelle zum Einschieben in die Hornhaut unterbrochen war, wurden später zwei getrennte Segmente zu je 150° entwickelt, die sich bei gleichem Effekt leichter in die Hornhaut einbringen lassen. Sie werden als *intrakorneale Ringsegmente* (ICRS) oder *Intacs* bezeichnet. In klinischen Studien konnten bei der Verwendung von Intacs vorhersagbare, stabile Korrekturen von Myopien bis etwa -4 dpt erzielt werden (Twa et al., 1999, S. 515; Ruckhofer et al., 2000, S. 133; Asbell & Ucakhan, 2001, S. 1456; Rapuano et al., 2001, S. 1922).

Darüber hinaus finden Intacs derzeit Verwendung zur Befundstabilisierung bei iatrogenen Keratektasien nach laserchirurgischen Eingriffen sowie bei Keratokonus (Siganos et al., 2002, S. 43; Siganos et al., 2003, S. 64; Kymionis et al., 2003, S. 322).

Durch Implantation der Ringsegmente lässt sich bei diesen Krankheitsbildern eine signifikante Abflachung der Hornhautmitte erreichen. In der Regel geht damit eine Wiederherstellung der Kontaktlinsen-Toleranz einher, welche für die visuelle Rehabilitation bei Keratokonus von entscheidender Bedeutung ist (Tan et al., 2006, S. 212; Colin & Malet, 2007, S. 69).

1.4.3 Subtraktive Hornhautchirurgie

Subtraktive Eingriffe an der Hornhaut beruhen auf dem Prinzip, in der Hornhautmitte Teile des kornealen Stromas gezielt abzutragen und damit unmittelbar die zentralen kornealen Krümmungsradien zu modifizieren.

1.4.3.1 Keratomileusis

Bei der ursprünglichen Form der *Keratomileusis*, die José I. Barraquer in den 1960er Jahren entwickelte, wurde mit Hilfe eines Keratoms eine etwa 300 µm dicke Hornhautscheibe von der Kornea abgetrennt. Die Scheibe wurde einem Gefriervorgang unterzogen und dann, unter Verwendung einer Drehbank, auf der stromalen Seite den refraktiven Erfordernissen entsprechend geschliffen und in ihrer Krümmung verändert. Das derart modifizierte Lentikel wurde anschließend wieder auf die Hornhaut aufgenäht (Barraquer, 1965, S. 66; Barraquer, 1967, S. 103).

Als Folge des Gefriervorganges waren histologisch Gewebeschädigungen zu beobachten, zu denen der Untergang von Epithelzellen und von Keratozyten, sowie die Ausbildung eines stromalen Ödems zählten. In nachfolgenden, Monate beanspruchenden Heilungsvorgängen musste die devitalisierte Matrix des Lentikels wieder von Keratozyten aus dem umgebenden Stroma bevölkert werden (Hoffman & Harnisch, 1981, S. 243; Jakobiec et al., 1981, S. 1251; Binder et al., 1982, S. 101). Entsprechend langwierig war auch die visuelle Rehabilitation (Schanzlin et al., 1983, S. 57; Lee et al., 1985, S. 1210).

Der Gefrierprozess führte darüber hinaus wegen des hohen Wassergehaltes des Hornhautstromas zu einem nur bedingt kalkulierbaren Anschwellen der unbearbeiteten Hornhautscheibe. Ungenauigkeiten bei der refraktiven Bearbeitung auf der Drehbank waren die Folge (Swinger & Wisnicki, 1985, S. 225).

Krumeich und Swinger entwickelten Anfang der 1980er Jahre mit dem so genannten *Barraquer-Krumeich-Swinger-System* (BKS) ein Verfahren, bei dem auf ein Gefrieren des Hornhautscheibchens verzichtet wurde (Krumeich, 1981, S. 1321; Swinger et al., 1986, S. 17; Zavala et al., 1987, S. 1125).

Bei dieser *Non-Freeze*-Technik wurde die herausgeschnittene Hornhautscheibe durch Erzeugung eines Vakuums mit der epithelialen Seite auf einer Fixationsplatte arretiert und mit einem Keratom auf der stromalen Seite geschnitten. Die Fixationsplatte fungierte hierbei als Formgeber, indem die Abtragung von kornealer Substanz je nach Krümmung der verwendeten Platte peripher zur Korrektur einer Hyperopie, oder zentral zur Korrektur einer Myopie erfolgte.

Postoperative Heilungsprozesse sowie die visuelle Rehabilitation ließen sich auf diese Weise deutlich beschleunigen. Außerdem war die Herstellung des Lentikels technisch einfacher und beanspruchte deutlich weniger Zeit als die Drehbanktechnik nach Barraquer (Krumeich, 2000, S. 96).

Dennoch konnte für die *Non-Freeze-Keratomileusis* ebenso wenig wie für die *Freeze-Technik* eine ausreichende Zuverlässigkeit in klinischen Studien demonstriert werden (Swinger & Barraquer, 1981, S. 709; Friedlander et al., 1981, S. 716; Swinger & Barker, 1984, S. 785; Dossi & Bosio, 1987, S. 417). Die Verfahren sind daher nur von historischer Bedeutung.

1.4.3.2 Keratomileusis-in-situ

Ruiz modifizierte die *Keratomileusis* weiter, indem er die korneale Krümmung nicht mehr durch Bearbeitung einer zuvor abgetrennten, oberflächlichen Hornhautscheibe beeinflusste. Stattdessen vollzog er einen weiteren Keratomschnitt am freiliegenden Stromalen Bett, unter Abtragung einer 50-150 µm dünnen Stromalamelle. Die anfangs entfernte Kappe wurde anschließend wieder aufgenäht. In dieser Form wurde der Eingriff als *Keratomileusis in situ* bezeichnet (Bores, 2001a, S. 365).

Hieraus entstand später mit Entwicklung verbesserter, automatischer Keratome die so genannte *automatisierte lamelläre Keratoplastik* (ALK), bei der zu Beginn ein oberflächlicher Flap erzeugt wird. Er besteht aus einer etwa 150 µm dicken Lamelle, die aufgrund der Unvollständigkeit des lamellären Schnittes noch an einer Seite an der Hornhaut befestigt bleibt. Sie wird vor Ausführung des zweiten Keratomschnitts vorübergehend zur Seite, und nach erfolgter Stromaler Abtragung wieder zurück geklappt. Adhäsionskräfte sorgen für eine ausreichende Fixation des Flaps, die eine Naht überflüssig macht.

Zwar waren die späteren *in-situ*-Verfahren, vor allem die ALK, durch den höheren Automatisierungsgrad technisch leichter durchführbar und fanden deshalb eine breitere Anwendung bei der Korrektur von mittel- bis hochgradigen Myopien und Hyperopien (Price et al., 1996, S. 29; Manche & Maloney, 1996, S. 1443; Lyle & Jin, 1996, S. 31; Manche et al., 1996, S. 42). Sie waren jedoch in Ihrer Zuverlässigkeit den sich rasant entwickelnden laserchirurgischen Verfahren wie der LASIK deutlich unterlegen (Arenas-Archila et al., 1991, S. 424; Lyle & Jin, 1998, S. 425) und wurden deshalb verlassen.

1.4.4 Excimerlaser-Verfahren

Obwohl es sich auch bei den im Folgenden beschriebenen Verfahren im eigentlichen Sinne um subtraktive Operationsmethoden handelt, sollen sie aufgrund ihrer dominanten Stellung in der heutigen refraktiven Chirurgie gesondert behandelt werden.

Excimerlaser-Verfahren stellen in Ihrer Gesamtheit die bei weitem am häufigsten durchgeführten refraktiven Operationen zur Korrektur von gering- bis mittelgradigen Fehlsichtigkeiten zwischen +3,0 dpt und -8,0 dpt dar (Duffey & Leaming, 2005, S. 742).

Verglichen mit früheren Verfahren der refraktiven Chirurgie zeichnen sie sich insbesondere durch die vereinfachte technische Handhabung für den Operateur sowie durch die hohe Genauigkeit der erzielten refraktiven Korrekturen aus.

All diesen Verfahren ist gemeinsam, dass eine Krümmungsänderung der Hornhaut mit Hilfe eines Argon-Fluorid-Excimerlasers erreicht wird.

Dieser Laser enthält ein Gasgemisch, in dem Atome des Edelgases Argon und solche des Halogens Fluor vorübergehend eine sehr instabile chemische Bindung zu Argon-Fluorid eingehen. Bei Zerfall dieser *Dimere* entstehen sehr energiereiche Lichtquanten mit einer charakteristischen Wellenlänge von 193 nm, die von Proteinen absorbiert werden (Puliafito et al., 1985, S. 741) und dabei kovalente Bindungen zwischen Kohlenstoffatomen lösen. Von Argon-Fluorid-Photonen getroffen geht korneale Matrix in den gasförmigen Zustand über und verdampft. Durch die sehr geringe Eindringtiefe der Photonen von weniger als 1 μm lässt sich im Rahmen dieser so genannten Photoablation eine fein dosierte Abtragung von kornealer Matrix erzielen (Bende et al., 1988, S. 148).

Den energiereichen Argon-Fluorid-Dimeren („*excited dimers*“), verdankt der Excimer-Laser seinen Namen. Je nach klinischer Anwendung an der Hornhautoberfläche, dem subepithelialen oder intrastromalen Gewebe unterscheidet man verschiedene Verfahren der Excimerlaser-Chirurgie.

1.4.4.1 Photorefraktive Keratektomie

Die *Photorefraktive Keratektomie* (PRK) ist das älteste unter den Excimerlaser-Verfahren (Munnerlyn et al., 1988, S. 46; Marshall et al., 1988, S. 1411; McDonald et al., 1989, S. 641).

Nach anfänglicher, mechanischer Entfernung des Hornhautepithels werden oberflächlich Bowman-Membran und stromale Hornhautmatrix durch den Excimerlaser abgetragen. Im Anschluss bedarf es einiger Tage, bis das Epithel vom Rand her den zentralen Defekt wieder vollständig überwächst und bedeckt. Eine ähnliche Zeitspanne vergeht auch bis zur Wiederherstellung eines brauchbaren Sehvermögens.

1.4.4.2 Laser-in-situ-Keratomileusis

Die Laser-in-situ-Keratomileusis (LASIK) ist aus der klassischen Keratomileusis und ihren Weiterentwicklungen, wie der ALK, hervorgegangen. Pallikaris und Burrato gelten als Vorreiter ihrer Entwicklung (Pallikaris et al., 1990, S. 463; Buratto et al., 1992, S. 291). Sie stellt heutzutage die am häufigsten in den USA und in Europa durchgeführte refraktive Operationsmethode dar (Duffey & Leaming, 2005, S. 742).

Mithilfe eines Keratoms wird zunächst eine oberflächliche, als *Flap* bezeichnete Stroma-Lamelle mit einer Dicke von 120 bis 180 μm geschnitten, wobei an einer Seite eine Gewebsbrücke stehen gelassen wird. Diese wird zur Seite geklappt. Daraufhin erfolgt ein Abtrag von Hornhautgewebe aus dem stromalen Bett durch den Excimerlaser. Bei rein sphärischen Ametropien erfolgt ein sphärisch symmetrischer Abtrag, bei Astigmatismus wird ein torisches Profil abgetragen.

Der Flap wird anschließend zurückgeklappt. Er ist schon nach wenigen Minuten ausreichend fixiert, ohne dass eine Naht erforderlich wird. Die Epitheldecke schließt sich nach kurzer Zeit wieder über der Schnittkante des Keratoms. Die Haftung des wieder angelegten Flaps auf dem stromalen Bett ist zunächst beschränkt auf Adhäsionskräfte, die maßgeblich durch die

Wirkung der kornealen Endothel-Pumpe zustande kommen (Bissen-Miyajima et al., 2004, S. 1989). Später bilden sich durch inkomplette Wundheilungsvorgänge zusätzlich schwache Narbenstrukturen, die in der zentralen Zone eher hypozellulär, im Randbereich des Flaps dagegen hyperzellulär und fibrotisch sind, und eine eingeschränkte mechanische Widerstandskraft besitzen (Schmack et al., 2005, S. 433).

1.4.4.3 Epi-LASIK

Auch die Epi-LASIK wurde erstmals von Pallikaris beschrieben (Pallikaris et al., 2003, S. 207). Wie bei der LASIK wird zunächst mit einem Keratom ein Flap erzeugt. Aufgrund seiner sehr viel stumpferen, oszillierenden Klinge dringt das hierfür entwickelte Epikeratom allerdings nicht in das korneale Stroma ein, sondern erzeugt einen Schnitt im Niveau der epithelialen Basal-membran (Herrmann et al., 2008, S. 1761).

Die Ablation der kornealen Matrix durch den Excimerlaser erfolgt wie bei der PRK subepithelial, ebenfalls unter Abtrag des zentralen Anteils der Bowman-Membran. Der epitheliale Flap wird anschließend wieder im stromalen Bett ausgebreitet.

1.4.4.4 Laserepitheliale Keratomileusis (LASEK)

Die LASEK zählt, wie die Epi-LASIK und die PRK, zu den oberflächlichen Ablationsverfahren (Lohmann et al., 2002, S. 26; Camellin, 2003, S. 666).

Anders als bei der Epi-LASIK wird bei der LASEK auf die Verwendung eines Keratoms verzichtet. Stattdessen wird das Epithel mit einem Mikrotrepan zunächst kreisförmig etwa 60 µm tief inzidiert. Die Trepanation erfolgt in einem Bereich von 280°. Die verbleibenden 80° werden nicht inzidiert und bleiben ähnlich wie bei der LASIK als Scharnier (*hinge*) übrig.

Nach lokaler Applikation einer 20%igen Alkohollösung lässt sich ein epithelialer Flap abheben und zur Seite klappen. Nach Abtragung von Bowman und Hornhautstroma mit dem Excimerlaser, wird der Epithel-Flap wieder im Stromabett reponiert.

1.4.5 Additive Hornhautchirurgie

Bei den *additiven* Hornhautchirurgie wird die Brechkraft der Optik dadurch verändert, dass ein zusätzliches Linsenelement in die Kornea eingebracht wird. Dieses so genannte *Lentikel* kann entweder nach Durchführung eines oberflächenparallelen, lamellierenden Schnittes *intrastromal* oder *epistromal* (d.h. subepithelial) positioniert werden.

1.4.5.1 Keratophakie

Das historische Verfahren der *Keratophakie* geht wie die klassische Keratomileusis (vgl. Kap. 1.4.3.1) auf José I. Barraquer zurück (Barraquer, 1966, S. 53; Barraquer, 1972, S. 499).

Mit Hilfe eines Keratoms wurde hier zunächst eine oberflächliche Hornhautlamelle entfernt. Im Anschluß wurde ein homoplastisches Lentikel auf dem freiliegenden Stroma der Wirtshornhaut platziert und die vorher abgetrennte oberflächliche Lamelle wieder darüber mit Nähten fixiert. Das Implantat lag somit intrastromal und war vollständig von Wirtshornhaut umschlossen. Vor der Implantation erfolgte die Bearbeitung des gefrorenen Spenderlentikels wie bei der klassischen Keratomileusis auf einer Drehbank (Friedlander et al., 1980, S. 687). Indem das Spenderlentikel abweichend von der Keratomileusis auf der epithelialen Seite geschliffen wurde, sollte der Epithelzellenverband des Spenderlentikels vollständig entfernt und ein späteres intrastromales Wachstum desselben ausgeschlossen werden.

Die Keratophakie wurde zur Korrektur hochgradiger Hyperopien, insbesondere zur Anwendung an aphaken Augen entwickelt. Aufgrund des hohen Schwierigkeitsgrades des Eingriffes, der Monate beanspruchenden visuellen Rehabilitation (vgl. Gefrierschäden, Kap. 1.4.3.1) (Friedlander et al., 1983, S. 365), sowie der geringeren Zuverlässigkeit gegenüber den Verfahren der intraokularen Linsenchirurgie (Swinger et al., 1987, S. 202) konnte sich die homoplastische Keratophakie nicht durchsetzen (Azar, 1979, S. 211; Taylor et al., 1981, S. 1141).

1.4.5.2 Epikeratophakie

Die *Epikeratophakie* beruht auf einem Konzept von Kaufman und Werblin (Kaufman, 1980, S. 1; Werblin & Kaufman, 1981, S. 131; Werblin et al., 1981, S. 1957; Werblin & Klyce, 1981, S. 123). Ein homoplastisches Hornhaut-Lentikel wurde nach Abrasio des Epithels – einer biologischen Kontaktlinse gleich – oberflächlich auf der Bowman-Membran platziert und fixiert. Als Lentikel diente ein Scheibchen, welches aus Spenderhornhaut gewonnen und auf der Drehbank in gefrorenem Zustand den refraktiven Erfordernissen entsprechend zugeschliffen wurde. Im Unterschied zur Keratophakie wurde der Spenderlentikel aber nicht individuell für jeden einzelnen Patienten vorbereitet, sondern von der Firma AMO (damals *Allergan Medical Optics*, Irvine, CA) in bestimmten Dioptrienstärken industriell gefertigt.

Die Operation setzte sich aus den folgenden Schritten zusammen: Nach Abtragung des Epithels wurde zunächst mit einem Trepan eine 360°-Keratotomie im vorderen Stroma angelegt. Durch zirkuläre Unterminierung des Stromas vom Einschnitt nach peripher wurde eine ringförmige Tasche gebildet. In diese wurde der Rand des Lentikels geschoben. Letzteres wurde schließlich mit Nähten fixiert.

Postoperative Probleme bestanden insbesondere in der Induktion von Astigmatismus und der langsamen Re-Epithelialisierung der Spenderhornhaut. Letztere wurde unter anderem durch die trepanationsbedingte Stufe verursacht, welche vom Epithel am Übergang von der Empfängerhornhaut auf das Spenderlenticel überwunden werden musste. Die Operationstechnik konnte mit der Zeit verfeinert werden (McDonald et al., 1983, S. 668; McDonald et al., 1985, S. 1417), etwa durch Verwendung fortlaufender Nähte und eine modifizierte, abgeschrägte Trepanationstechnik.

Um die Traumatisierung des gefrorenen Gewebes bei der Bearbeitung des Spenderlenticels zu reduzieren, entwickelten Krumeich und Swinger mit der so genannten *Lebend-Epikeratophakie* eine *Non-Freeze*-Methode. Die vorübergehende Devitalisierung des Lenticelstromas durch kältebedingten Untergang von Spender-Keratozyten, welche eine langsame postoperative Wiederbesiedlung des Epilenticels mit Empfänger-Keratozyten nach sich zieht (Baumgartner & Binder, 1985, S. 1606; Binder et al., 1985, S. 1357; Yoon et al., 1998, S. 180), konnte somit vermieden werden. Die Dauer bis zur Wiedererlangung eines zufrieden stellenden Sehvermögens ließ sich auf diese Weise verkürzen (Krumeich & Swinger, 1987, S. 397; Zavala et al., 1987, S. 1125; Krumeich & Knuelle, 1990, S. 20).

Von der geringen Invasivität der Epikeratophakie, bei der die Bowman-Membran und das korneale Stroma unangetastet bleiben, versprach man sich eine Reversibilität des Verfahrens. Diese Hoffnung wurde von einigen Autoren klinisch bestätigt (Greenbaum et al., 2007, S. 1210). Andere beobachteten hingegen nach der operativen Entfernung von Lenticeln persistierende stromale Narben in der Empfänger-Hornhaut (Goodman et al., 1989, S. 295) und Änderungen der kornealen Krümmung, die unter anderem auf die oberflächliche Trepanation zu Beginn des Eingriffes zurückgeführt wurden (Gilbert et al., 1990, S. 113).

Die Epikeratophakie diente zunächst der Korrektur von hohen (insbesondere einseitigen) Hyperopien sowie zur Aphakiekorrektur nach Kataraktoperationen (Morgan et al., 1984, S. 780; Morgan et al., 1986, S. 423; Kelley et al., 1986, S. 680; Morgan et al., 1988, S. 526). Der Anwendungsbereich wurde später auf die Korrektur von Myopien ausgeweitet. (McDonald et al., 1987b, S. 375; Schlichtemeier, 1987, S. 84).

Korrekturen mit *Freeze*- und *Non-Freeze*-Epikeratophakien erwiesen sich, sowohl bei Hyperopien als auch bei Myopien, alles in allem als ungenau (Buratto & Ferrari, 1989, S. 94). Ausgeprägte Über- und Unterkorrekturen wurden häufig beobachtet. Zudem unterlagen die anfänglich erzielten Refraktionsänderungen, vor allem bei der myopen Epikeratophakie, im zeitlichen Verlauf einer deutlichen Regression (Woodhams, 1987, S. 343; Grabner, 1991, S. 4). Es konnte gezeigt werden, dass die Ungenauigkeit und die Instabilität der Korrekturen neben der technischen Schwierigkeit bei der Herstellung der Spender-Lenticel auf postoperative Umbauvorgänge zurückzuführen waren. Stoffwechselaktive Keratozyten synthetisierten neue Kollagenfasern (Katakami et al., 1991, S. 1837). Dieses so genannte *Remodeling* änderte die Lenticelform und damit seine optischen Eigenschaften.

Die Epikeratophakie wurde wegen ihrer eingeschränkten Zuverlässigkeit weitgehend verlassen. Als therapeutische Option bei Aphakie hat sie nur eine untergeordnete Bedeutung erlangt. Die Verfahren der intraokularen Linsen Chirurgie haben sich hier als deutlich genauer und vorhersagbarer erwiesen (Holladay et al., 1986, S. 539; Baikoff & Joly, 1990, S. 252). Vor diesem Hintergrund war die zeitlich und technisch viel aufwändigere Operationstechnik nicht zu rechtfertigen.

1.4.5.3 Korneale Inlays (alloplastische Keratophakie)

Die geschilderten Schwierigkeiten der refraktiven Chirurgie mit menschlichem Spendermaterial haben schon früh zur Suche nach Alternativen mit alloplastischem Material geführt. Zunächst wurde in Anlehnung an die Keratophakie in den 1960er Jahren an der Entwicklung synthetischer, intrastromaler Implantate, so genannter *Inlays*, gearbeitet.

Auch wenn es sich hierbei bis heute um einen weitgehend experimentellen Ansatz handelt, so ist das Interesse an der Entwicklung derartiger Implantate ungebrochen.

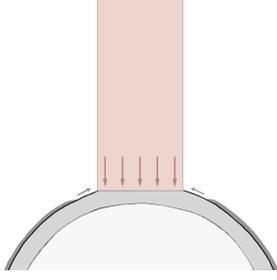
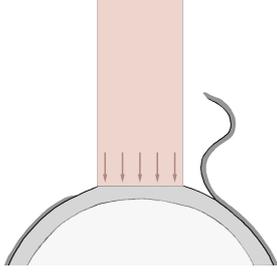
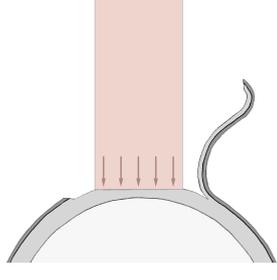
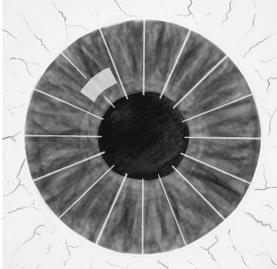
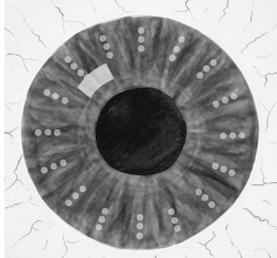
Inhalt der Forschung war neben der Suche nach geeigneten Materialien auch die Frage der am besten geeigneten Position eines Inlays im kornealen Gefüge. Hier konnten die besten Ergebnisse erzielt werden bei Implantation des Inlays zwischen dem vorderen und mittleren Drittel im Bezug auf die Gesamtdicke der Hornhaut. Dies zeigten Versuche McCareys an Affenhornhäuten mit postoperativen Beobachtungszeiträumen von bis zu 3 Jahren (McCarey et al., 1990, S. 1310). Bei Implantation in tiefere Stromaschichten wurden deutliche Regressionen bis hin zu Protrusionen der hinteren Hornhautlamelle in Richtung der Vorderkammer beobachtet (Parks & McCarey, 1991, S. 216).

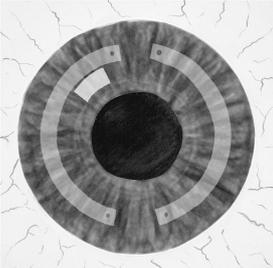
Auch für das Konzept der Epikeratophakie werden gegenwärtig synthetische Materialien auf Ihre Eignung als Alternative zu humanen Spenderlentikeln hin untersucht. Da die Entwicklung einer *alloplastischen* Variante der Epikeratophakie jedoch Gegenstand dieser Arbeit ist, soll hierüber in einem gesonderten Kapitel berichtet werden (vgl. Kap. 1.5). Auf die Anforderung an synthetische Implantate und den aktuellen Stand ihrer Entwicklung soll im Rahmen der Diskussion (vgl. Kap. 4.2) ausführlich eingegangen werden.

1.4.6 Aktuelle refraktive Verfahren und ihre Anwendungsgebiete

Die folgende Tabelle 1-1 gibt eine zusammenfassende Übersicht über die aktuellen Verfahren der refraktiven Chirurgie und ihre jeweiligen Anwendungsbereiche, gemäß den Richtlinien der Kommission Refraktive Chirurgie (KRC) der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte (Stand Mai 2007).

Tab. 1-1: Aktuelle Verfahren der refraktiven Chirurgie

Operatives Verfahren	Darstellung	Anwendungs-/Grenzbereich
PRK		<p>Anwendungsbereich: Myopiekorrektur: bis -6 dpt Astigmatismus: bis 5 dpt</p> <p>Grenzbereich: Myopiekorrektur: bis -8 dpt Astigmatismus: bis -6 dpt Hyperopie: bis +4 dpt</p>
Epi-LASIK / LASEK		<p>Anwendungsbereich: Myopiekorrektur: bis -6 dpt Astigmatismus: bis 5 dpt</p> <p>Grenzbereich: Myopiekorrektur: bis -8 dpt Astigmatismus: bis -6 dpt Hyperopie: bis +4 dpt</p>
LASIK		<p>Anwendungsbereich: Myopiekorrektur: bis -8 dpt Astigmatismus: bis 5 dpt Hyperopie: bis +3 dpt</p> <p>Grenzbereich: Myopiekorrektur: bis -10 dpt Astigmatismus: bis 6 dpt Hyperopie: bis +4 dpt</p>
Radiäre Keratotomie (RK)		<p>Anwendungsgebiet: Keine Angabe v. Seiten d. KRC</p>
Konduktive Keratoplastik (CK)		<p>Anwendungsbereich: Hyperopien bis +1,5 dpt</p> <p>Grenzbereich: Hyperopien bis +2,5 dpt</p>

Intrakorneale Ringsegmente (Intacs)		<p>Anwendungsbereich: Stabilisierung der HH bei Keratokonus, Keratektasie</p> <p>Grenzbereich: Korrektur der niedrigen Myopie (in Ausnahmefällen)</p>
Clear Lens Extraction		<p>Anwendungsbereich: Myopie und Hyperopie bei gleichzeitig bestehender Presbyopie</p> <p>Grenzbereich: Alleinige Presbyopie</p>
Phake IOL (z.B. Iris-Klammerlinse)		<p>Anwendungsbereich: Myopie ab -8 dpt Hyperopie ab +4 dpt</p> <p>Grenzbereich: Myopie ab -5 dpt Hyperopie ab +3 dpt</p>

1.5 Korneale Onlays (alloplastische Epikeratophakie)

1.5.1 Ein neues Konzept

Die Implantation *kornealer Onlays* ist ein neues, derzeit noch experimentelles refraktives Operationskonzept, mit dem sich die vorliegende Arbeit speziell beschäftigt. Es handelt sich hierbei um einen *additiven* Ansatz, bei dem ein *synthetisches* Lentikel, das *Onlay*, zwischen Epithel und Bowman-Membran in die Hornhaut eingebracht wird. Hierdurch ändert sich die Krümmung der Hornhautoberfläche und damit ihre Brechkraft. Auf ein Lamellieren des Stroma und auf eine Abtragung von kornealer Substanz kann verzichtet werden.

Das Verfahren ist eine Weiterentwicklung der Epikeratophakie, wobei das Onlay nicht aus menschlicher Spenderhornhaut sondern aus einem synthetischen Material besteht. In Anlehnung an die gängige Nomenklatur der refraktiven Hornhautchirurgie soll der neue Ansatz daher nachfolgend als *alloplastische Epikeratophakie* bezeichnet werden.

Das Operationskonzept zeichnet sich durch eine geringe Invasivität aus. Das regenerationsfähige Epithel und seine basalen Anheftungskomplexe sind die einzigen Strukturen, die methodisch bedingt, während der Operation in einem gewissen Umfang geschädigt werden. Die tieferen kornealen Anteile, die Bowman-Membran und das Hornhautstroma, bleiben hingegen unangetastet.

1.5.2 Verzicht auf korneales Spendermaterial

Die refraktive Genauigkeit der klassischen Epikeratophakie war unbefriedigend. Dies lag zum Großteil an den Schwierigkeiten bei der Herstellung und Verwendung homoplastischer Lentikel. Gleiches galt für die historischen Verfahren der (autologen) *Keratomileusis* und der (homologen) *Keratophakie*.

Die Herstellung von Lentikeln aus menschlicher Hornhaut hatte sich als technisch schwierig erwiesen. Dies galt gleichermaßen für die *Freeze*- und *Non-Freeze*-Techniken (vgl. Kap. 1.4.3.1 und 1.4.5.2). Verschiedene Fertigungsfaktoren trugen zur Ungenauigkeit der Korrektur bei. Bei den *Freeze*-Verfahren war dies das schlecht vorhersehbare Ausmaß der Schwellung des Spendermaterials vor dem Schneiden des Lentikels. Die mangelnde Schnittpräzision bewirkte bei *Freeze*- und *Non-Freeze*-Techniken häufig einen irregulären Astigmatismus.

Grundsätzlich ließe sich die Herstellung homoplastischer Lentikel verbessern. Verwendet man statt Drehbank bzw. Keratom einen Excimerlaser, können aus nativem, ungefrorenem Spendermaterial präzisere, reproduzierbare Donorlentikel hergestellt werden (Altmann et al., 1991, S. 377; Biowski et al., 2000, S. 23; Homolka et al., 1999, S. 1169). Dennoch bleiben auch solche homoplastischen Epilentikel, die zum Zeitpunkt der Implantation über die gewünschte Krümmung und Dicke verfügen, dauerhaft anfällig gegenüber der Wirkung von Proteasen, die von stoffwechselaktiven Keratozyten bzw. Keratoblasten der Empfängerhornhaut synthetisiert werden. Eine dauerhafte Biostabilität, die die Voraussetzung für Formkonstanz und gleich bleibende refraktive Eigenschaften ist, kann daher nicht sicher gewährleistet werden.

Auch praktische Erwägungen stehen der Fertigung von homoplastischen Epilentikeln im Wege. Spender-Hornhäute sind grundsätzlich nur begrenzt verfügbar. Für die Verfahren der refraktiven Hornhautchirurgie gilt dies aufgrund ihres elektiven Charakters in noch stärkerem Maße als für dringende, therapeutische Indikationen perforierender oder lamellierender Hornhautverpflanzungen. Davon abgesehen besteht auch ein Problem in der kommerziellen Nutzung von menschlichem Spendermaterial. Die Herstellung von homoplastischen Epilentikeln wurde nicht zuletzt deshalb verlassen, weil ein „Handel mit Leichenteilen“ aus ethischen Gründen nicht zulässig und mit der lediglich erzielbaren Unkostenerstattung ein wirtschaftlicher Nutzen für den Hersteller, in diesem Fall für die Firma AMO, nicht erzielbar war.

Nicht zuletzt birgt die Verwendung von homoplastischem Spendermaterial auch immer ein gewisses – wenn auch geringes – Risiko für die Übertragung von Infektionserregern. In diesem Zusammenhang ist in neuerer Zeit etwa das Risiko diskutiert worden, auf dem Wege der

Hornhauttransplantation Prion-Erkrankungen zu übertragen (Hogan et al., 1999, S. 2; Maddox et al., 2008, S. 851).

Trotz dieser Nachteile hatte die Epikeratophakie aber auch die unschätzbaren Vorteile der geringen Invasivität und der Reversibilität. Daher besteht die Hoffnung, dass sich durch Verwendung von Onlays aus geeigneten synthetischen oder biosynthetischen Materialien die Probleme des menschlichen Spendermaterials überwinden und die Vorteile der Epikeratophakie mit besseren und präziseren Ergebnissen nutzen lassen könnten.

1.6 Positionierung und Befestigung kornealer Onlays

1.6.1 Bisherige Konzepte zur Befestigung

Bei der Entwicklung eines Verfahrens zur Implantation kornealer Onlays stellt die dauerhafte, zentrierte Befestigung des Lentikels oberhalb der Bowman-Membran eine besondere Herausforderung dar. Sie ist Grundvoraussetzung für den Erfolg der Operationstechnik. Grundsätzlich sind verschiedene Ansätze denkbar, um das Ziel einer stabilen und dennoch reversiblen Fixierung zu erreichen.

Die Befestigung eines Onlays könnte zum Beispiel durch Nähte vermittelt werden. Die meisten synthetischen Materialien, aus denen korneale Onlays gefertigt werden können, lassen keine ausreichende Festigkeit gegenüber Nadel und Nahtmaterial erkennen (Thompson & Daniel, 1997, S. 2233). Selbst bei höherer Reißfestigkeit besteht die Gefahr, dass durch zirkulär ungleichmäßige Verteilung der Nahtspannung ein Astigmatismus induziert wird (van Rij & Waring, 1984, S. 773). Ein Verzicht auf Nähte erscheint daher vorteilhaft.

Albinet (1990, S. 109) beschrieb ein der klassischen Epikeratophakie nach Werblin und Kaufman ähnelndes Verfahren, das auf Nähte verzichtet. Er erzeugte eine zirkuläre Keratotomie mit einem Trepan, unterminierte von hier aus nach peripher mit einem Skalpell und platzierte den Rand eines synthetischen Lentikels in dieser Tasche.

Bei diesem Vorgehen werden Bowman-Membran und Stroma in der mittleren Peripherie der Hornhaut durch Trepan und Skalpell traumatisiert. Das Einschneiden in das Stroma selbst, sowie auch die resultierenden Wundheilungsvorgänge, können die Krümmung der Hornhaut und damit das refraktive Ergebnis in kaum kalkulierbarer Weise beeinflussen (vgl. Kap. 4.3.1). Dieses Vorgehen kann die Hornhaut dauerhaft deformieren, was das refraktive Ergebnis unsicher macht und der Idee einer vollständig reversiblen Operation widerspricht.

Eine andere Möglichkeit, korneale Onlays zu fixieren, besteht in der Verwendung von biologischen oder synthetischen Klebstoffen. Entscheidend dabei ist, dass solche Klebstoffe transparent sein, und, wie das Onlay selbst, einen ausreichenden Nährstofftransport zum Epithel hin ermöglichen müssen. Sie müssen eine ausreichende Fixierung des Onlays auf der Bowman-Membran gewährleisten. Dies gilt vor allem so lange, wie das Onlay noch nicht vom Epithel der Wirtshornhaut überwachsen worden ist. Gleichzeitig darf die Adhäsion des

Lentikels nicht zu fest sein, um eine spätere Entfernung zu ermöglichen und damit die Reversibilität des refraktiven Eingriffes sicherzustellen.

Verschiedene Klebstoffe sind auf ihre Eignung bei der Fixierung kornealer Epikeratophakie-Lentikel untersucht worden (Robin et al., 1988, S: 973; Brittain et al., 1989, S. 56; Rostron, 1990, S. 384; Rostron et al., 1988, S. 1103) und konnten teilweise im experimentellen Rahmen eine zufriedenstellende Adhäsion vermitteln. Hierzu zählen unter anderem Fibrin-Kleber, die zuletzt auch erfolgreich als Nahtersatz bei vorderen lamellären Hornhauttransplantationen eingesetzt worden sind (Kaufman et al., 2003, S. 2168; Ibrahim-Elzembely et al., 2003, S. 735; Kang et al., 2005, S. 1208; Duarte & Kim, 2007, S. 1127). Als besondere Hürde hat sich die Re-Epithelialisierung geklebter Lentikel erwiesen. Diese bleibt häufig aus, möglicherweise bedingt durch eine epitheltoxische Wirkung der Klebstoffe oder durch mangelnde Fixierung der Lentikelränder auf der Unterlage (Thompson & Daniel, 1997, S. 2233).

1.6.2 Herstellung einer subepithelialen Tasche

Die zuvor beschriebenen Ansätze zur Positionierung und Fixierung kornealer Onlays gleichen sich darin, dass jeweils vor dem eigentlichen Implantationsvorgang das Hornhautepithel abgetragen wird. Dies ist als unvorteilhaft anzusehen, da das korneale Epithel später - nach erfolgter Re-Epithelialisierung – die Vorderfläche des Onlays als äußere Begrenzung umschließt, und somit selbst zur Fixierung des Implantates beitragen kann.

Aus dieser Überlegung heraus entstand die Idee (Lohmann, pers. Mitt.), das Epithel nicht zu entfernen, sondern stattdessen eine zu einer Seite offene, subepitheliale Tasche zu erzeugen. Über deren schlitzförmige Öffnung ließe sich ein Onlay einführen, das möglichst ohne weitere Fixierungsmaßnahmen dauerhaft stabilen Halt fände.

Die Bowman-Membran würde den Boden der fertigen Tasche bilden. Sie sollte bei Erzeugung der Tasche zur Verhinderung irreversibler, narbiger Umbauvorgänge unversehrt bleiben. Nach außen wäre das implantierte Onlay von einem - bis auf den schlitzförmigen Zugang - geschlossenen Epithelzellverband bedeckt. Die schlitzförmige Öffnung sollte sich aufgrund der epithelialen Regenerationsfähigkeit innerhalb kurzer Zeit schließen.

Sollte zu einem späteren Zeitpunkt ein Bedarf bestehen, das Onlay zu entfernen oder auszutauschen, bestünde die Möglichkeit, das korneale Epithel erst zu abrädieren. Das freiliegende Onlay, das weder mit Nähten noch mit einem Klebstoff zusätzlich fixiert ist, könnte anschließend entfernt werden, ohne Schäden an der stromalen Unterlage zu hinterlassen. Nach erfolgter Reepithelialisierung sollte es möglich sein, erneut eine Tasche zu erzeugen und in diese ein Onlay einzusetzen. Der Eingriff wäre somit reversibel und wiederholbar.

Eine solche subepitheliale Tasche könnte grundsätzlich durch ein *handgehaltenes* lamellierendes Instrument (Spatel, Messer) angelegt werden. Größere Präzision wäre von einem *motorgetriebenen* lamellierenden Keratom zu erwarten.

1.7 Entwicklung eines Keratoms: das Pocket-Delaminator-System

Nach Angaben von Lohmann (pers. Mitt.) sollte daher ein neuartiges Motor-Keratom entwickelt werden. Dieses Keratom hat die Aufgabe, eine unmittelbar über der Bowman-Membran gelegene, subepitheliale, lediglich zu einer Seite offene Tasche zu erzeugen, die nachfolgend Platz und ausreichende Stabilität für die Implantation eines synthetischen Lentikels bietet.

Der Schneidevorgang mit dem Keratom sollte dabei in der folgenden Weise ablaufen: Beim Auftreffen auf die Hornhautoberfläche schneidet die Keratomklinge das Epithel schlitzförmig ein. Die oszillierende Klinge des Keratoms schiebt sich in Höhe der epithelialen Basalmembran *lamellierend*, also oberflächenparallel, vor. Nachdem das zentrale Epithel in einem 8 x 8 mm großen Bereich unterminiert und von seiner Unterlage abgesichert worden ist, gleitet die Keratomklinge wieder zurück und verlässt die Tasche über den schlitzförmigen Zugang.

Ein solches Keratom wurde als *Pocket-Delaminator-System* (PDS) von der Firma Gebauer Medizintechnik (Neuhausen, Deutschland) in Zusammenarbeit mit Lohmann entwickelt. Das PDS besitzt eine Stahlklinge, die wesentlich stumpfer ist als Klingen, die in Mikrokeratomen für die LASIK Verwendung finden. Bei letzteren ist – wie beim Hobel des Schreiners – die Eindringtiefe des Messers durch den fixierten Abstand zwischen einer dem Epithel aufliegenden Fußplatte und der Schnittkante der durch das Stroma gleitenden Klinge definiert.

Das PDS soll hingegen mit seiner Klinge das Epithel von der Bowman-Membran abscheren. Die geringe Schärfe der Klinge soll ein Vordringen in das Kollagenfasergeflecht von Bowman-Membran und Stroma verhindern. Darin ähnelt das PDS den so genannten *Epi-Keratomen*, die bei der Epi-Lasik (vgl. Kap. 1.4.4.3) Verwendung finden.

Die elektrisch gesteuerte Bewegung der PDS-Klinge gegenüber der Hornhaut wird über einen Schneidekopf und einen Saugring vermittelt. Letzterer wird vor dem Eingriff über dem Auge zentriert und unter Erzeugung eines Unterdruckes an demselben fixiert. Entlang schienenartiger Führungselemente an seiner Oberseite gleitet der Schneidekopf des PDS mitsamt der Klinge nachfolgend schlittenartig vor und zurück. Während dieses longitudinalen Vorgehens vollführt die Klinge zusätzlich Oszillationen in transversaler Richtung, was durch ihre bewegliche Aufhängung am Schneidekopf ermöglicht wird. Eine genauere Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise des PDS soll im Kapitel 2.1 folgen.

1.8 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es, das PDS, ein neuartiges Keratom für die refraktive Chirurgie, im präklinischen Modell an enukleierten Schweineaugen sowie an humanen Kadaveraugen einzusetzen, und anschließend das Schnittergebnis mit histologischen und immunhistochemischen Methoden näher zu untersuchen.

Die Versuche sollten Antworten zu der Frage liefern, ob sich mit dem PDS eine subepitheliale Tasche in der Hornhaut erzeugen lässt, welche später der Aufnahme kornealer Onlays dienen kann. Es sollte analysiert werden, in welcher Tiefe der Keratomschnitt in der Hornhaut verläuft, und ob diese Schnitt-Tiefe über die gesamte Verlaufsstrecke hinweg konstant bleibt. Wichtig war hierbei insbesondere die Frage, ob die Keratomklinge die Bowman-Membran durchtrennt, und dadurch das Stroma verletzt wird.

2 Material und Methoden

In dieser Arbeit sollten die Lage und die Qualität von Schnitten eines neuen Keratoms, des *Pocket-Delaminator-Systems* (PDS, Firma Gebauer Medizintechnik GmbH, Neuhausen, Deutschland) untersucht werden. Hierzu wurde das Gerät an zwei präklinischen Modellen, zum einen an enukleierten menschlichen Kadaveraugen, zum anderen an enukleierten Schweine-Augen erprobt. Nach Anwendung des PDS wurden die Hornhäute für die licht- und elektronenmikroskopische Beurteilung aufbereitet.

Um die Aussagekraft der lichtmikroskopischen Untersuchungen bezüglich der exakten Tiefe der Keratomschnitte zu steigern, wurden zusätzlich zur *Hämatoxylin-Eosin-Färbung* (HE) aller Präparate zwei verschiedene immunhistochemische Markierungen an ausgewählten Hornhäuten vorgenommen. Hierbei handelte es sich um eine spezifische Anfärbung der Proteine *Laminin* und *Kollagen-VII*, die zusammen mit weiteren Bausteinen die extrazelluläre Matrix der oberen Hornhautschichten formen. Diese Matrixbestandteile sind in charakteristischer Weise in der Basalmembran (Laminin) beziehungsweise der darunter liegenden Bowman-Membran (Kollagen-VII) verteilt.

Die Lokalisation der Markierungen von Laminin und Kollagen-VII in Relation zum jeweiligen Keratomschnitt sollte dazu genutzt werden, um dessen Lage bzw. dessen Verlauf genauer bestimmen zu können.

2.1 Das Pocket-Delaminator-System - Aufbau und Funktionsweise

Bei dem von der Firma Gebauer Medizintechnik (Neuhausen, Deutschland) in Zusammenarbeit mit Lohmann entwickelten Pocket-Delaminator-System (PDS) handelt sich um ein motorgesteuertes Keratom.

Die Abbildung 2-1 gibt eine Übersicht über seinen technischen Aufbau. Zu den Grundbauteilen zählen ein Gehäuse (A), welches das Antriebsaggregat beherbergt. Mit dem Gehäuse ist der Schneidekopf (B) fest verbunden. Er verfügt über longitudinal angeordnete schienenartige Führungselemente, welche mit der korrespondierenden Führungsbahn eines Saugringes (C) ineinander greifen. Dieser Aufbau ermöglicht in Verbindung mit der Vakuum-vermittelten Fixierung des Saugringes am Bulbus ein Vorwärtsgleiten (Abb. 2-1, Pfeil) und Rückwärtsgleiten des Schneidekopfes in Relation zum Saugring und damit auch zur Hornhautoberfläche.

Eine Aussparung im Schneidekopf (B) nimmt den Klingenhalter (D) auf. Die beiden letztgenannten bilden dabei eine gelenkige Verbindung, die transversal oszillierende Bewegung des Klingenhalters gegenüber dem Schneidekopf erlaubt. Der Keratomschnitt selbst wird von einer Stahlklinge erzeugt, welche mit dem Klingenhalter eine feste Einheit bildet.

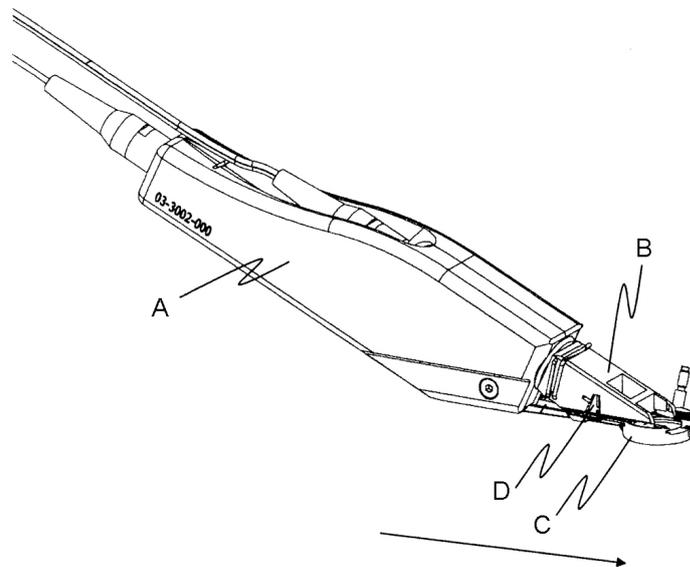


Abb. 2-1: Grundaufbau des PDS (A: Gehäuse, B: Schneidekopf, C: Saugring, D: Klingenhalter, Pfeil: Richtung des Vorschubes)

2.1.1 Gehäuse mit Antriebsaggregat

Das Gehäuse des PDS enthält das Antriebsaggregat, welches sich aus zwei getrennten Motoren zusammensetzt. Einer der Motoren kontrolliert die longitudinale Vorwärtsbewegung der Klinge (Abb. 2-2, E), entsprechend der Richtung des Pfeiles in Abb. 2-1. Er kann demnach als Vorschubmotor bezeichnet werden. Der zweite Motor vermittelt hingegen transverse, oszillierende Bewegungen der Untereinheit aus Klingenhalter (Abb. 2-2, D) und Klinge in Relation zur longitudinalen Achse und soll nachfolgend als Oszillationsmotor bezeichnet werden.

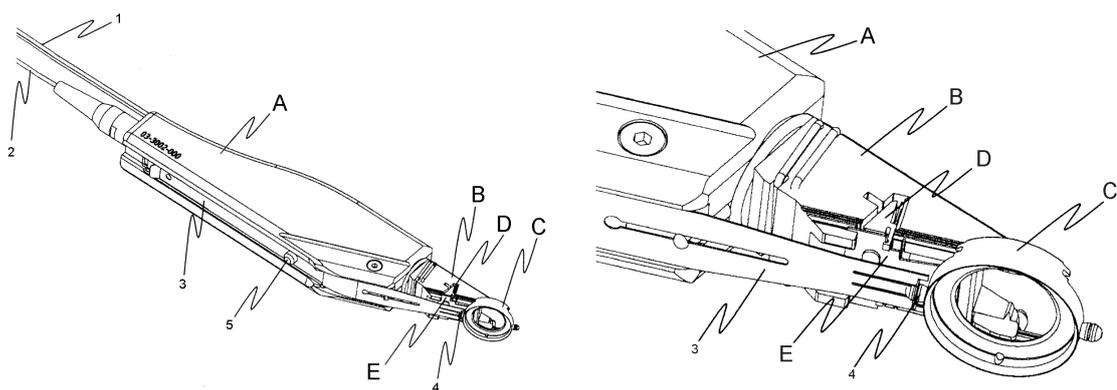


Abb. 2-2: Ansicht des PDS von unten (A: Gehäuse, B: Schneidekopf, C: Saugring, D: Klingenhalter, E: Klinge, 1: Kabel des Oszillationsmotors, 2: Kabel des Vorschubmotors, 3: Metallband, 4: Fixation des Metallbandes am Saugring, 5: Fixation des Metallbandes am Vorschubmotor)

Während des eigentlichen Keratomschnittes, bei dem die Klinge vorgleitet, sind beide Motoren aktiv. Das nachfolgende Zurückgleiten der Klinge in die Primärposition wird allein vom Vorschubmotor geleistet. Beide Motoren verfügen jeweils über ein separates Kabel (1, 2).

An der Unterseite des Gehäuses befindet sich ein Metallband (3), das an den Vorschubmotor gekoppelt (5) und gleichzeitig an seinem distalen Ende am Saugring (4) fixiert ist. Damit dient es dazu, die Motorarbeit in eine Gleitbewegung der Einheit aus Gehäuse, Schneidekopf, Klingenhalter und Klinge (A, B, D und E) gegenüber dem Saugring (C), beziehungsweise entlang des Saugringes, zu übersetzen.

2.1.2 Schneidekopf

Der aus Metall gefertigte Schneidekopf (Abb. 2-3, B) wird über einen Verschlussmechanismus (6) reversibel am Gehäuse fixiert, wobei diese Befestigung starr und nicht gelenkig ist. An seinen seitlichen Außenwänden nahe der Unterkante besitzt der Schneidekopf längs orientierte, schienenartige Führungselemente (7), die mit korrespondierenden longitudinalen Aussparungen an der Innenseite des Saugringes (8) ineinander greifen. Gemeinsam bilden diese Führungselemente eine Schnittführungsbahn, die eine longitudinale Gleitbewegung des Schneidekopfes gegenüber dem Saugring zulässt, aber gleichzeitig eine transversale oder altitudinale Verkippung verhindern soll.

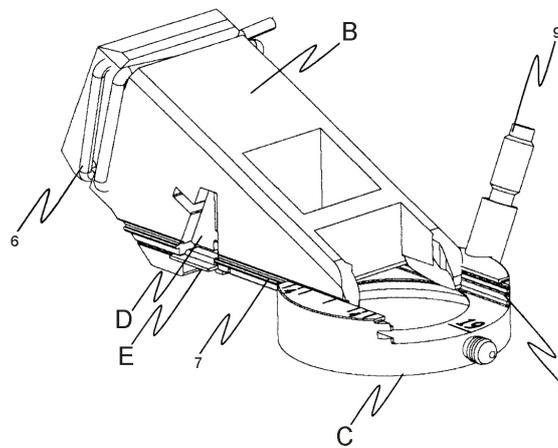


Abb. 2-3: Schneidekopf und Saugring des PDS (B: Schneidekopf, C: Saugring, D: Klingenhalter, E: Klinge, 6: Verschlussmechanismus zur Fixierung am Gehäuse, 7: Führungselemente am Schneidekopf, 8: korrespondierende Führungselemente am Saugring, 9: Vakuum-Konnektor)

Der Schneidekopf weist eine transversale Aussparung (Abb. 2-4, 10) auf, welche der Aufnahme des Klingenhalters (D) dient.

An der der Hornhaut zugewandten Unterseite ist in den Schneidekopf ein Applanator (11) integriert, welcher aus einer horizontal ausgerichteten Platte besteht. Er ist im betriebsbereiten PDS - nach Einrasten des Klingenhalters mit der Klinge am Schneidekopf (Abb. 2-4, rechts) - in einem Abstand von 190 μm von der Schnittkante der Klinge entfernt und ihr gegenüber et-

was nach vorne versetzt. Beim Vorgleiten des Schneidekopfes soll der Applanator somit bereits vor der Keratomklinge auf die Hornhaut treffen, diese über eine Breite von 9 mm gleichmäßig abflachen, und somit die korneale Krümmung im Wirkungsbereich der Keratomklinge egalisieren. Ein konstanter Winkel zwischen Klinge und kornealer Oberfläche soll die Gleichmäßigkeit des Keratomschnittes über dessen gesamte Breite und Länge hin gewährleisten.

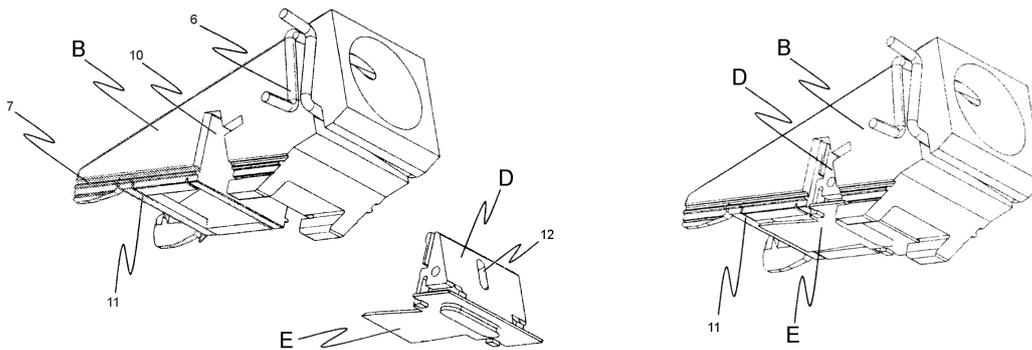


Abb. 2-4: Schneidekopf und Klingenhalter des PDS. *Links* getrennte Darstellung, *rechts* nach Zusammenbau (B: Schneidekopf, D: Klingenhalter, E: Klinge, 6: Verschlußmechanismus, 7: Führungselemente des Schneidekopfes, 10: transversale Aussparung für Klingenhalter, 11: Applanator, 12: Öffnung für Arm des Oszillationsmotors)

2.1.3 Saugring

Der Saugring des PDS (Abb. 2-3, C) besitzt an seiner Unterseite eine Kontaktfläche zur Hornhaut und an der entgegengesetzten Oberseite eine Kontaktfläche zum Schneidekopf, welche aus longitudinal ausgerichteten Führungselementen (8) besteht. Diese fungieren als Führungsbahn für den Schneidekopf. Des weiteren befindet sich am Saugring ein Vakuum-Konnektor (9), über den ein Unterdruck an der Kontaktfläche zur Hornhaut erzeugt werden kann. Hierdurch wird die vorübergehende Fixierung des Keratoms am Bulbus vermittelt.

2.1.4 Klingenhalter

Der aus Kunststoff bestehende Klingenhalter (Abb. 2-4, D) befindet sich nach Zusammenbau des PDS in einer transversalen Aussparung (10) an der Unterseite des Schneidekopfes (B). Eine Öffnung am proximalen Ende des Klingenhalters (12) nimmt einen vom Oszillationsmotor ausgehenden Arm auf, dessen transversale Ausschläge die Motorarbeit in oszillierende transversale Klingebewegungen übersetzen. Aufgrund der Form und der Lage der Kontaktflächen zwischen Schneidekopf und Klingenhalter sowie der Fixierung des Klingenhalters an einem Arm des Oszillationsmotors entsteht ein Schubgelenk mit nur einem Freiheitsgrad, das ausschließlich transversale Bewegungen des Klingenhalters zulässt.

Der für die Herstellung des Klingenhalters verwendete Kunststoff wurde so gewählt, dass nur minimale Reibungskräfte während der Oszillationen am metallischen Schneidekopf wirken. Letzter soll dadurch dauerhaft vor Abnutzung geschützt werden.

Klingenhalter und Klinge bilden eine Einheit, welche separat von den übrigen PDS-Komponenten unter sterilen Bedingungen verpackt werden kann. Nach ihrer Verwendung kann sie entweder verworfen oder alternativ sterilisiert und wiederverwendet werden.

2.1.5 Klinge

An der Unterseite des Klingenhalters ist die Keratomklinge aus rostfreiem Stahl (Abb. 2-4, E) mit ihrem proximalen Ende (Abb. 2-5, 13) fixiert. Ihre Schnittkante (15) befindet sich am distalen Klingenende (14) und weist einen definierten Spitzenradius (r) von 500 nm auf. Dieser Wert entspricht etwa dem Schärfegrad von Epikeratomklingen, die gegenwärtig bei der Epi-LASIK Verwendung finden (vgl. Kap. 1.4.4.3). Im Vergleich mit LASIK-Klingen, die in das korneale Stroma vordringen sollen (vgl. Kap. 1.4.4.2) und hierfür einen Spitzenradius von unter 100 nm besitzen, ist die PDS-Klinge somit allerdings deutlich stumpfer. Zur begrifflichen Abgrenzung von jenen schärferen LASIK-Messern kann im Falle des PDS anstatt von einer Klinge von einem *Separator* gesprochen werden.

Die Breite der PDS-Separator beträgt an der Schnittkante und der angrenzenden 1,5 mm langen distalen Klingenportion 7 mm und verjüngt sich nach proximal hin (16). Allein der distale Klingensegment soll durch Vorgeiten und gleichzeitige transversale Oszillationen mit einem Ausschlag von je knapp 0,5 mm zu beiden Seiten eine subepitheliale, 8 mm breite Tasche in der Hornhaut erzeugen. Der sich proximal anschließende schmalere Klingenteil (16) soll hingegen nicht mit der seitlichen Taschenbegrenzung in Berührung kommen. Die Klinge hat eine Gesamtlänge von 14,5 mm. Verglichen mit Epikeratomklingen ist der PDS-Separator damit einerseits schmaler, andererseits länger dimensioniert.

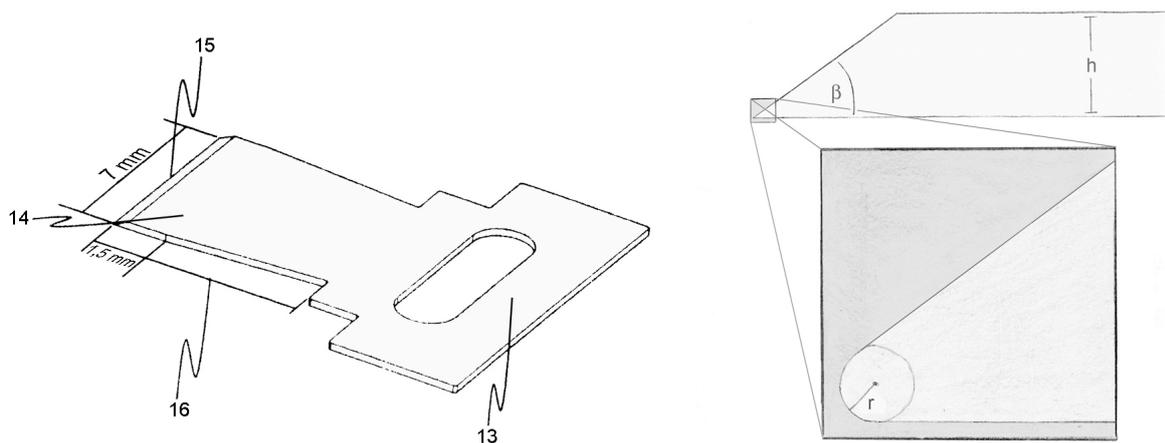


Abb. 2-5: Klinge des PDS. Links Klinge im Überblick, rechts distales Klingenende im Querschnitt (13: proximales Klingenende, 14: distales Klingenende, 15: Schnittkante, 16: Verjüngung der Klinge im mittleren Bereich nach proximal hin, β : Klingewinkel = 36° , h: Klingendicke = 0,254 mm, r: Spitzenradius = 500 nm)

Im Querschnitt betrachtet ist die Klinge des PDS in einem Winkel von 0° in Relation zu ihrer longitudinalen Bewegungsachse orientiert. Sie trifft dadurch in einem maximal spitzen Winkel beziehungsweise in flacher Orientierung auf die Hornhautoberfläche auf. Diese Ausrichtung ist erforderlich, da während des Schneidevorgangs mit dem PDS die delaminierte Epithelschicht auf die Oberseite der vorgeleitenden Klinge aufgeladen wird. Stünde die Klinge in einem stumpferen Winkel zur Hornhautoberfläche, könnte es aufgrund von Scherkräften an der auf die Klinge aufgeladene Epitheldecke zu einem Ausreißen der seitlichen Taschenränder kommen.

2.2 Versuchsmaterial

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 6 enukleierte Schweineaugen sowie 19 enukleierte humane Autopsie-Augen verwendet.

Die humanen Augen wurden über die Augenbank San Diego, USA bezogen. Es handelte sich um Augen, die für eine Hornhauttransplantation gewonnen, aber aufgrund einer unzureichenden Endothelzellichte für eine Transplantation nicht in Betracht kamen. Dies stellte keinen Hinderungsgrund für die Verwendung im Rahmen dieser Arbeit dar.

Die Post-mortem-Zeit der Augen betrug zum Versuchsbeginn zwischen 3,5 und 6 Tagen. Der Transport der Augen erfolgte gekühlt und jeweils einzeln verpackt in einem Feuchtbehälter, jedoch ohne die Verwendung eines Hornhautmediums. Stattdessen waren die Bulbi unmittelbar umhüllt von feuchten Kompressen.

Die verwendeten Schweine-Augen wurden über einen lokalen Schlachthof bezogen. Sie kamen nach einer Post-mortem-Zeit von 4 – 10 Stunden am Tag der Schlachtung in das Labor. Bei der Tötungsmethode der Schweine handelte es sich um eine CO_2 -Intoxikation. Der Transport der Schweineaugen erfolgte gekühlt und gesammelt in einem Kunststoffbehälter.

2.3 Anwendung des PDS

Zur Erzeugung eines physiologischen intraokularen Druckes wurden die für den Keratomschnitt vorgesehenen Bulbi zunächst über eine Punktion im Bereich des Sehnervenstumpfes mit einer Infusion physiologischer Kochsalzlösung tonisiert. Die anschließende Druckmessung erfolgte über die Einstellung einer Wassersäule von 20 cm Höhe, entsprechend einem physiologischen intraokularen Druckwert von ungefähr 14,7 mmHg. Die Augen wurden in eine ringförmige Kunststoffvorrichtung eingesetzt, um sie für das weitere Vorgehen in eine stabile Position zu bringen.

Es folgte eine orientierende Evaluation des *makroskopischen* Zustandes, bei der insbesondere auf eine intakte Epithelschicht geachtet wurde.

Unter lichtmikroskopischer Kontrolle unter dem Operationsmikroskop (Zeiss Universal S3) wurde der Saugring des PDS zentriert auf der Hornhaut positioniert. Durch Erzeugung eines Unterdruckes wurde er im Limbusbereich an der Hornhaut fixiert.

Das PDS wurde am Saugring eingerastet und somit für den Schneidevorgang in Position gebracht. Es führte anschließend unter elektrisch gesteuertem Vorgehen und gleichzeitigen transversalen Oszillationen seiner Stahlklinge den Schnitt aus.

Nach Beendigung des Schneidevorgangs und dem Zurückgleiten der Klinge in die Ausgangsposition wurde der Unterdruck des Saugringes aufgehoben, wodurch sich dieser wieder vom Augapfel löste. Unter dem OP-Mikroskop wurde die Hornhaut auf eine epitheliale Bedeckung beziehungsweise vorhandene Flapanteile hin in Anschein genommen. Nach Entfernung der Infusion konnte das Auge den weiteren Präparationsschritten zugeführt werden.

2.4 Präparation der Hornhäute

Unmittelbar nach der Verwendung des Keratoms wurden die Hornhäute mit einer Schere und einem Skalpell im Limbusbereich aus den Augen vorsichtig herausgetrennt. Hierbei fand die Orientierung des zuvor erfolgten Keratomschnittes besondere Beachtung, indem jeweils am dem Keratomeinschnitt abgewandten Hornhautrand ein breiterer Sklera-Rand belassen wurde. Die auf diese Weise präparierten Hornhäute wurden dann mit einem Skalpell in zwei gleichgroße Hälften zerteilt. Die Schnittrichtung des Skalpells entsprach dabei der Schnittrichtung des Keratoms. Auf diese Weise sollten sich auf beiden Hornhauthälften jeweils ein Anfang und ein Ende der gegebenenfalls vom Keratom erzeugten Tasche befinden.

Eine der Hälften wurde für die Lichtmikroskopie, die andere für die Elektronenmikroskopie weiterverarbeitet (Abb. 2-6).

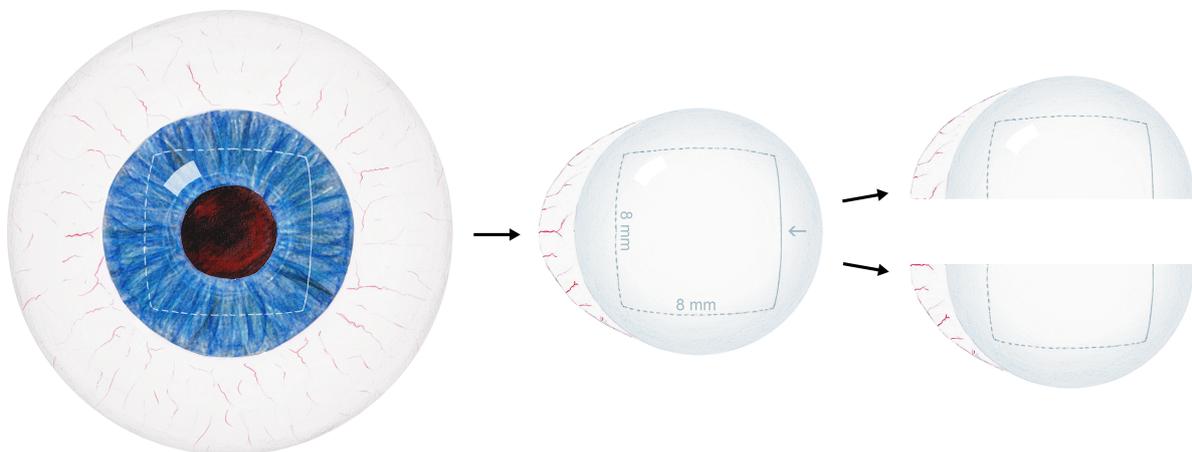


Abb. 2-6: Gewinnung der Hornhautpräparate. Anwendung des PDS, Präparation der Hornhaut mit skleralem Saum auf der Seite des Taschenendes (Taschenöffnung bzw. -eingang rechts im Bild, mit *blauem Pfeil* markiert) und schließlich Halbierung der Hornhäute.

2.5 Aufbereitung der Präparate für die Lichtmikroskopie

2.5.1 Fixierung in Paraformaldehyd

Die für die Lichtmikroskopie vorgesehene Korneahälfte wurde zunächst zur Konservierung und Fixierung in einer frisch hergestellten 4%igen Lösung aus *Paraformaldehyd* eingelegt.

Gelöstes Paraformaldehyd besitzt die Fähigkeit, durch Quervernetzungen Proteine zu fixieren, ohne dabei deren Tertiärstruktur und damit antigene oder auch enzymatische Eigenschaften zu verändern. Gegenüber handelsüblichem *Formol*, einer vorgefertigten 30-40%igen Formaldehyd-Lösung, haben frisch zubereitete Lösungen den Vorteil, dass sie mangels längerer Lagerung nicht die für Formol charakteristischen Paraformaldehyd-Niederschläge aufweisen. Letztere wirken sich durch Ablagerung auf den Präparaten insbesondere bei immunhistochemischen Untersuchungen ungünstig aus.

Lösungen von Paraformaldehyd eignen sich gut für die Fixierung von Präparaten, die über die morphologische Betrachtung hinaus auch für immunhistochemische Untersuchungen verwendet werden sollen.

Die immunhistochemische Eignung des Fixans für die bei der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper und Epitope wurde bereits vor Beginn der Versuche durch Titrationsreihen getestet und bestätigt.

2.5.2 Weiterer Zuschnitt der fixierten Hornhäute

Nach 24-stündigem Verbleib in Paraformaldehyd wurden die Hornhaut-Hälften aus der Fixationslösung entnommen. Sie wurden unter dem Operationsmikroskop (Zeiss Universal S3) durch eine Pinzette fixiert und mit Einweg-Skalpellklingen weiter zugeschnitten. Die Präparation wurde so vorgenommen, dass die Zuschnitte entweder ein Taschenende oder einen seitlichen Taschenrand beinhalteten. Die jeweilige mit dem Mikrotom zu schneidende Kante eines Präparates wurde zur späteren Identifizierung am längsten belassen (Abb. 2-7).



Abb. 2-7: Weiterer Zuschnitt der Hornhäute für die Lichtmikroskopie. Die blauen Pfeile markieren die jeweilige Anschnittfläche des Mikrotoms.

Die geschnittenen Präparate wurden in verschließbare Einbettkassetten (Fa. Carl Roth, Deutschland) überführt, die mit der Nummer des verwendeten Auges und einem Hinweis über die Lokalisation markiert waren (1: Taschenende; 2: seitlicher Taschenrand; siehe Abb. 2-7). Zum Waschen und zur Entfernung des Paraformaldehyds wurden die Kassetten in eine 70%ige Äthanollösung eingebracht.

2.5.3 Einbettung in Paraffin

Um die Einbettung in Paraffin vorzubereiten, folgte eine Entwässerung der Präparate. Sie wurden hierzu in ihren Plastikkassetten einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt, die über mehrere Zwischenschritte in einem Bad der Präparate in 100%igem Äthylalkohol endete.

Zur anschließenden Entfernung des Alkohols wurden die Präparate in 0,1%iges Xylol überführt. Lösungsmittel wie Xylol werden in diesem Zusammenhang als *Intermedien* bezeichnet. Sie besitzen die Fähigkeit, sowohl in Alkohol als auch in Paraffin löslich zu sein. Noch vorhandene Alkohol- oder Wasserrückstände, welche die spätere Schneidbarkeit verschlechtern und die Präparate später schrumpfen lassen, können unter Zuhilfenahme eines Intermediums vor der Einbettung in reinem Paraffin noch in Lösung gebracht und entfernt werden.

Nachdem sich die Präparate zweimal für je 15 Minuten in Xylol befanden, wurden sie zweimal, für 15 beziehungsweise 25 Minuten, in erwärmtes (60°C), reines Paraffin überführt. Damit war die Durchtränkung der Präparate abgeschlossen. Die genannten Schritte vom Beginn der aufsteigenden Alkoholreihe bis zur Durchtränkung in reinem Paraffin erfolgten in einem Einbettungsautomaten.

Auf das Infiltrieren der Präparate mit Paraffin folgte das Ausgießen und Aufblocken. An einem Paraffinspender wurde erst etwas flüssiges Paraffin in die vertiefte Aussparung einer Ausgießform aus Stahlblech gegeben. Die Kunststoffkassetten mit den Präparaten waren zu diesem Zeitpunkt bereits in flüssigem Paraffin gelagert. Die Präparate wurden aus ihren Kunststoffkassetten entnommen und jeweils mit der später vom Mikrotom anzuschneidenden langen Kante nach unten in der Gießform justiert. Mit Hilfe einer Pinzette wurden sie einige Sekunden lang in aufgestellter Position gehalten, um ein Umkippen im anfangs noch flüssigen Paraffin zu verhindern. Der als Spannrähmchen vorgesehene Boden der Plastikkassette wurde an die Gießform gepresst. Letztere wurde soweit mit Paraffin aufgefüllt, dass der durchlöcherichte Boden der Plastikkassette ebenfalls eingetaucht war.

Im Anschluss wurde die Gießform so lange auf einer Kühlplatte (Leica EG 1150 C) gelagert, bis auf der Oberfläche des Paraffins durch Erkalten eine Haut entstand. Danach wurde das Paraffin in Eiswasser ausgehärtet. Nach 15 Minuten ließen sich die Präparate von den Ausgießformen lösen und standen, auf den ehemaligen Kassettenböden aufgeblockt, zum Schneiden bereit.

Tab. 2-1: Fixierung und Einbettung der Präparate

Prozedur	Lösung	Dauer
1. Fixierung und Konservierung	Paraformaldehyd 4%ig	24 Stunden
2. Weiterer Zuschnitt		
3. Waschen	Äthanol 70%ig	Zwischenlagerung für 2 h
4. Entwässerung (in aufsteigender Alkoholreihe)	Äthanol 70%ig Äthanol 96%ig Äthanol 96%ig Äthanol 100%ig Äthanol 100%ig Äthanol 100%ig	Jeweils 12 Minuten
5. Entfernung des Alkohols (im Zwischenmedium)	Xylol 0,1%ig Xylol 0,1%ig	Jeweils 15 Minuten
6. Einbettung	Paraffin bei 60°C Paraffin bei 60°C	15 Minuten 25 Minuten
7. Augießen und Aufblocken		

2.5.4 Schneiden der eingebetteten Präparate

Die in Paraffin eingebetteten Präparate wurden an einem Rotationsmikrotom (Leica Jung RM 2055) geschnitten.

Rotationsmikrotome verfügen über eine feststehende Klinge, entlang derer der Paraffinblock durch Betätigung eines Handrades in vertikaler Ebene auf und ab bewegt wird. Nach jeder Aufwärtsbewegung des Paraffinblockes wird der Messerschlitten, entsprechend der vorher eingestellten Schnittdicke, in Richtung des sich bewegenden Präparates vorgeschoben. Der Schnitt erfolgt während der anschließenden Abwärtsbewegung.

Für die vorliegende Arbeit wurden Schnittdicken von 2 µm sowie von 5 µm gewählt. Bis zum Einspannen am Mikrotom wurden die Präparate auf einer Kühlplatte gelagert. Hierdurch sollte eine Erweichung des Paraffins verhindert werden, die zu einer Stauchung der Präparate während des Mikrotomschnitts führen kann.

Am Mikrotom wurden Bänder von je drei hintereinander hängenden Schnitten erzeugt, die unter Zuhilfenahme einer feinen Pinzette in ein Wasserbad von 35°C überführt wurden.

Im warmen Wasser wurden die Schnitte gestreckt, dann auf Objektträger aufgenommen und auf einer Wärmeplatte (37°C) für 15 Minuten gelagert.

2.5.5 Entparaffinierung

Zur Vorbereitung auf die nachfolgende Färbung beziehungsweise Immunmarkierung, die in hydrophilem Milieu ablaufen, wurden die Präparate in einer frisch zubereiteten Xylol-Lösung (0,1%) entparaffiniert.

In einer in Aqua dest endenden, absteigenden Alkoholreihe wurden Rückstände des Intermediums und darin gelösten Paraffins entfernt.

Für die immunhistochemische Markierung wurde die absteigende Alkoholreihe, abweichend von dem beschriebenen Vorgehen, um einen Schritt ergänzt. Hier wurden die Schnitte nach 70%igem Alkohol für 10 Minuten in eine Mischung aus 70%igem Äthanol und 3%igem Wasserstoffperoxid verbracht und erst danach in Aqua dest überführt.

Zweck dieses Vorgehens war die Blockierung von endogener Peroxidase-Aktivität, da die spätere Immunfärbung unter Verwendung einer exogen zugeführten Peroxidase als Markerenzym erfolgt.

Tab. 2-2: Gewebepvorbereitung zur nachfolgenden Färbung

Prozedur	Lösung	Dauer
1. Deparaffinisieren	Xylol 0,1%ig Xylol 0,1%ig	10 Minuten 10 Minuten
2. Rehydrierung (in absteigender Alkoholreihe)	Äthanol 100%ig Äthanol 100%ig Äthanol 96%ig Äthanol 80%ig Äthanol 70%ig	Jeweils 2 Minuten
<i>Zusätzlich bei Vorbereitung für immunhistochemische Färbungen erforderlich:</i>		
Blockierung der endogenen Peroxidase	Äthanol 70%ig + 3% H ₂ O ₂	10 Minuten
3. Immersion in Aqua dest	Aqua dest	2 Minuten

2.5.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Anfärbung der Präparate wurden Hämatoxylin und Eosin (HE) verwendet. Genauer erfolgten die Anfärbung der Zellkerne mit *Meyers Hämalaun* und die anschließende Gegenfärbung des Zytoplasmas mit Eosin.

2.5.6.1 Grundlagen

Hämalaune sind chromogene Verbindungen, die aus *Hämatein*, einem gelbbraunen Oxidationsprodukt des Naturfarbstoffes *Hämatoxylin*, hergestellt werden. Bei Zugabe Aluminiumhaltiger Salze, so genannter Alaune, in Hämatein-Lösungen werden Aluminium-Ionen frei, die mit dem Hämatein Komplexbindungen eingehen. Reaktionsprodukt ist das zweifach positiv geladene Hämalaun (Abb. 2-8), das aufgrund seiner Ladung eine starke Affinität zu negativen Valenzen der Zellkerne besitzt. Hämalaun bindet bevorzugt an Phosphoratome der nukleären DNS.

Definitionsgemäß handelt es sich bei Farbstoffen wie dem Hämalaun, bei denen die Bindung des farbgebenden Chromogens, hier des Hämateins, an die zu färbende Struktur über komplexgebundene Metallionen vermittelt wird, um *Farblacke*.

Hämalaun hat die Eigenschaft, abhängig vom pH-Wert seine Farbe zu ändern. Hämalaunlösungen werden in saurem Milieu - bei Meyers Hämalaun unter Zusatz von Zitronensäure – verwendet. Das erlaubt eine selektive Anfärbung der Kerne. Die Präparate sind bei Entnahme aus der Farbstofflösung zunächst rotbraun. Während des folgenden Wässerns in fließendem Leitungswasser erhalten die gefärbten Strukturen ihre endgültige dunkelblaue Farbe durch einen Anstieg des pH auf Werte über 3. Beim Farbumschlag nimmt die Wasserlöslichkeit des Hämalauns ab, was zur Fixierung an den Präparaten führt. Zudem entstehen kovalente Bindungen zwischen dem Farbstoff und der DNS.

Anders als beim Hämalaun verhält es sich beim Färbvorgang des Zytoplasmas mit dem synthetischen Anilinfarbstoff Eosin. Eine molekuleigene saure Carboxylgruppe des Farbstoffes bindet direkt an positive Valenzen, wie zum Beispiel an Aminogruppen zytoplasmatischer Proteine (Abb. 2-8). Molekülbestandteile wie diese Carboxylgruppe, durch deren Vorhandensein Farbstoffmoleküle direkt an ihre Substrate binden können, bezeichnet man als *auxochrome Gruppen*.

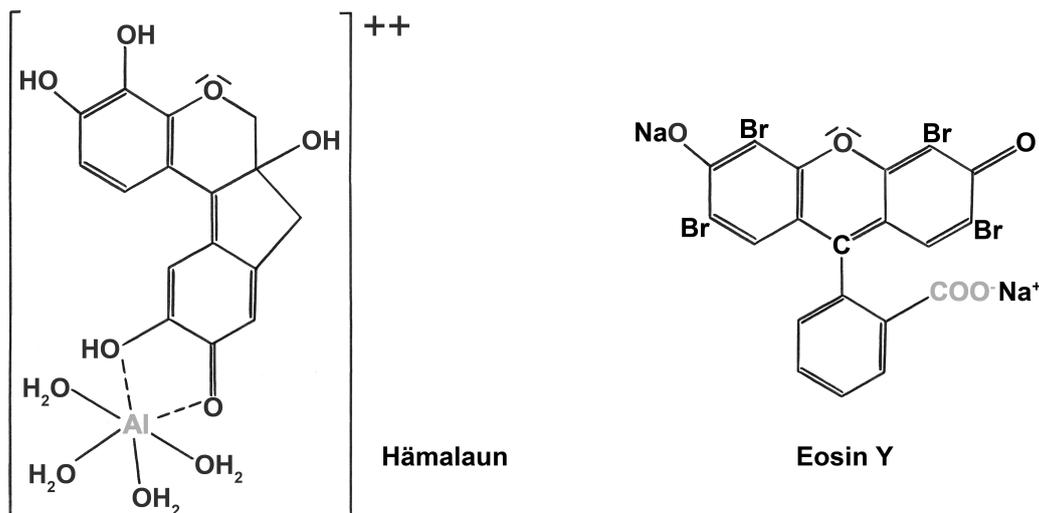


Abb. 2-8: Molekularer Aufbau von Hämalaun und Eosin. Die Gruppen, welche die Bindung an das jeweilige Substrat vermitteln, sind grau dargestellt.

2.5.6.2 Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zuerst erfolgte die Kernfärbung. Hierfür wurden die in Färberechen befindlichen Präparate aus Aqua dest für 5 Minuten in Meyers Hämalaun überführt und danach zur Entfernung überschüssigen Hämalauns und zur Fixierung in fließendem Leitungswasser gewässert.

An eine erneute Immersion in Aqua dest schloss sich die Färbung des Zytoplasmas an. Für 10 Minuten wurden die Präparate in eine 0,1%ige Lösung von Eosin Y, der wasserlöslichen Form des Eosins, gegeben und danach mit Leitungswasser ausgewaschen.

Da das Eindecken der Präparate zum Abschluss in einem wasserunlöslichen Einschlussmedium (Depex, Serva GmbH) erfolgen sollte, wurden die eingefärbten Schnitte erneut über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert.

Nach anschließender Lösung und Beseitigung von Alkoholrückständen in Xylol wurde ein Streifen des noch flüssigen Einschlussmediums auf den Objektträger gebracht und darauf ein Deckglas gelegt. Das Depex verteilte sich gleichmäßig zwischen Objektträger und Deckglas. Verbleibende eingeschlossene Luftbläschen wurden durch gezielten, sanften Druck auf das Deckglaschen mit einem feinen Spatel in die Peripherie gedrängt und beseitigt.

Tab. 2-3: Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Prozedur	Lösung	Dauer
1. Kernfärbung	Meyers Hämalaun	5 Minuten
2. Bläuen	In fließendem Leitungswasser	10 Minuten
3. Immersion in Aqua dest	Aqua dest	2 Minuten
4. Zytoplasmafärbung	Eosin Y 0,1%ig	10 Minuten
5. Dehydrierung (in aufsteigender Alkoholreihe)	Äthanol 70%ig Äthanol 80%ig Äthanol 96%ig	jeweils 2 Minuten
	Äthanol 100%ig Äthanol 100%ig	jeweils 10 Minuten
6. Entfernung des Alkohols (im Intermedium)	Xylol 0,1%ig Xylol 0,1%ig	jeweils 10 Minuten
7. Eindecken	Depex	

2.5.7 Immunhistochemische Färbung

2.5.7.1 Die Streptavidin-Biotin-Methode

Zur immunhistochemischen Markierung der kornealen Matrixproteine *Laminin* und *Kollagen-VII* wurde bei der vorliegenden Arbeit eine immunenzymatische Methode gewählt. Hierbei werden Markerenzyme, wie z.B. die *Peroxidase*, durch Antikörper (AK) indirekt oder direkt an die zu markierende antigene Komponente gekoppelt. Durch eine vom Enzym katalysierte Farbreaktion wird die antigene Komponente später sichtbar gemacht.

Im vorliegenden Fall wurde die *Streptavidin-Biotin-Methode* eingesetzt, die auf der starken Bindungsaffinität des Proteins Streptavidin zum Vitamin Biotin beruht. Streptavidin wird durch das Bakterium *Streptomyces Avidinii* synthetisiert.

Nach Bindung eines spezifischen primären AK an die Antigene Laminin oder Kollagen-VII wird das Präparat mit einem sekundären, biotinylierten Anti-Immunglobulin-AK inkubiert. Er

ist gegen die *unspezifische Domäne* F_c des primären AK gerichtet und bindet bei der Inkubation an diese.

Sodann wird ein Konjugat aus Streptavidin und dem ebenfalls an Biotin gebundenen Markerenzym Peroxidase zugegeben. Die Peroxidase wird somit indirekt an das Antigen gekoppelt. Aufgrund der vier Bindungsstellen des Streptavidins für Biotin einerseits und der mehrfachen Biotinylierung des Markerenzymes andererseits entsteht eine baumartig verzweigte Struktur, in der zahlreiche Enzymmoleküle an einem einzigen Primärantikörper beziehungsweise an einem einzigen gewebegebundenen Antigen anheften können (Abb. 2-9).

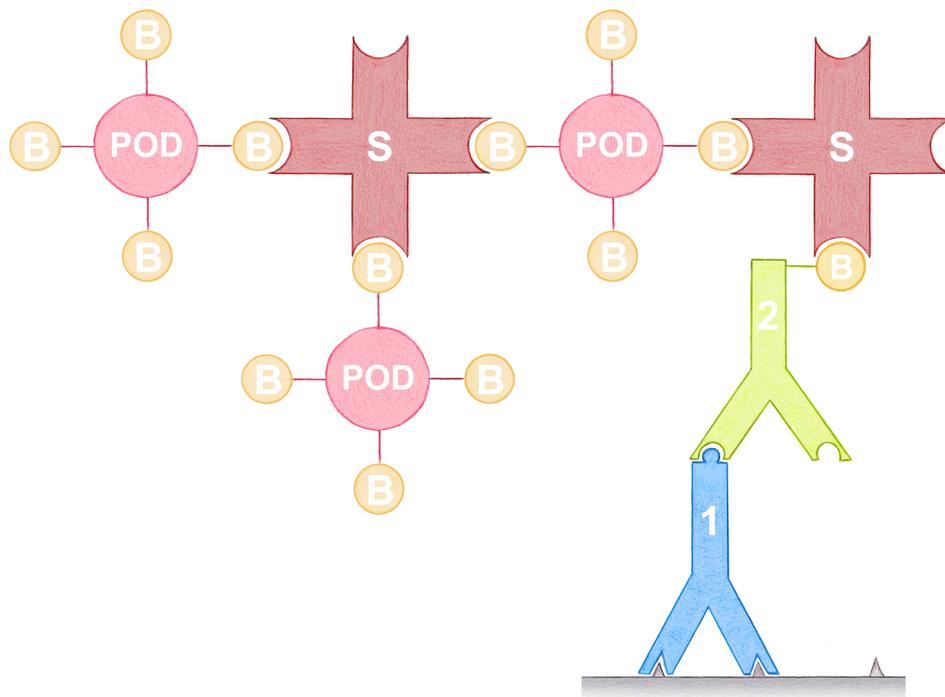
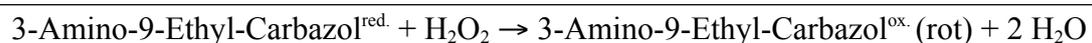


Abb. 2-9: Streptavidin-Biotin-Methode (1: primärer AK; 2: sekundärer AK; S: Streptavidin; POD: Peroxidase; B: Biotingruppen, kovalent gebunden)

Um schließlich die Lokalisation der hier als Markerenzym eingesetzten Peroxidase und damit auch indirekt die des Antigens sichtbar zu machen, eignen sich Substrate wie das *3-Amino-9-Ethyl-Carbazol* (AEC).

Bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid wird AEC in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion zu einem schwer löslichen roten Farbstoff oxidiert:



2.5.7.2 Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Als Positivkontrollen für die Markersubstanzen wurden ein humanes Tonsillenpräparat für Laminin sowie ein humanes Hautpräparat für Kollagen-VII ausgewählt. Sie wurden am Mikrotom geschnitten, auf Objektträger gebracht und dann dem gleichen Färbeprozess unterzogen wie die Hornhautpräparate.

Sämtliche Objektträger wurden in *Coverplates* (Thermo Electron, Shandon Coverplate) gesetzt. Mit Hilfe dieser Vorrichtung können zur Inkubation erforderliche Lösungsmengen minimiert werden. Coverplates gewähren außerdem eine gleichmäßige Verteilung der applizierten Lösung über die Oberfläche des Objektträgers.

Die in absteigender Alkoholreihe rehydrierten, auf Objektträgern befindlichen Schnitte wurden aus destilliertem Wasser entnommen und in eine im Wasserbad angewärmte Lösung von *Proteinase-K* (Proteinase K Code S3004, DakoCytomation) überführt. Diese war zuvor durch Zugabe von 40 µl (entsprechend 1 Tropfen) einer Proteinase-K-Stammlösung in 2 ml einer 0,05 molaren Tris/HCl-Lösung (pH 7,5 – 7,7) zubereitet worden.

In dieser Lösung erfolgte eine *proteolytische Andauung*. Da Antigene wie Laminin und Kollagen-VII während der Fixierung in Paraformaldehyd zu einem gewissen Anteil maskiert werden, soll ihre Reaktivität durch die proteolytische Vorbehandlung erhöht werden. Die antigenen Determinanten werden besser für die Anlagerung von Primärantikörpern zugänglich, ohne dabei geschädigt zu werden. Dieser auch als *Demaskierung* bezeichnete Vorgang wurde durch zweimaliges Spülen mit der 0,01%igen Pufferlösung PBS (Phosphate Buffered Saline) beschlossen.

Zur Verringerung ungewollter, unspezifischer Antikörperbindungen an den Präparaten, die durch Kreuzreaktionen mit anderen Epitopen im Gewebe zustande kommen, wurden die Schnitte vor der Anwendung des primären AK noch mit einem so genannten *Superblock* inkubiert. Dieser war – wie die nachfolgend eingesetzten Lösungen des sekundären Antikörpers, des Peroxidase-Streptavidin-Konjugates und des AEC-Komplexes – Bestandteil des ZytoChem HRP-S-008 AEC Broad Spectrum Kit (ZytoMed GmbH). Er lag in gebrauchsfertiger Konzentration vor.

Um die Inkubation mit dem jeweiligen primären AK vorzubereiten, wurden die im Gefrierschrank gelagerten, konzentrierten AK-Aufbereitungen erst bei Raumtemperatur langsam erwärmt und dann mit einem Diluentpuffer verdünnt (Tab. 2-4), um anwendbare AK-Lösungen in ausreichender Menge zu gewinnen.

Tab. 2-4: Verdünnung der Primärantikörper

Primärantikörper	Gewünschte Verdünnung	Herstellung der Gebrauchslösung
Anti-Laminin AK	1:200	5 µl AK-Stammlösung + 995 µl Diluentpuffer = <u>1000 µl</u>
Anti-Kollagen TypVII AK	1:100	10 µl AK-Stammlösung + 990 µl Diluentpuffer = <u>1000 µl</u>

Bei den Primärantikörpern handelte es sich um einen Anti-Laminin-AK (Monoclonal Anti-Laminin, clone LAM-89, mouse ascites fluid L 8271, Sigma-Aldrich GmbH) sowie einen Anti-Typ-VII-Kollagen-AK (Anti-Collagen VII C 6805, Sigma-Aldrich GmbH). Mit jeweils einer der verdünnten Lösungen von Anti-Kollagen-VII oder Anti-Laminin wurden die Objektträger für 60 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde mit PBS gewaschen, um überschüssige primäre AK vor der Inkubation mit dem sekundären biotinylierten AK zu entfernen.

Nach 20-minütiger Inkubation mit dem sekundären AK wurde wiederum mit PBS gewaschen, woraufhin das Konjugat aus Peroxidase - genauer der Meerrettich-Peroxidase (Horse Radish Peroxidase, HRP) - und Streptavidin appliziert wurde. Die Einwirkzeit belief sich erneut auf 20 Minuten.

An ein zweimaliges Spülen mit PBS schloss sich der eigentliche Färbevorgang mit der Zugabe des AEC-Komplexes an. Es wurde zweimalig für je 5 Minuten inkubiert und der Färbevorgang anschließend mit Leitungswasser gestoppt. Nach Abschluss der Immunmarkierung wurden die Schnitte mit Meyers Hämalaun gegengefärbt und mit Leitungswasser gebläut.

Für das Eindecken der Präparate wurde, anders als bei der HE-Färbung, ein hydrophiles Medium (AquaTex, Merck GmbH) herangezogen. Dadurch konnte eine abschließende Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe vermieden werden, die sich schädigend auf die Antikörperbindungen der Immunmarkierung ausgewirkt hätte. Nach dem Trocknen der Präparate wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet, um ein Ausbleichen durch zwischen Deckglas und Objektträger eintretende Luft zu verhindern.

Tab. 2-5: Ablauf der immunhistochemischen Färbungen

Prozedur	Lösung (*je 80 µl)	Dauer
1. Proteolytische Andauung	Proteinase K *	6 Minuten inkubieren
2. Waschen (in Pufferlösung)	PBS 0,01%ig (phosphate buffered saline)	zweimal 1 Minute
3. Oberflächenbehandlung zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen	Superblock*	5 Minuten inkubieren
4. Primärer Antikörper	Anti-Laminin AK 1:200* oder Anti-Kollagen-VII AK 1:100*	60 Minuten inkubieren
5. Waschen	PBS 0,01%ig	1 Minute
6. Sekundärer Antikörper	Anti-Immunglobulin AK* (biotinyliert)	20 Minuten inkubieren
7. Waschen	PBS 0,01%ig	1 Minute
8. Peroxidase-Streptavidin-Konjugat	HRP-Konjugat* (Horseradish Peroxidase)	20 Minuten inkubieren
9. Waschen	PBS 0,01%ig	1 Minute
10. Färbung	AEC-Komplex* (Amino-Ethyl-Carbazol)	zweimal 5 Minuten
11. Stoppen des Färbevorganges	Aqua dest	5 Minuten
12. Gegenfärbung	Meyers Hämalaun	1 Minute
13. Bläuen	fließendes Leitungswasser	10 Minuten
14. Eindecken	Aquatex	

2.5.8 Lichtmikroskopische Beurteilung und Fotografie

Die in HE gefärbten Schnitte, wie auch die immunhistochemisch markierten Präparate, wurden unter dem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse E 200) begutachtet.

Dabei wurde der Zustand und das gesamte Erscheinungsbild des Präparates begutachtet, um daraus auf den allgemeinen präoperativen Zustand und etwaige Vorschädigungen der verwendeten Hornhäute schließen zu können und diese bei der Bewertung der Schnittergebnisse des Pocket-Delaminator-Systems mit zu berücksichtigen.

Des weiteren wurden folgende Kriterien beurteilt: die Lage und Gleichmäßigkeit der Schnitte, die Beschaffenheit der stromseitigen Taschenbodens, das Vorhandensein eines Flaps sowie die Fixierung eines solchen als Ausdruck eines Taschen-Endes oder eines seitlichen Taschen-Randes.

Ein Teil der Präparate wurde bei der Begutachtung ausgewählt, um anschließend an einem mit einer digitalen Kamera ausgestatteten Lichtmikroskop (Leitz DMR, Leica Instruments) in 10-facher bis 40-facher Vergrößerung zu Dokumentationszwecken fotografiert zu werden.

Abgesehen davon wurden die lichtmikroskopischen Präparate daraufhin durchgesehen, von welchen der operierten Augen die zweite Hornhauthälfte für die ergänzende elektronenmikroskopische Beurteilung herangezogen werden sollte.

2.6 Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie

2.6.1 Fixierung in Karnovsky-Fixans

Die für die elektronenmikroskopische Begutachtung vorgesehenen Hornhauthälften wurden zur Fixierung in eine frisch zubereitete *Aldehydlösung nach Karnovsky* gegeben. Die Zubereitung erfolgte nach folgendem Rezept:

Herstellung eines Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisches nach *Karnovsky*

1. Lösen von 2g Paraformaldehyd in Aqua dest und
2. Zugabe von 2 Tr. NaOH (bei 70°C)
3. Abkühlen auf Eis
4. Zugabe von 10 ml einer 25%igen Glutaraldehydlösung
5. Zugabe von 10 ml eines 1,0M Cacodylatpuffers ($\text{CH}_3\text{AsNa}_2\text{O}_3$) mit pH 7,4
6. Zugabe von 1 ml 2,5%iger CaCl_2 -Lösung
7. Auf 100 ml mit Aqua dest auffüllen

Hierbei handelt es sich um eine kombinierte 4%ige *Formaldehyd*- und 5%ige *Glutaraldehyd*-Lösung, die für feinstrukturelle Untersuchungen besonders geeignet ist.

Durch die Kombination dieser beiden Fixantien erzielt man eine ausreichende Stabilisierung und damit Strukturhaltung des Gewebes, ohne dabei auf ein gutes Penetrationsvermögen der Lösung verzichten zu müssen, wie es bei der alleinigen Verwendung von Glutaraldehyd der Fall wäre. Zwar besitzen Glutaraldehyd-Moleküle zwei Aldehydgruppen, die eine Fixierung vermitteln können, was sie zu einer stärkeren Vernetzung von Proteinen befähigt. Sie dringen jedoch aufgrund ihrer Molekülgröße deutlich langsamer in das Gewebe ein. Dies wirkt sich bei Immersionsfixierungen ungünstig aus. Eine alleinige Formaldehydfixierung bietet hingegen keine ausreichende Strukturhaltung in Geweben, die für die Elektronenmikroskopie aufbereitet werden sollen.

Die Probenbehälter mit den in Karnovsky-Lösung befindlichen Hornhauthälften wurden über Nacht gekühlt aufbewahrt und nach einer Dauer von 16 Stunden zur weiteren Bearbeitung der Präparate aus dem Kühlschrank entnommen.

2.6.2 Weiterer Zuschnitt der Präparate

Unter dem Operationsmikroskop (Zeiss Universal S3) wurden die fixierten Präparate vor der Einbettung mit Einweg-Skalpellklingen auf einer Wachsunterlage, wie in Abb. 2-10 dargestellt, weiter zugeschnitten, wobei hier wesentlich kleinere Stückchen präpariert wurden als zuvor für die Lichtmikroskopie. Die Länge der vom Mikrotom anzuschneidenden Kante belief sich dabei auf 2-3 mm. Zur späteren Erkennung wurde diese am längsten belassen.

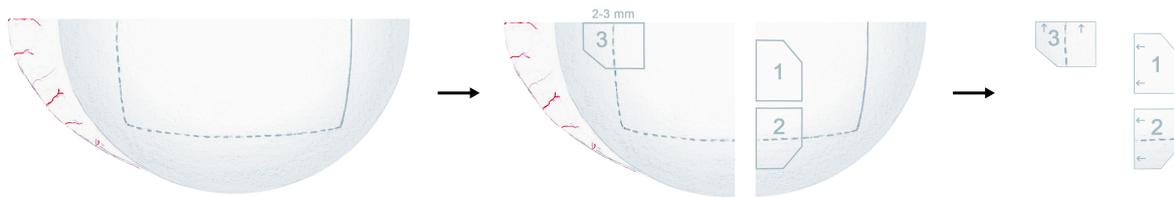


Abb. 2-10: Weiterer Zuschnitt der Präparate für die Elektronenmikroskopie. Blaue Pfeile markieren die Anschnittfläche des Mikrotoms mit einer Kantenlänge von 2-3 mm.

2.6.3 Einbettung im Kunstharz (Epon)

Jedes der zugeschnittenen Hornhautstückchen wurde in einem Fach eines Plastikkörbchens platziert, das dann viermalig in 0,1 molarer *Cacodylat*-Pufferlösung zur Entfernung des überschüssigen Fixans gewaschen wurde.

Die Präparate wurden im nächsten Schritt in einer 1%igen Lösung von *Osmiumtetroxid* nachfixiert, um insbesondere Lipide in den Präparaten untereinander und auch mit benachbarten Proteinen zu vernetzen und dadurch auch lipidreiche Organellen in der Elektronenmikroskopie später kontrastreich darstellen zu können. Nach erneutem viermaligem Waschen mit *Cacodylat*-Puffer sowie anschließend mit Aqua dest wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe entwässert.

Aus dem 99%igen Alkohol wurden sie in das Zwischenmedium *Propylenoxid* überführt, welches sich durch eine gute Mischbarkeit sowohl mit Alkohol als auch mit dem Einbettmedium *Epon 812* auszeichnet. Aufgrund der starken Toxizität dieser Substanz wurde – wie zuvor bei der Nachfixierung mit *Osmiumtetroxid* – unter dem Abzug gearbeitet.

Im Folgenden wurde das Einbettungsgemisch aus dem Epoxidharz *Epon 812* bei 35°C im Wärmeschrank in einem verschlossenen Fläschchen aufgetaut. Es war vorab unter Zugabe von zwei Härtern, dem DDSA (Dodecanyl-Bernsteinsäure-Anhydrid) und dem MNA (Methyl-Norbonen-2,3-Dicarbonsäure-Anhydrid), sowie einem Beschleuniger, dem DMP-30 (2,4,6-Tris-(Dimethylaminomethyl)-Phenol), angemischt und eingefroren worden.

Mit einem Gemisch des Einbettmediums und des Intermediums Propylenoxid im Verhältnis 1:1 wurden die Präparate am Schüttler durchtränkt. Es folgten weitere Phasen in einem Epon-

Propylenoxid-Gemisch im Verhältnis 2:1, dann in Epon mit Zusatz eines Tropfens des Intermediums, und abschließend in reinem Epon. Die Präparate wurden aus den Körbchen entnommen und unter dem Operationsmikroskop mit der Anschnittfläche nach unten in Kautschukformen ausgerichtet. Diese waren ebenfalls mit Epon angefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Kunstharz frei von Luftblasen blieb.

Zur Polymerisation und Aushärtung des Harzes befanden sich die Präparate anschließend über Nacht bei 80°C im Wärmeschrank.

Tab. 2-6: Ablauf der Fixierung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Prozedur	Lösung	Dauer
1. Fixierung	Lösung nach Karnovsky	16 Stunden
2. Waschen (in Pufferlösung)	Cacodylat-Puffer 0,1M	dreimal 5 Minuten
3. Nachfixierung der Lipide	Osmiumtetroxid 1%ig	2 Stunden
4. Waschen	Cacodylat-Puffer 0,1M	dreimal 5 Minuten
5. Waschen	Aqua dest	5 Minuten
6. Entwässerung (in absteigender Alkoholreihe)	Äthanol 30%ig Äthanol 50%ig Äthanol 70%ig Äthanol 90%ig Äthanol 96%ig	je 30 Minuten
	Äthanol 100%ig	zweimal 30 Minuten
7. Zwischenmedium	Propylenoxid	zweimal 30 Minuten
8. Infiltration (am Schüttler)	Epon / Propylenoxid 1:1	3 Stunden
	Epon / Propylenoxid 2:1	3 Stunden
	reines Epon	16 Stunden
9. Einbettung	reines Epon	
10. Polymerisation (über Nacht bei 80°C)		

2.6.4 Anfertigung von Semidünnpriparaten

Zur orientierenden Beurteilung der Qualität und der Eignung der eingebetteten Hornhautstückchen für die nachfolgende Elektronenmikroskopie wurden nach der Einbettung zunächst Semidünnpriparate mit einer Schnittdicke von 2 µm am Ultramikrotom (Leica Ultracut E) angefertigt. Die Schnitte erfolgten mit einem Histodiamanten.

Die Semidünnschnitte wurden auf Objektträger geladen und danach mit 1%iger Lösung von *Toluidinblau O* angefärbt. Zur Gegenfärbung diente 1%iges *basisches Fuchsin*.

Diese beiden basischen Farbstoffe zählen zu den wenigen Chromogenen, die auch ohne vorherige Entfernung eines hydrophoben Einbettmediums wie Epon an Präparate binden und sie anfärben können. Das Kunstharz selbst bleibt dabei ungefärbt.

Für die Färbung wurde eine 0,1%ige Gebrauchslösung von Toluidinblau in eine Spritze abgefüllt. Jeweils einige Tropfen wurden durch einen Spritzenvorsatz-Filter hindurch auf vorgewärmte Objektträger (Heizplatte, 60°C) gegeben. Nach 2 Minuten wurden die Schnitte mit Aqua dest abgespült und zur Gegenfärbung wiederum für 2 Minuten auf der Heizplatte mit einigen Tropfen der 1%igen basischen Fuchsin-Lösung überschichtet. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest wurden die Objektträger auf der Heizplatte getrocknet und dann mit Immersionsöl eingedeckt. Die mit Deckgläsern versehenen Objektträger wurden unter dem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse E 200) begutachtet.

2.6.5 Anfertigung von Ultradünnschnitten

Die nach Durchsicht der Semidünnschnitte ausgewählten Präparatblöcke wurden zur Vorbereitung der Ultradünnschnitte mit einer Rasierklinge so getrimmt, dass alle nicht gewebehaltigen Kunstharzanteile entfernt wurden.

Es entstanden Blöcke in Form abgestumpfter Pyramiden, die eine verbliebene Anschnittfläche von ungefähr 1 mm² besaßen. Sie wurden am Ultramikrotom (Leica Ultracut E) eingespannt. Nachfolgend wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 70 nm erzeugt, die nach dem Schneidevorgang in eine mit Aqua dest gefüllte Auffangform unterhalb der Klinge glitten. Von dort wurden die Schnitte auf die matte Seite von Kupfer-Trägernetzchen, so genannter *Kupfergrids*, aufgezogen (Porengröße 200 mesh, hexagonal, fine bar). Die Grids waren vorher im Ultraschallbad gereinigt worden.

Nach dem Trocknen der Schnitte auf den Grids, das 60 Minuten beanspruchte, schloss sich das *Positivkontrastieren* der Präparate an. Zu diesem Zweck werden Schwermetallatome an die Schnitte angelagert, die aufgrund Ihrer höheren Ordnungszahl Elektronen stärker streuen als die organischen Verbindungen, aus denen das Präparat aufgebaut ist. In diesem Fall wurden Lösungen von *Uranylacetat* und *Bleicitrat* verwendet.

Die bereits am Vortag angesetzte 2%ige Uranylacetat-Lösung wurde in eine mit einem Vorsatzfilter versehene Spritze gefüllt und dann tropfenweise in eine mit *Parafilm* ausgelegte schwarze Petrischale gegeben.

Je ein Grid wurde mit der Präparatseite nach unten auf einen Tropfen gelegt und in dieser Position 10 Minuten lang inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Grids mit einer Pinzette aufgenommen und zum gründlichen Waschen nacheinander in drei jeweils mit Aqua bidest gefüllte 100ml Messbecher getaucht und darin geschwenkt. Die Trocknung erfolgte durch Abtupfen mit Filtrierpapier.

Während der Inkubation war bereits mit einer Spritze die Bleicitrat-Lösung aufgezogen worden. In gleicher Weise wie zuvor das Uranylacetat wurde diese tropfenweise in eine mit Parafilm ausgelegte Petrischale gegeben, um die Grids danach erneut für 10 Minuten auf jeweils

einem solchen Tropfen zu inkubieren. Die Schalen befanden sich während der Inkubation wiederum in größeren, abgedeckten Petrischalen. Diese waren zuvor mit je 3 angefeuchteten NaOH-Plättchen versehen worden, um ein CO₂-armes Milieu zu schaffen und damit die Bildung von Blei-Carbonat zu verhindern.

Nach erneutem dreimaligen Waschen in Aqua bidest wurden die Kupfernetzchen in eine Petrischale abgeblottet, mit Filtrierpapier abgetupft und für eine Stunde luftgetrocknet.

2.6.6 Elektronenmikroskopische Beurteilung und Fotografie

Die Beurteilung der Präparate erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss LEO 912 AB), das neben einem Leuchtschirm auch über einen digitalen Fotochip verfügt, mit dessen Hilfe das beim Auftreffen der Elektronen auf dem Leuchtschirm entstehende Bild dokumentiert werden kann.

Bei der Bewertung der Präparate wurden folgende Kriterien berücksichtigt: Lage und Gleichmäßigkeit der Keratomschnitte, Unversehrtheit der Epithelzellen, Lage und Unversehrtheit von Zelladhäsionskomplexen (Hemidesmosomen, Desmosomen) im räumlichen Bezug zum Schnittverlauf.

2.7 Auflistung der Materialien

2.7.1 Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Land
AEC Broad Spectrum Kit ZytoChem HRP-S-008	ZytoMed GmbH	Deutschland
Äthanol 99%ig (vergällt)	Alkohol Handels Kontor	Deutschland
anti-Kollagen-VII- Antikörper, C 6805	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
anti-Laminin Antikörper, clone LAM-89, L 8271	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Bleicitrat	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Cacodylatpuffer Lösung	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Calciumchlorid Lösung	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
DDSA (Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid)	Serva GmbH	Deutschland
Diluentpuffer	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
DMP-30 (2,4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol	Serva GmbH	Deutschland
Eosin Y	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Epon 812 (Glycidether 100)	Serva GmbH	Deutschland
Fuchsin basisch	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Meyers Hämalan	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
MNA (Methylnorbornen-2,3-dicarbonensäureanhydrid)	Serva GmbH	Deutschland
Natrium-Chlorid Lösung 0,9%ig	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Natrium-Hydroxid (NaOH) Lösung	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Natrium-Hydroxid (NaOH) Plättchen	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Natrium-Borat	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Osmium-Tetroxid Lösung	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
PBS (Phosphat Buffered Saline)	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Propylenoxid	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Proteinase K, Code S 3004	DakoCytomation GmbH	Deutschland
Toluidinblau O	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Uranylacetat	Sigma-Aldrich GmbH	Deutschland
Wasserstoff-Peroxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH	Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH	Deutschland

2.7.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Land
Coverplates Shandon	Thermo Electron	USA
Deckgläser	Menzel GmbH	Deutschland
Einbettkassetten	Carl Roth GmbH	Deutschland
Einschlussmedium Aquatex	Merck GmbH	Deutschland
Einschlussmedium Depex	Serva GmbH	Deutschland
Histodiamanten	Diatome AG	Schweiz
Kupfergrids 200 mesh (hexagonal, fine bar)	Science Services GmbH	Deutschland
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel GmbH	Deutschland
Parafilm M	Brand GmbH	Deutschland
Skalpellklingen	Herkenrath GmbH	Deutschland
Spritzen-Vorsatzfilter	Millipore GmbH	Deutschland

2.7.3 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller	Land
Einbettungsautomat	Medim GmbH	Deutschland
Kühlplatte EG 1150 C	Leica Instruments GmbH	Deutschland
Lichtmikroskop Eclipse E 200	Nikon Instruments	Japan
Lichtmikroskop Leitz DMR	Leica Instruments	Deutschland
Mikrotom Jung RM 2055	Leica Instruments	Deutschland
Operationsmikroskop Universal S3	Zeiss AG	Deutschland
Paraffinspender Histoembedder	Leica Instruments GmbH	Deutschland
Schüttler	IKA Labortechnik GmbH	Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop LEO 912 AB	Zeiss AG	Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH	Deutschland
Ultramikrotom Ultracut E	Leica Instruments GmbH	Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Handhabbarkeit des PDS

Das PDS ließ sich zuverlässig und ohne Schwierigkeiten aus seinen Einzelkomponenten zusammenbauen.

Die Einheit aus Klingenhalter und Klinge fand in der vorgesehenen Aussparung im Schneidekopf Platz. Der Schneidekopf ließ sich gemeinsam mit dem Klingenhalter am Gehäuse einrasten.

Der Saugring konnte in allen Fällen, unter Erzeugung eines Unterdruckes über den Vakuum-Konnektor, im Limbusbereich der Bulbi fixiert werden. An letzterem ließ sich der Schneidekopf mühelos in Position bringen. Nach Herstellung der Verbindung zwischen Saugring und Gehäuse über das hierfür vorgesehene bandförmige Verbindungsglied wurde jeweils der Keratomschnitt durchgeführt. In einem Fall, bei Anwendung an einem humanen Bulbus (Präparat HH_h 9), lief der Schneidevorgang nur unvollständig und damit nicht ordnungsgemäß ab. Der Prozess des Vorgeleitens und der Oszillationen stoppte plötzlich nach etwa der Hälfte der Strecke. Alle anderen, vorhergehenden wie nachfolgenden Schneidevorgänge mit dem PDS liefen hingegen vollständig ab.

Nach Lösen des Unterdruckes ließ sich der Saugring und mit ihm die gesamte PDS-Einheit jeweils ohne Schwierigkeiten vom Auge lösen und abheben.

3.2 Ergebnisse unter Verwendung von Schweinehornhäuten

3.2.1 Orientierende Begutachtung vor und nach Verwendung des PDS

Es wurden $n_p = 6$ porkine Hornhautpräparate (HH_p 1 bis 6) ausgewählt. Alle zeigten bei orientierender Betrachtung unter dem Operationsmikroskop vor Anwendung des PDS eine geschlossene Epitheldecke.

Nach erfolgtem Keratomschnitt und der Entfernung von Keratom und Saugring zeigten sich 5 der 6 Hornhautpräparate in der orientierenden Begutachtung unter dem Operationsmikroskop von einer regelmäßigen und zusammenhängenden Epithelschicht bedeckt. Eine schlitzförmige Kontinuitätsunterbrechung des Epithelverbandes war an all diesen Präparaten in dem Bereich sichtbar, an dem der Keratomschnitt begonnen worden war. Dieser Bereich entsprach der vom PDS erzeugten Taschenöffnung, dem Bereich also, in dem die Schnittkante der PDS-Klinge das Epithel schlitzartig durchtrennt hatte. Ein porkiner Bulbus (HH_p 2) schien nach Entfernung des PDS im zentralen Bereich keine Epithelbedeckung mehr zu besitzen.

Auf zusätzliche mechanische Manipulationen oder Maßnahmen, wie beispielsweise eine Anfärbung der Oberfläche mit Fluoreszein zur weitergehenden Evaluierung des Zustandes der Epitheldecke, sollte an dieser Stelle - vor den weiteren histologischen Präparationsschritten - verzichtet werden.

3.2.2 Lichtmikroskopie der porkinen Präparate

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung hatten 5 von 6 porkinen Schnitten ein durchgehend 6- bis 9-schichtiges Epithel.

Vier von 6 Präparaten wiesen einen durchgehend regelmäßigen Verlauf des Keratomschnittes im Grenzbereich von Epithelbasis, Basalmembran und angrenzendem Stroma auf. Die Abb. 3-1 zeigt ein solches HE-gefärbtes Hornhautpräparat.

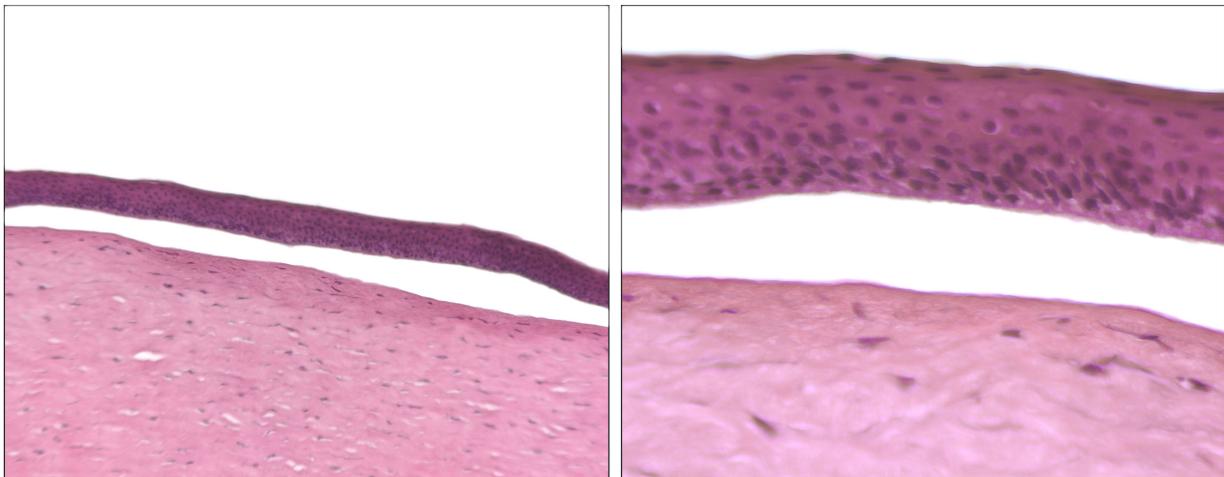


Abb. 3-1: Ausschnitt des Präparates HH_p 3.1 (links Objektiv mit 10facher, rechts mit 40facher Vergrößerung)

Bei einem Präparat fanden sich auf der stromalen Schnittseite vereinzelte Überreste basaler Epithelzellen (HH_p 6). Bei einem weiteren (HH_p 1) verlief der Schnitt streckenweise intraepithelial, beziehungsweise oberflächenparallel durch superfizielle Epithelschichten hindurch.

Fünf der sechs Schnitte (HH_p 1, 3, 4, 5, 6) verfügten über einen an das Präparat assoziierten Epithelflap. Sie zeichneten sich zudem durch ein durchgehend 6- bis 9-schichtiges Epithel aus. Diese Schichtzahl lag sowohl im Bereich des Flaps als auch außerhalb des Schnittbereiches des Keratoms vor.

Bei Präparat HH_p 2 war kein Flap auf dem Objektträger nachweisbar. Dieses hatte allerdings nach der PDS-Anwendung bereits dem makroskopischen Anschein nach keine Epithelbedeckung mehr aufgewiesen (vgl. Kap. 3.2.1). Lichtmikroskopisch zeigte sich bei HH_p 2 im noch epithelial bedeckten Randbereich eine reduzierte Epithelhöhe von nur 3 bis 4 Schichten und eine unregelmäßige epitheliale Oberfläche. Dies deutete auf einen reduzierten Epithelzustand bereits vor dem Keratomschnitt hin.

3.2.3 Immunhistochemische Anfärbung der porkinen Präparate

Unter den porkinen Schnitten wurden zwei Präparate (HH_p 3 und 6), die lichtmikroskopisch einen regelmäßigen Schnittverlauf unterhalb des Epithels gezeigt hatten und über einen epithelialen Flap verfügten, für die immunhistochemische Anfärbung mit Kollagen-VII und Laminin ausgewählt.

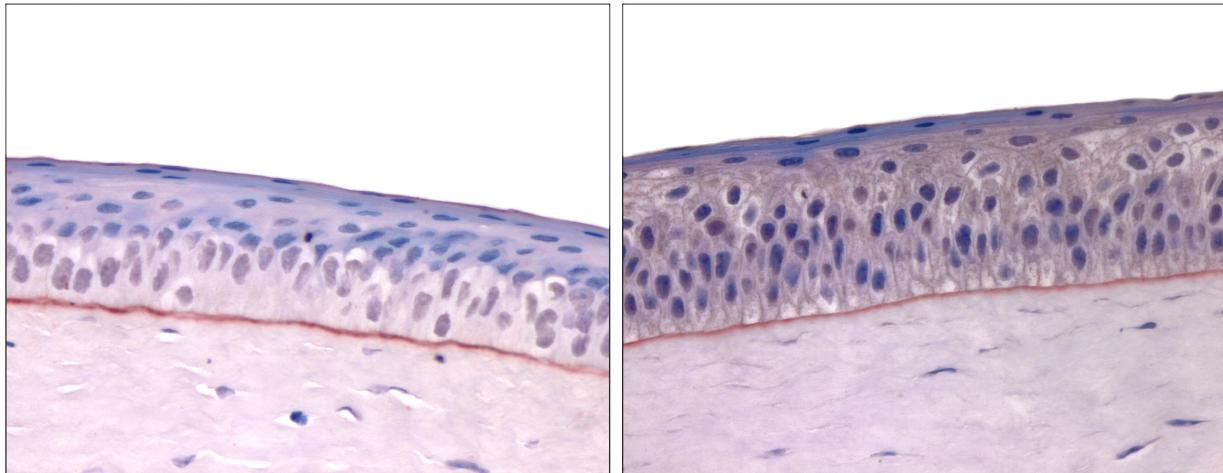


Abb. 3-2: Anfärbung von Kollagen-VII peripher des Schnittbereiches des PDS (links HH_p 6, rechts HH_p 3)

Die Anfärbung von Laminin war bei diesen Präparaten nicht erfolgreich. Es zeigte sich weder eine lokalisierte, noch diffuse Rotfärbung der Schnitte. Die identisch behandelten Positivkontrollen - ein humanes Tonsillenpräparat für die Markierung von Laminin und ein humanes Hautpräparat für die Markierung von Kollagen-VII - ließen eine Rotfärbung in jeweils adäquater Lokalisation erkennen. Bei der Immunmarkierung von Kollagen-VII zeigten die Schweine-Präparate außerhalb, das heißt peripher des Schnittbereichs des Keratoms, eine lineare Anfärbung unterhalb des Epithels (Abb. 3-2). Im Bereich des Keratomschnittes befand sich die Färbung bei Präparat HH_p 3 ausschließlich auf der stromalen Seite des Schnittes (Abb. 3-3).

Bei dem zweiten Präparat (HH_p 6) war es während des Präparationsvorganges zu einem partiellen Wiederanlegen des epithelialen Flaps an die stromale Schnittseite gekommen. In dem Bereich, wo die beiden Schnittseiten nicht aneinanderlagen, zeigte sich die Anfärbung ebenfalls ausschließlich auf der stromalen Seite. In den anderen Abschnitten dieses Präparates war eine eindeutige Zuordnung der linearen Anfärbung zu einer bestimmten Schnittseite nicht möglich.

Die beiden vom PDS erzeugten Keratomschnitte – zumindest die auf den Objektträgern vorliegenden Abschnitte - zeigten somit einen Verlauf oberhalb des Stromas im Bereich von Basalmembran und Epithelzellbasis.

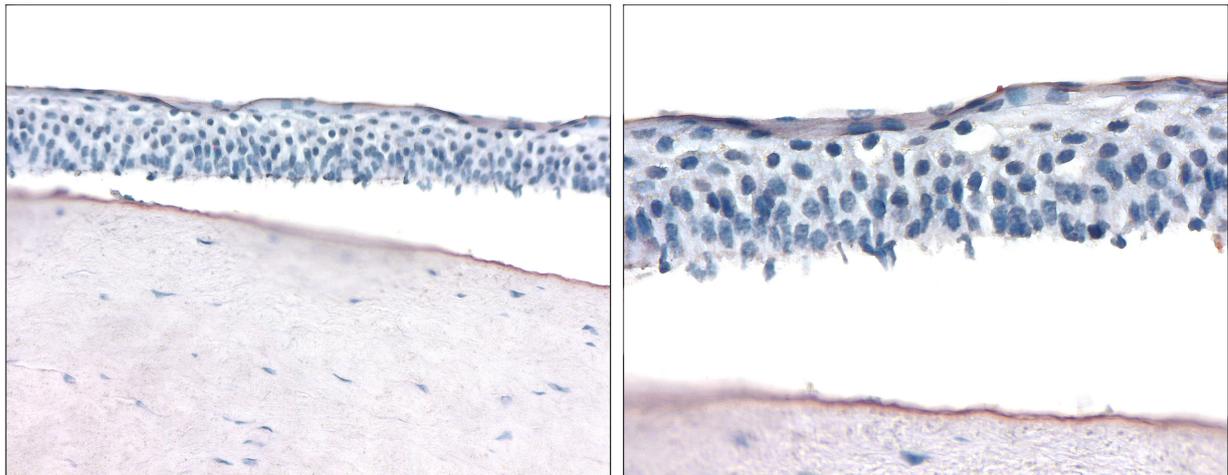


Abb. 3-3: Markierung von Kollagen-VII auf der stromalen Seite des Keratomschnittes (HH_p 3). Die Basalzellen erscheinen ausgefranst.

3.2.4 Elektronenmikroskopie der porkinen Präparate

Ein porkines Hornhautpräparat (HH_p 1) wurde für die elektronenmikroskopische Untersuchung ausgewählt. Es hatte zuvor lichtmikroskopisch einen Schnittverlauf gezeigt, der streckenweise intraepithelial durch oberflächliche Epithelschichten verlief.

Bei der zweiten, für die Elektronenmikroskopie verwendeten Hornhauthälfte dieses Präparates zeigte sich im Vergleich bereits lichtmikroskopisch an den Semidünnschnitten ein tieferer Schnittverlauf, im Grenzbereich von Epithelbasis, Basalmembran und oberflächlichem Stroma. Ein abgrenzbarer Epithelflap war vorhanden.

Die folgenden räumlichen Angaben beziehen sich auf die Lage des jeweiligen Präparates in der vom Keratom zu erzeugenden Epitheltasche:

Das aus dem Bereich der Taschenmitte stammende Präparat (HH_p 1.1) verfügte über einen Schnittverlauf nahe der hemidesmosomalen Anheftung (Abb. 3-4, *) durch Basalzellen (E) hindurch. Der im Bereich des seitlichen Taschenrandes entnommene Anschnitt (Abb. 3-5) zeigte ebenfalls einen Verlauf des Keratomschnittes durch die Basis der Basalzellen. Beim dem Taschenende zuzuordnenden Präparat (HH_p 1.3) verlief der Schnitt unmittelbar entlang der epithelialen Basalmembran (+) unter Durchtrennung der hemidesmosomalen Anheftung der Basalzellen (Abb. 3-6).

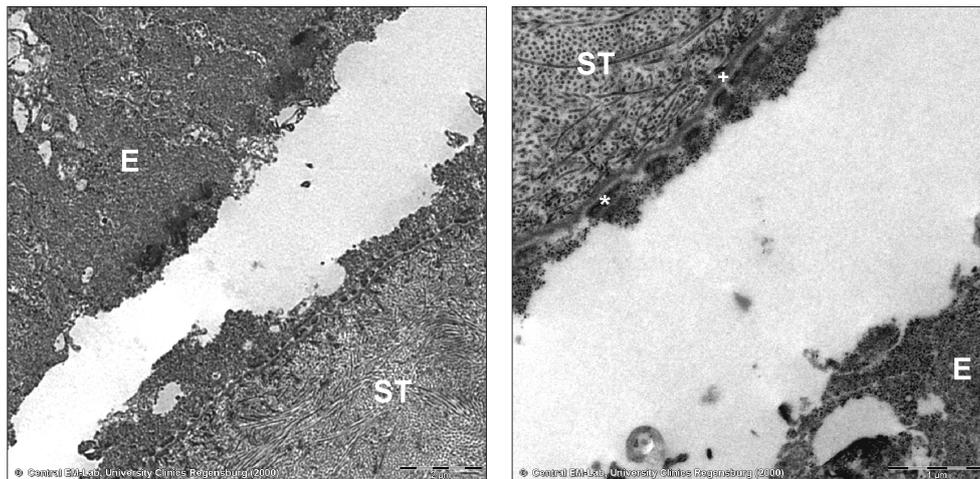


Abb. 3-4: Schnittverlauf durch Basalzellen bei Präparat HH_p 1.1 (ST: Stroma; +: Basalmembran; *: Hemidesmosomen; E: Basalzelle)

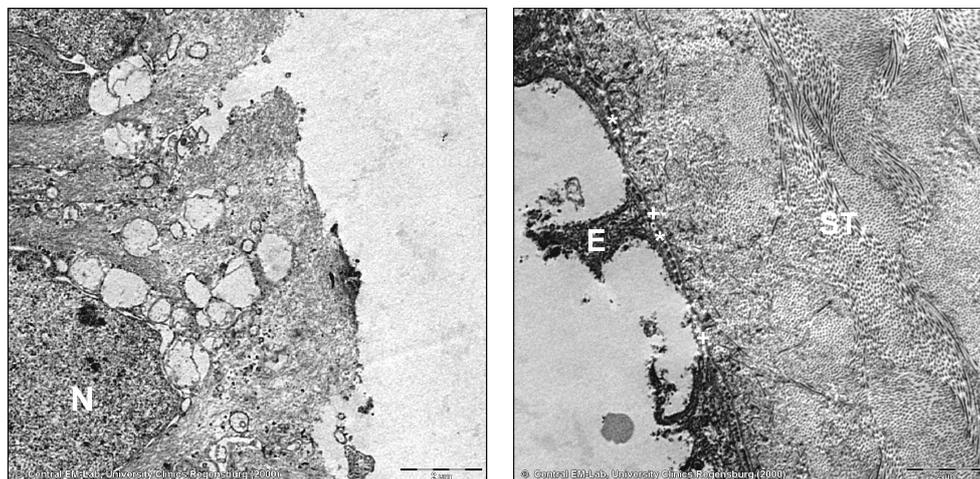


Abb. 3-5: Schnittverlauf durch Basalzellen (E) bei HH_p 1.2 (N: Zellkern)

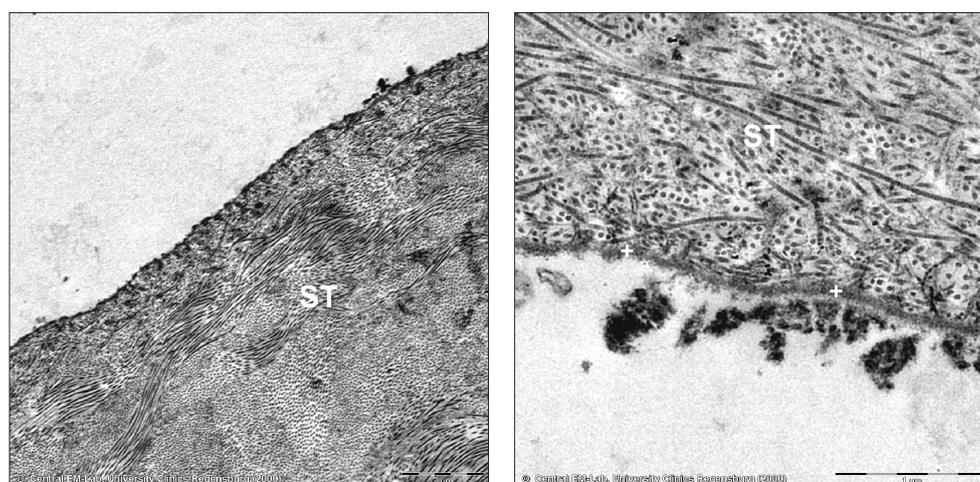


Abb. 3-6: Schnittverlauf entlang der Basalmembran (+) bei HH_p 1.3

3.3 Ergebnisse unter Verwendung von humanen Hornhäuten

3.3.1 Orientierende Begutachtung vor und nach Verwendung des PDS

Es kamen $n_h = 19$ menschliche Bulbi zur Verwendung (HH_h 7 bis 25). Die Post-mortem-Zeiten betragen zwischen 3,5 und 6 Tagen. Die Bulbi hatten sich während des Transportes einzeln in Feuchtbehältern befunden und waren dabei unmittelbar von feuchten Kompressen umhüllt gewesen.

Vor Verwendung des PDS zeigte ein Großteil (17 von 19) der Bulbi bei der orientierenden Betrachtung unter dem Operationsmikroskop zwar eine zusammenhängende korneale Epitheldecke. Sie wies allerdings bei 10 Präparaten eine unregelmäßige und gestippte Oberfläche auf. Sieben Bulbi schienen bei der orientierenden Betrachtung über eine regelmäßige Epithelbedeckung zu verfügen.

Die zwei übrigen Hornhäute zeigten eine zentrale Erosio mit einer Ausdehnung von 2 x 2 mm bei ansonsten regelmäßiger epithelialer Oberfläche. Sie wurden dennoch für die Erprobung des Keratoms herangezogen.

Auf eine Anfärbung der Hornhäute mit Fluoreszein zur genaueren Evaluierung des Epithelzustandes vor und nach Verwendung des PDS musste aufgrund der nachfolgend durchzuführenden Anfärbungen und Immunmarkierungen verzichtet werden.

Die für diese Arbeit bereitgestellten humanen Präparate verfügten somit bereits zu Beginn über eine reduzierte Qualität. Daher sind die vorliegenden Ergebnisse an den humanen Hornhäuten von beschränkter Aussagekraft. Es war damit zu rechnen, dass das Schneideverhalten unter dem PDS durch den Zustand der Hornhäute beeinflusst wurde. In der Diskussion (vgl. Kapitel 4.4.2.2) soll hierauf detailliert eingegangen werden.

Bei einem Präparat (HH_h 9) stoppte die Schneidvorgang durch das PDS aufgrund eines technischen Defekts nach etwa der Hälfte des Schnittes. Das Präparat wurde daraufhin verworfen.

3.3.2 Lichtmikroskopie der humanen Präparate

Es wurden $n_h = 18$ humane Hornhautpräparate lichtmikroskopisch untersucht. Bei allen Präparaten war die Epithelhöhe zumindest teilweise reduziert. Das Epithel war meist nur 3- bis 4-schichtig mit Schwankungen der Dicke auch innerhalb eines Präparates. Dies galt sowohl für den Flap (in den Fällen, in denen ein solcher vorhanden und damit beurteilbar war) als auch für die peripheren Epithelanteile außerhalb des PDS-Schnittbereiches. In allen Präparaten fanden sich in unterschiedlicher Ausprägung ein Epithelödem, sowie Epithelzellen mit vakuolärem avitalen Erscheinungsbild (Abb. 3-7 und 3-11, *Pfeile*).

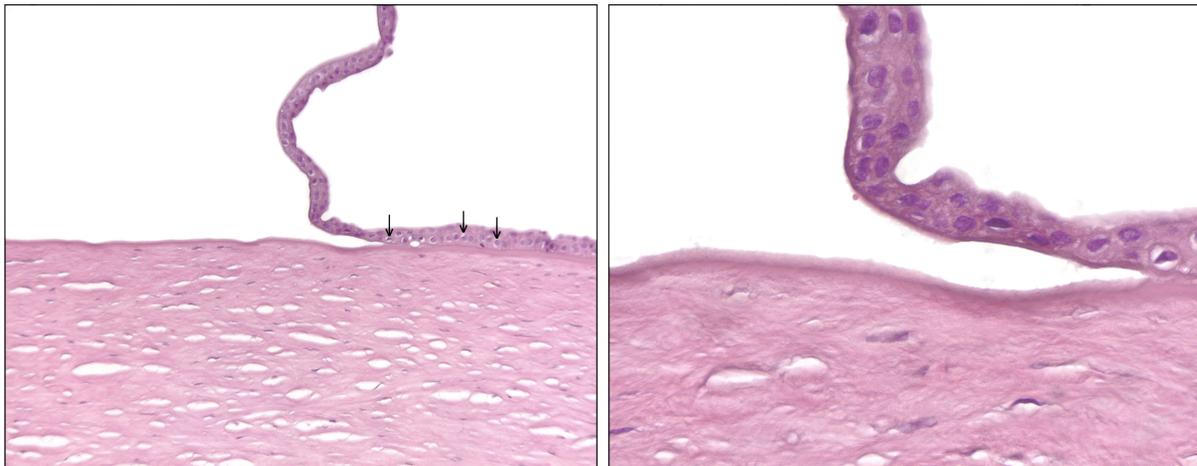


Abb. 3-7: Abtrennung gleichmäßig im Bereich von Basalmembran und Bowman- Membran (HH_p 23). Assoziierter Flap aus 3-schichtigem Epithel. *Pfeile*: avitale, vakuolär veränderte Epithelzellen.

Von insgesamt 18 Präparaten zeigten 12 durchgehend eine vollständige Abtrennung des Epithels im lichtmikroskopisch nicht eindeutig differenzierbaren Grenzbereich von Epithelzellbasis, Basalmembran und oberflächlicher Bowman-Membran. Die Abbildung 3-7 zeigt einen solchen Schnitt (HH_h 23) mit anhängendem Flap. Drei Präparate (HH_h 10, 13, 14) wiesen bei ansonsten identischem Verlauf einige Überreste von Epithelzellen auf der stromalen Seite des Schnittes auf (Abb. 3-8). Bei 2 Präparaten (HH_h 8 und 18) verlief der Schnitt partiell oberflächenparallel durch Epithelzellschichten hindurch (Abb. 3-9).

Bei allen zuvor genannten Präparaten (17 von 18) zeigte sich die Bowman-Membran unterhalb der Schnittkante, beziehungsweise auf der stromalen Seite des Schnittes als durchgehende Schicht erhalten.

Lediglich in einem Fall (HH_h 24) lag ein Einschnitt in das Stroma (Abb. 3-10).

Bei 12 (von 18) Schnitten konnte lediglich die Stromaseite des Präparates beurteilt werden. Ein epithelialer Flap war auf dem Objektträger nicht nachzuweisen.

Sechs der 18 Präparate wiesen hingegen einen epithelialen Flap auf. In zwei Fällen (von diesen 6) lag der Flap abgetrennt vom stromalen Hornhautanteil separat auf dem Objektträger. Die Präparate, die über einen epithelialen Flap verfügten, entstammten vornehmlich jenen humanen Bulbi, die vor Anwendung des PDS makroskopisch über eine durchgehend regelmäßige Epithelbedeckung verfügt hatten. Auch bei Präparat HH_h 8, bei dem vor dem PDS-Schnitt eine zentrale Erosio vorgelegen hatte, war ein anhängender Flap vorhanden.

Bei allen 10 Präparaten, die vor Verwendung des PDS ein unregelmäßiges, welliges und gestipptes Epithelrelief gezeigt hatten, fand sich nach dem Keratomschnitt lichtmikroskopisch kein Flap auf dem Objektträger.

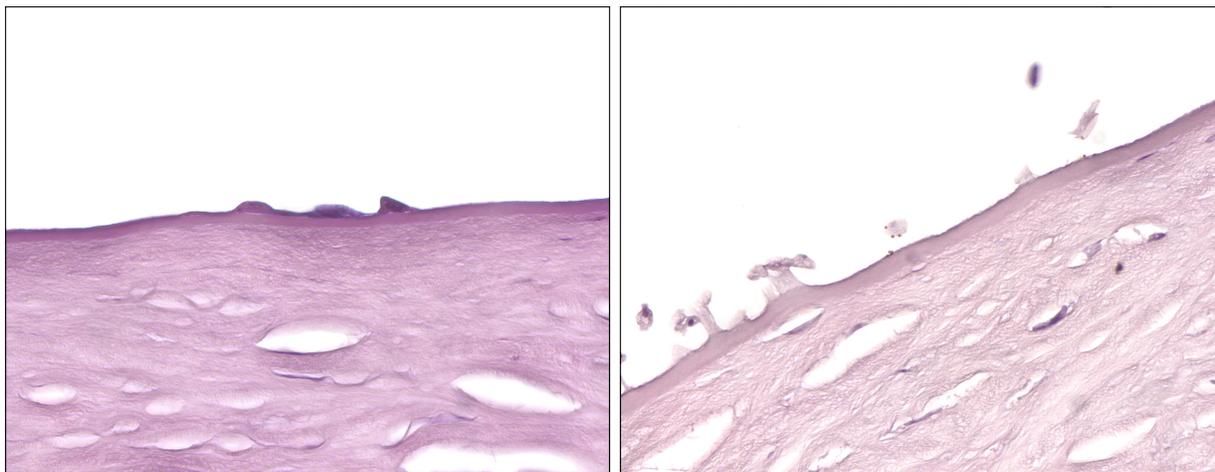


Abb. 3-8: Epithelreste auf der Stromaseite des Schnittes (links HH_n 10, rechts HH_n 14)

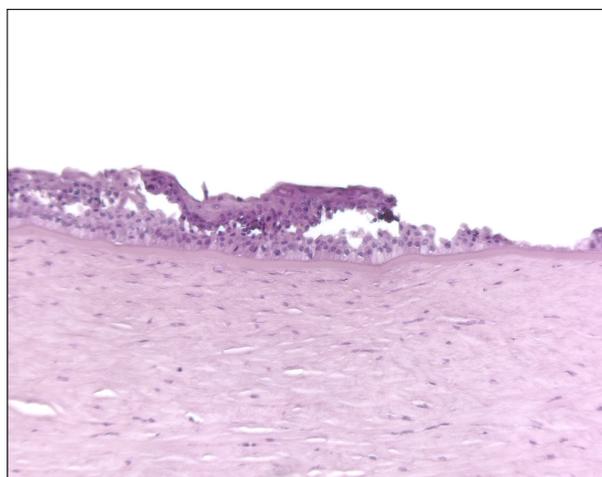


Abb. 3-9: Der Schnitt verläuft streckenweise durch die Epithelzellschicht (HH_n 18)

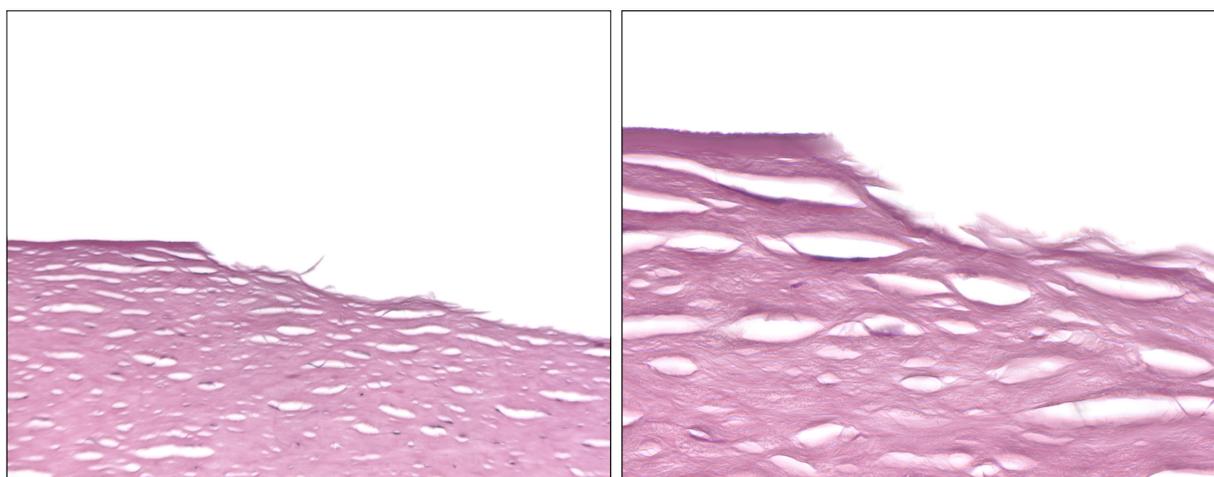


Abb. 3-10: Stromaler Einschnitt bei Präparat HH_n 24

3.3.3 Immunhistochemische Anfärbung humaner Präparate

Bei insgesamt 4 humanen Präparaten (HH_h 18, 19, 22, 23), die in der lichtmikroskopischen Durchsicht über einen epithelialen Flap verfügten, wurden immunhistochemische Markierungen von Laminin und Kollagen-VII vorgenommen.

Bei der Markierung von Laminin zeigten die Präparate außerhalb des Schnittbereiches des Keratoms eine lineare Rotfärbung unterhalb der basalen Epithelzellen. Dies entspricht der Lokalisation von Laminin in der Basalmembran. Zudem zeigte sich eine dezente zytoplasmatische Anfärbung der Basalzellen (Abb. 3-11 *links*) gemäß der hier erfolgenden Synthese von Laminin.

Die Markierung von Kollagen-VII ging im Bereich der nicht geschnittenen Hornhaut wie bei den Schweinepräparaten mit einer linearen subepithelialen Markierung einher (Abb. 3-11 *rechts*). Dies korrespondiert mit der Lokalisation von Kollagen-VII in der Bowman-Membran.

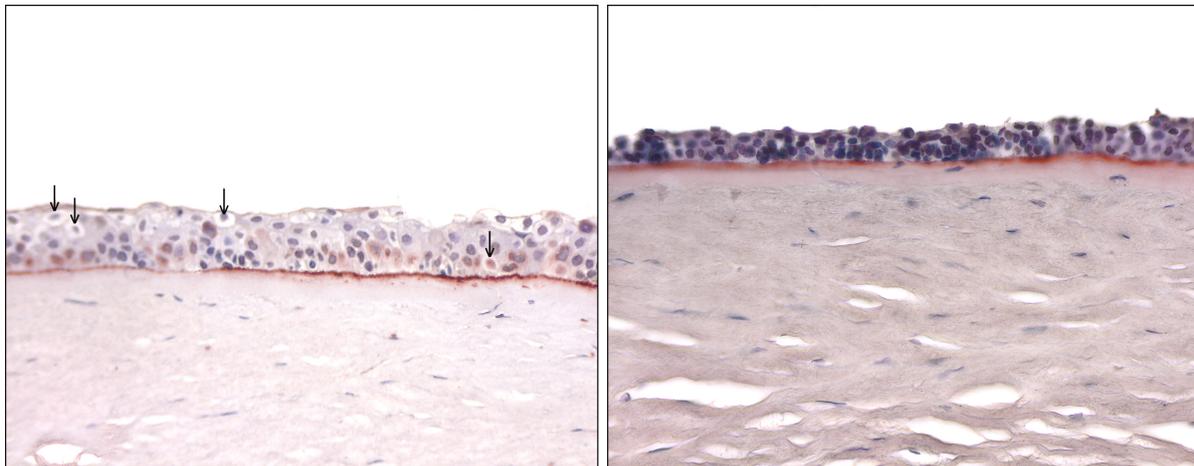


Abb. 3-11: *Links* Markierung von Laminin, *rechts* Markierung von Kollagen-VII (HH_h 18) außerhalb des Schnittbereiches des PDS. *Pfeile*: avitale, vakuolär veränderte Epithelzellen

Im Schnittbereich des Keratoms zeigten 2 Präparate (HH_h 18 und 19) bei der Laminin-Markierung eine lineare Rotfärbung sowohl auf der epithelialen als auch auf der stromalen Seite des Schnittes. Bei Markierung von Kollagen-VII zeigte sich nur auf der stromalen Seite eine Anfärbung. Dies entspricht einer Durchtrennung oberhalb der Bowman-Membran im Bereich von Basalmembran und Epithelzellbasis.

Bei einem Präparat (HH_h 22) war eine Anfärbung von Laminin im Bereich des Schnittendes auf der stromalen und der epithelialen Seite vorhanden, ansonsten befand sich diese lediglich auf der epithelialen Seite. Eine Anfärbung von Kollagen-VII war nahe dem Schnittende lediglich stromal, im übrigen Verlauf auf beiden Seiten vorhanden. Dies entspricht einem Keratomschnitt, dessen peripherer Anteil in Höhe von Basalmembran und Epithelbasis, und dessen zentraler Anteil in der Bowman-Membran verläuft.

Bei HH_h 23 führte die Markierung von Laminin zu einer flapseitigen Anfärbung (Abb. 3-12 *links*), die Markierung von Kollagen-VII ging mit einer Rotfärbung auf beiden Seiten des Keratomschnittes einher (Abb. 3-12, *rechts*). Letzterer verlief somit innerhalb oberflächlicher Anteile der Bowman-Membran.

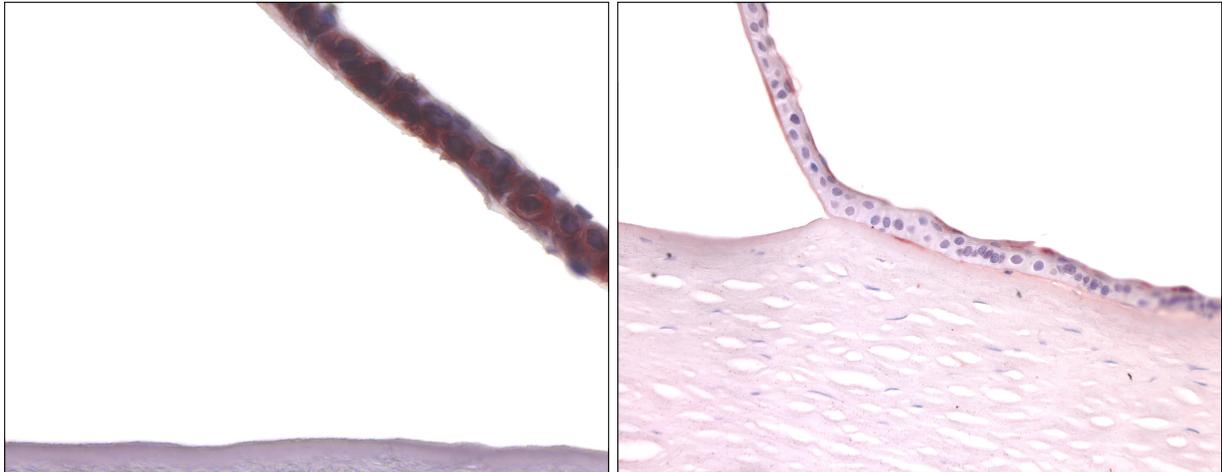


Abb. 3-12: Immunfärbung von Laminin (*links*) bzw. Kollagen-VII (*rechts*) bei HH_h 23

3.3.4 Elektronenmikroskopie der humanen Präparate

Zwei humane Hornhautpräparate (HH_h 7 und 8) wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Da für die Elektronenmikroskopie die jeweils andere Hornhauthälfte Verwendung fand, wurden hier andere Abschnitte der jeweiligen Hornhäute beurteilt als zuvor bei der Lichtmikroskopie.

Das Präparat HH_h 8 hatte lichtmikroskopisch einen partiell durch das Epithel verlaufenden Schnitt gezeigt. Die elektronenmikroskopisch untersuchten Präparate aus der anderen Hornhauthälfte verfügten über einen Schnittverlauf im Bereich der Hemidesmosomen der Basalzellen (Abb. 3-13).

Bei Präparat HH_h 7 war lichtmikroskopisch eine Abtrennung des Epithels mit regelmäßigem subepitheliales Verlauf zu beobachten gewesen, elektronenmikroskopisch zeigte sich ein Schnittverlauf in Höhe des Kollagenfasergeflechts der Bowman-Membran (Abb. 3-14).

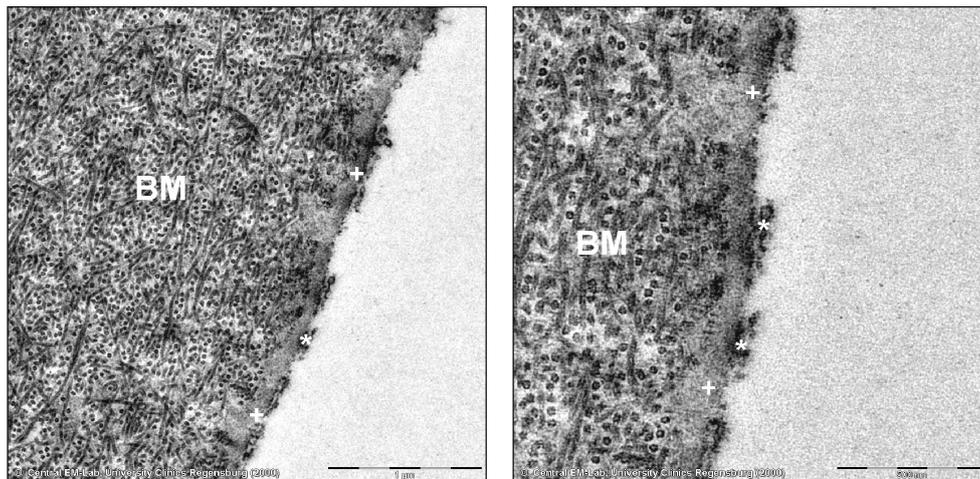


Abb. 3-13: Schnittverlauf oberflächlich der Bowman-Membran (BM), entlang der Basalmembran (+). Hemidesmosomen (*) wurden durchtrennt (HH_h 8)

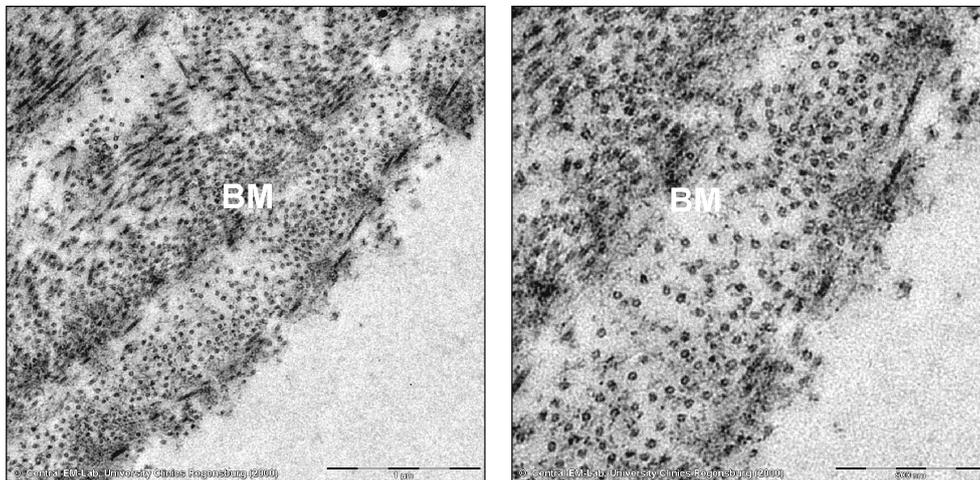


Abb. 3-14: Schnittverlauf im Bereich der Bowman-Membran (BM) bei HH_h 7

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt wurde das PDS bei 25 Bulbi eingesetzt – bei 6 porkinen und 19 humanen Augen. Der Schneidevorgang mit Vorgeiten der oszillierenden Klinge und anschließendem Zurückgleiten verlief bei 24 von 25 Augen vollständig. Diese 24 Augen wurden histologisch untersucht.

Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsqualität der Präparate werden die Schneideergebnisse des PDS an Schweine- und Menschaugen getrennt bewertet.

3.4.1 Porkine Hornhäute

Unter den Schweinehornhäuten zeigte ein Großteil (5 von 6 Präparaten) einen am Taschenrand anhängenden Epithelflap. Die Trennlinie zwischen dem Flap und der Stromaseite lag bei 4 dieser 5 Präparate gleichmäßig im Grenzbereich von Epithelzellbasis, Basalmembran und angrenzendem oberflächlichen Stroma. Bei einem Präparat führte der Schnitt streckenweise durch das Epithel hindurch.

Die verbleibende Hornhaut, bei der der Flap verloren gegangen war, zeigte stromaseitig eine regelmäßige Schnittkante in Höhe der Basalmembran.

Schnitte, die lichtmikroskopisch an der Grenze von Basalmembran und angrenzendem oberflächlichen Stroma verliefen, wurden mit einer immunhistochemischen Markierung und der Elektronenmikroskopie genauer untersucht. Hierbei zeigten die Keratomschnitte streckenweise Verläufe in Höhe der Basalmembran, streckenweise etwas oberflächlicher unter Durchtrennung beziehungsweise Verletzung basaler Epithelzellen. Eine Verletzung des Stromas durch die PDS-Klinge ließ sich bei keinem der Präparate nachweisen.

3.4.2 Humane Hornhäute

Bei allen humanen Präparaten zeigte sich eine insgesamt reduzierte epitheliale Schichtenzahl, und in unterschiedlicher Anzahl Epithelzellen mit vakuolärem, avitalen Aussehen.

Nach Anwendung des PDS konnte ein epithelialer Flap bei 6 von 18 humanen Hornhäuten nachgewiesen werden. Zwei davon lagen separat, also abgetrennt vom übrigen Epithelzellverband, auf dem Objektträger. Bei den übrigen Hornhäuten konnte nach Anwendung des PDS lediglich die Stromaseite beurteilt werden. Die stromaseitige Schnittkante war bei über der Hälfte der Präparate (11 von 18) durchgehend im Grenzbereich von Epithelzellbasis, Basalmembran und oberflächlicher Bowman-Membran gelegen, einige zeigten streckenweise anheftende epitheliale Überreste (bei 4 von 18), ein partieller Schnittverlauf durch das Epithel lag bei 2 Präparaten vor. Bei lediglich einem Präparat zeigte sich ein Einschnitt der PDS-Klinge in das Hornhautstroma (1 von 18).

Lichtmikroskopisch gleichmäßige Schnittbereiche unterhalb des Epithels wurden genauer untersucht. In der immunhistochemischen Markierung beziehungsweise der Elektronenmikroskopie zeigten sich bei einigen Präparaten Schnittverläufe innerhalb der Basalmembran (HH_h 8, 18, 19). Bei anderen (HH_h 7, 23) verlief der Schnitt innerhalb der Bowman-Membran. In einem Fall lag die Schnitt-Tiefe zentral im Bereich der Bowman-Membran, peripher etwas oberflächlicher im Bereich der Basalmembran.

Alle Ergebnisse sind stichpunktartig in der Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tab. 3-1: Zusammenfassung der Ergebnisse

Nr.	Epitheldecke vor PDS	Tage post mortem	Lichtmikroskopischer Befund	Immunhistochemische Anfärbung	Elektronenmikroskopischer Befund
Porkine Präparate HH_p					
HH _p 1	regelmäßig	0,5	- Schnittverlauf streckenweise intraepithelial, ansonsten regelmäßig im Bereich EB/B - Flap vorhanden		- Taschenmitte und seitl. Rand: Schnitt durch EB - Taschende: entl. der B, einzelne zelluläre Überreste stromaseitig
HH _p 2	regelmäßig	0,5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B - Kein Flap		
HH _p 3	regelmäßig	0,5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B - Flap vorhanden	- Keine Markierung von Laminin - Markierung von Koll. VII stromaseitig	
HH _p 4	regelmäßig	0,5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B - Flap vorhanden		
HH _p 5	regelmäßig	0,5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B - Flap vorhanden , z.T an stromale Schnittseite angelegt		
HH _p 6	regelmäßig	0,5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B - Flap vorhanden , z.T an stromale Schnittseite angelegt	- Keine Markierung von Laminin - Markierung von Koll. VII stromaseitig	
Humane Präparate HH_h					
HH _h 7	Erosio zentral	5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap		- Schnitt im Bereich der BM
HH _h 8	Erosio zentral	5	- Schnittverlauf partiell intraepithelial - Flap vorhanden, anhängend		- Schnitt entl. der B, einzelne zelluläre Überreste stromaseitig
HH _h 9	regelmäßig	6	Oszillation des Keratoms PDS stoppt nach der 1. Hälfte, HH verworfen.		
HH _h 10	unregelmäßig wellig	5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap - Einzelne Epithelzellreste stromaseitig		
HH _h 11	unregelmäßig wellig	5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap		
HH _h 12	unregelmäßig wellig	5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap		
HH _h 13	unregelmäßig wellig	5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap - Einzelne Epithelzellreste stromaseitig		

HH _h 14	unregelmäßig wellig	6	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap - Einzelne Epithelzellreste stromaseitig		
HH _h 15	unregelmäßig wellig	6	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap		
HH _h 16	unregelmäßig wellig	4	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap		
HH _h 17	unregelmäßig wellig	4	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap		
HH _h 18	regelmäßig	4,5	- Schnittverlauf partiell intraepithelial - ansonsten regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Flap vorhanden, anhängend	- Markierung von Laminin bds. des Schnittes - Markierung von Kollagen-VII nur stromaseitig	
HH _h 19	regelmäßig	4,5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Flap vorhanden, abgetrennt	- Markierung von Laminin bds. des Schnittes - Markierung von Kollagen-VII nur stromaseitig	
HH _h 20	unregelmäßig wellig	3,5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap		
HH _h 21	regelmäßig	3,5	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - kein Flap		
HH _h 22	regelmäßig	4	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Flap vorhanden, anhängend	- am Taschenrand Markierung von Lam. bds., von Koll. VII stromaseitig - nach zentral Lam. flapseitig, Koll. VII bds.	
HH _h 23	regelmäßig	4	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Flap vorhanden, anhängend	- Markierung von Laminin flapseitig - Markierung von Kollagen-VII bds.	
HH _h 24	regelmäßig	4	- Stromaler Einschnitt - Sonst Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Flap vorhanden, abgetrennt		
HH _h 25	unregelmäßig wellig	4	- Schnittverlauf regelmäßig im Bereich EB/B/BM - Kein Flap		

(Abkürzungen: EB: Epithelbasis, B: Basalmembran, BM: Bowman-Membran)

4 Diskussion

4.1 Eine alloplastische Variante der Epikeratophakie

Die hier vorliegenden Untersuchungen zum Schneideverhalten des Keratoms PDS stehen im Zusammenhang mit der Entwicklung eines neuen refraktiven Operationsverfahrens.

Ein synthetisches Lentikel, das *Onlay*, soll zwischen Epithel und Bowman-Membran in die Hornhaut implantiert werden, um auf diese Weise die korneale Krümmung zu modifizieren und Refraktionsfehler zu beseitigen. Es handelt sich also um eine *alloplastische Epikeratophakie*. Die Abtragung kornealer Substanz und ein Einschneiden in das Hornhautstroma soll vollständig vermieden werden und die Integrität der unter dem regenerationsfähigen Epithel gelegenen Hornhautschichten vollständig erhalten bleiben.

Die Implantation kornealer Onlays könnte zukünftig als Alternative zu den heute gängigen refraktiven Eingriffen, insbesondere zu den Excimerlaser-Verfahren wie LASIK und PRK, dienen, wenn es gelingt, dieses Konzept erfolgreich zu entwickeln und *in vivo* umzusetzen.

Nachfolgend sollen deshalb die grundlegenden Charakteristika einer Epikeratophakie diskutiert werden, sowie potentielle Vorteile, die hieraus für das neue Konzept einer alloplastischen Epikeratophakie erwachsen können - seine erfolgreiche Weiterentwicklung bis zur klinischen Anwendung vorausgesetzt.

4.1.1 Ein additives Verfahren

Ein Hauptmerkmal einer alloplastischen Epikeratophakie ist ihr *additiver* Charakter. Die Refraktionsänderung wird durch subepitheliale Addition eines Linsenkörperchens erzielt. Das korneale Stroma wird weder anteilig abgetragen, noch lamellierend eröffnet. Die Hornhaut bleibt somit in ihrer gesamten Dicke erhalten, was sich gegenüber den subtraktiven, laserchirurgischen Eingriffen als vorteilhaft erweisen könnte.

Die Entstehung einer *iatrogenen Keratektasie*, einer schweren, wenn auch seltenen Komplikation nach PRK und LASIK, sollte dadurch ausgeschlossen sein. Zur Keratektasie kommt es, wenn nach Excimerlaserabtrag von Hornhautstroma eine zu geringe Restdicke der Hornhaut verbleibt. Dann kann der intraokulare Druck eine Ausbeulung und damit Krümmungszunahme der destabilisierten Hornhaut hervorrufen (Seiler et al., 1998, S. 312). Die Gefahr einer Keratektasie ist bei vorbestehendem Keratokonus, bzw. seiner „*Forme fruste*“, sowie auch bei vorbestehender hoher Myopie gesteigert.

Zur Inzidenz der iatrogenen Keratektasie lassen sich keine genauen Angaben machen. In der Literatur finden sich diesbezüglich vor allem Einzelfallberichte und retrospektive Studien (Pallikaris et al., 2001, S. 1796). Unumstritten ist, dass die Inzidenz in hohem Maße von den Auswahlkriterien des Operateurs abhängt. Laut Randleman (2003, S. 267) ließen sich in einer

retrospektiven Auswertung keine Patienten mit iatrogener Keratektasie identifizieren, bei denen nicht präoperativ erkennbare Risikofaktoren (z. B. geringe Hornhautdicke, „*Forme fruste*“-Keratokonius, hohe Myopie) bestanden hätten.

Die Mindestdicke, bei deren Unterschreitung eine Keratektasie nach LASIK entsteht, ist nicht vollständig geklärt. Von den meisten Autoren wird jedoch eine Rest-Dicke des Stromabettes von mindestens 250 µm nach der Behandlung gefordert, um eine ausreichende biomechanische Festigkeit der Hornhaut zu gewährleisten (Seiler et al., 1998, S. 312). Eine präoperative Hornhautdicke von weniger als 500 µm gilt als Kontraindikation gegen eine LASIK (Kohnen, 2002, S: 2065).

Durch die Notwendigkeit einer ausreichenden Reststromadicke ist der Substanz-Abtrag in seinem möglichen Ausmaß begrenzt. Gemäß der Formel von Munnerlyn (1988, S. 46) ist die durch Laserablation erzielte Brechkraftänderung ΔP proportional zur Dicke der abladierten Stromalamelle a_0 :

$$a_0 = \Delta P \times d^2 \times 1/3$$

Hieraus folgt, dass auch das Ausmaß der refraktiven Korrektur ΔP begrenzt ist, das mit den subtraktiven Lasereingriffen erzielt werden kann. Aus demselben Grund sind diese Eingriffe auch nur eingeschränkt wiederholbar, da jede erneute Operation mit einem zusätzlichen Abtrag von Stroma und einer Reduzierung der verbleibenden Restdicke einhergeht. Man setzt heute die maximale, durch LASIK korrigierbare Myopie bei -8,0 bis -10,0 dpt an. Bei der Hyperopie, bei der im Zentrum kein Material abgetragen wird, liegen die Grenzen der Lasik bei ca. +3,0 bis +4,0 dpt (gemäß der Richtlinien der KRC, vgl. Kap. 1.4.6).

Für ein *additives* Verfahren wie die alloplastische Epikeratophakie sollten derartige Beschränkungen nicht bestehen. Dies zeigten schon die Erfahrungen mit der klassischen Epikeratophakie, die sogar zur Korrektur von Aphakien (im Mittel +15 dpt im Hornhautniveau) eingesetzt werden konnte (McDonald et al., 1987a, S. 358; Dullaert et al., 1994, S. 9).

Neben diesen Ergebnissen mit homoplastischen Lentikeln konnten auch durch Addition von synthetischen Lentikeln bereits operative Erfolge erzielt werden. So gelang es Steinert (1996, S. 135) mit alloplastischen, intrastromalen Inlays (vgl. Kap.1.4.5.3) Aphakien über einen postoperativen Beobachtungszeitraum von 2 Jahren erfolgreich zu korrigieren.

Ausgehend von diesen Erfahrungen sollte auch die alloplastische Epikeratophakie das Potential besitzen, höhergradige Ametropien auszugleichen. In dieser Eigenschaft könnte sie eine echte Alternative zu den Verfahren der refraktiven Linsen Chirurgie darstellen, die heute als operativer Standard beim Ausgleich von höheren Hyperopien ab +4,0 dpt und Myopien ab -8,0 dpt gelten (vgl. Kap. 1.4.6).

Im Gegensatz zur LASIK sollte auch eine zu geringe korneale Ausgangsdicke (weniger als 500 µm, z. B. bei Keratokonius bzw. seiner „*Forme fruste*“) keine Kontraindikation für die Implantation eines Onlays darstellen. Man könnte sich im Gegenteil sogar vorstellen, dass in solchen Fällen durch Onlays eine Stabilisierung des Stromas erreichbar ist.

4.1.2 Geringe Invasivität

Das vorliegende Konzept zur Implantation kornealer Onlays zeichnet sich gegenüber den etablierten refraktiven Operationsverfahren, mit denen es zukünftig konkurrieren soll, durch eine geringe Invasivität aus.

Die refraktive Korrektur soll bei der alloplastischen Epikeratophakie, im Gegensatz etwa zur LASIK, nicht intrastromal, sondern unmittelbar subepithelial an der Hornhautoberfläche vorgenommen werden. Lediglich das Epithel und die epitheliale Basalmembran werden im Rahmen der Operation in gewissem Umfang geschädigt. Diese Strukturen verfügen über eine sehr gute Regenerationsfähigkeit, so dass epitheliale Verletzungen in der Regel ohne zurückbleibende Narben abheilen. Die unter der epithelialen Basalmembran gelegenen Anteile, Bowman-Membran und Hornhautstroma, die bei Verletzung unter Narbenbildung abheilen (vgl. Kap. 4.3.1), bleiben hingegen unangetastet. Darin besteht ein Unterschied auch zu PRK, Epi-LASIK oder LASEK, also den refraktiven Lasereingriffen, bei denen die Ablation subepithelial vorgenommen wird.

Nach Implantation eines Onlay bleibt die Integrität der subepithelialen Hornhautanteile also vollständig erhalten. Das Onlay ließe sich bei Bedarf auch wieder entfernen. Nach Reepithelialisierung des dabei entstandenen epithelialen Defektes wäre die ursprüngliche Anatomie und Brechkraft wiederhergestellt, woraufhin gegebenenfalls ein neues Onlay implantiert werden könnte. Damit handelt es sich bei dem vorliegenden Konzept nicht nur um einen wiederholbaren, sondern auch um einen reversiblen Eingriff.

Die Reversibilität und die Wiederholbarkeit eines refraktiven Eingriffes sind insofern wünschenswert, als der dioptrische Apparat des Menschen während des Lebens fortlaufenden Veränderungen unterliegt, an welche die refraktive Korrektur wiederum anzupassen sein sollte. Hierzu zählen beispielsweise Veränderungen der Bulbuslänge, der kornealen Krümmungsradien oder eine Myopisierung durch eine beginnende Kernkatarakt.

Bei der Korrektur höhergradiger Ametropien wäre die alloplastische Epikeratophakie zudem eine Alternative zur *intraokularen* Linsen Chirurgie, die bei der Behandlung von höhergradigen Ametropien (über +4,0 dpt bzw. über -8,0 dpt) heute die einzige Korrekturmöglichkeit darstellt. Da bei der Implantation von Onlays der Bulbus nicht eröffnet wird, ist das Verfahren im Vergleich mit der Linsen Chirurgie weniger invasiv und damit risikoärmer. Ein Risiko für intraokulare Komplikationen, die von iatrogenen Verletzungen intraokularer Strukturen, über Netzhautablösungen bis hin zu schweren Endophthalmitiden (Lohmann et al., 1998, S. 821; Lohmann et al., 2000, S. 1047) reichen können, besteht deshalb nicht.

4.2 Korneale Onlays

4.2.1 Anforderungen an ein synthetisches Implantat

Unterschiedliche synthetische oder biosynthetische Materialien sind zur Herstellung eines kornealen Implantates vorstellbar. Je nach verwendetem Material ergeben sich *isorefraktive* oder *heterorefraktive* Lentikel. *Isorefraktive* Lentikel besitzen einen (annähernd) gleichen Brechungsindex wie das Hornhautstroma und beeinflussen die korneale Brechkraft daher ausschließlich durch Krümmungsänderung der Hornhautvorderfläche. Andererseits können *heterorefraktive* Implantate eingesetzt werden, deren Brechungsindex vom kornealen Stroma abweicht und die daher eine zusätzliche refraktive Wirkung haben. Sie könnten bei gleicher Brechkraft dünner als *isorefraktive* Lentikel sein.

Um durch Implantation eines Lentikels in die Hornhaut eine vorhersehbare und dauerhafte Korrektur erzielen zu können, sind bestimmte Anforderungen an ein solches Implantat zu stellen. Zunächst muß es eine hohe Transparenz besitzen, die dauerhaft im kornealen Milieu fortbesteht. Das Implantat muß biokompatibel sein, darf also nicht von Zellen des Immunsystems als fremd wahrgenommen werden. Andernfalls wären Abstoßungs- und Entzündungsreaktionen mit Gefäßeinsproßungen in das korneale Stroma bis hin zu einer vollständigen kornealen Dekompensation denkbar.

Ein Implantat muss sich durch Stabilität gegenüber kornealen Proteasen auszeichnen, um keiner enzymatischen Degradation zu unterliegen. Diese könnten einen Umbau des Implantates (*Remodeling*) und damit eine Änderung der Brechkraft nach sich ziehen.

Die Versorgung der Hornhaut mit Nährstoffen wie Glucose geschieht zum überwiegenden Teil aus dem Kammerwasser und somit durch Diffusion, die vom Endothel zum Epithel gerichtet ist. Maximal 20% des Glucosebedarfs kann durch Diffusion aus den limbalen Blutgefäßen gedeckt werden. Der Tränenfilm enthält hingegen keine relevanten Mengen von Glucose (Bock & Maumenee, 1953, S. 282; Thoft et al., 1971a, S. 467; Thoft et al., 1971b, S. 685). Hieraus folgt, dass ein korneales Implantat eine ausreichende Porosität und Permeabilität besitzen muß, um einen ausreichenden Nährstofftransport vom Stroma zum Epithel hin zuzulassen. Ebenso darf ein intrakorneales Implantat die Sauerstoffversorgung nicht unterbinden, welche in umgekehrter Richtung durch Diffusion von der Hornhautoberfläche in das Stroma erfolgt (Holden & Mertz, 1984, S. 1161; Holden et al., 1984, S. 476).

Das Vorliegen von Poren ist auch erforderlich, um die korneale Sensibilität nach dem refraktiven Eingriff wiederherzustellen. Sensible Nervenendigungen, welche beim Implantationsvorgang durchtrennt worden sind, müssen in das Lentikel einsprossen und dieses durchwandern können, um sich schließlich im Bereich der epithelialen Basalmembran und zwischen den Basalzellen zu verzweigen.

Ein Onlay darf weiterhin die Re-Epithelialisierung der Oberfläche nicht stören. Nur dadurch lässt sich sein dauerhafter Verbleib gewährleisten. Auch schützt ein intaktes Epithel vor dem Eindringen von Keimen in die Hornhaut.

Schließlich muß die Explantation kornealer Implantate zu einem späteren Zeitpunkt ohne Schädigung der angrenzenden Hornhautschichten möglich sein, um den refraktiven Eingriff reversibel und wiederholbar zu machen.

4.2.2 Geschichte der Entwicklung synthetischer Hornhautimplantate

Viele Ophthalmologen haben bis heute an der Entwicklung und Herstellung intrakornealer Implantate gearbeitet. Biologische Lentikel wurden aus humanen Spenderhornhäuten hergestellt (Epikeratophakie und Keratophakie, vgl. Kap. 1.4.5). Diese waren nicht langfristig biostabil, da sie einer enzymatischen Degradation durch die Proteasen der Empfänger-Keratozyten unterlagen. Hierdurch ergab sich häufig eine ausgeprägte *Regression*, also das Nachlassen des refraktiven Effektes. Die Korrektur der Brechkraft war dadurch ungenau und vor dem Eingriff nur bedingt kalkulierbar. Weitere Nachteile bei der Verwendung von humanem Spendermaterial bestanden im schwierigen Herstellungsverfahren auf der Drehbank und in der begrenzten Verfügbarkeit von Spenderhornhäuten (vgl. Kap.1.5.2).

Auch andere biologische Materialien wurden zur Herstellung kornealer Implantate verwendet und im Tierexperiment untersucht. Bezüglich der Anfälligkeit gegenüber enzymatischen Um- und Abbauvorgängen zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei der Verwendung von Hornhaut-Lentikeln. Dupont entwickelte Inlays aus humanem plazentarem *Kollagen-IV*. Diese erwiesen sich bei Implantation in Hunde-Hornhäute zwar als biokompatibel (Dupont et al., 1989, S. 251), nach längeren Beobachtungsintervallen ließ sich jedoch im Randbereich solcher Implantate ultrastrukturell ein Abbau durch korneale Proteasen nachweisen (Thompson et al., 1991, S. 240; Thompson et al., 1993, S. 35).

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde bereits in den 1950er und 60er Jahren an der Entwicklung synthetischer Alternativen gearbeitet. Im Tierexperiment wurden wasserundurchlässige, starre PMMA-Linsen untersucht, welche intrastromal implantiert wurden. Mit diesen traten Abstoßungsreaktionen und ausgeprägte trophische Störungen der vorderen Hornhautlamelle auf, sowie Druckatrophien und reaktive Trübungen im angrenzenden Stroma (Barraquer, 1966, S. 53; Choyce, 1966, S. 507; Choyce, 1968, S. 295). Bei Verwendung fenestrierter Lentikel waren die trophischen Schäden geringer.

Choyce und andere experimentierten mit *Polysulfon*-Implantaten (Choyce, 1985, S. 332; Kirkness & Steele, 1985, S. 811). Aufgrund des hohen Brechungsindex dieses Polymers von 1,633 versprach man sich refraktive Korrekturen mit sehr dünnen Lentikeln, welche die Krümmung der Hornhautoberfläche nicht wesentlich verändern (McCarey et al., 1987; Lane et al., 1986, S. 50). Der Einsatz dieses Materials wurde in verschiedenen tierexperimentellen Modellen sowie auch in klinischen Studien an humanen Hornhäuten erprobt. Wie schon bei PMMA traten bei Verwendung solider Polysulfon-Implantate in klinischen Langzeitbeobachtungen Epithelschäden, ausgeprägte stromale Trübungen und Ablagerungen vor dem Implantat auf, selten auch aseptische Nekrosen des vorderen Stromas (Climenhaga et al., 1988, S. 818; Deg & Binder, 1988, S. 506; Rodrigues et al., 1990, S. 32; Horgan et al., 1996, S. 1045).

Nach Fenestrierung der Lentikel wurden diese durch mangelnde Nährstoffversorgung bedingten Veränderungen in geringerem Maße beobachtet.

Als besonders vielversprechend galten Lentikeldesigns aus hydrophilen Gelen, den so genannten *Hydrogelen*, die für Wasser, Elektrolyte, Glucose und Moleküle des Citratzyklus permeabel sind (Refojo, 1969, S. 333; Dohlman et al., 1967, S. 252). Aus solchen Hydrogelen waren bereits zu Beginn der 1970er Jahre erfolgreich flexible Kontaktlinsen hergestellt worden.

Mester implantierte Lentikel aus hydrogelem HEMA (*Hydroxy-Ethyl-Meth-Acrylat*) in Kaninchen-Hornhäute (Mester et al., 1974, S. 326; Mester et al., 1978, S. 207). Trophische Störungen der vorderen Hornhautlamelle und Immunreaktionen wurden über einen Zeitraum von 6 Wochen postoperativ nicht beobachtet. Zudem entsprachen die postoperativen Refraktionsänderungen den präoperativen Erwartungen. In-vitro-Versuche zeigten eine gute Permeabilität für Glucose.

Auch McCarey et al. (1982, S. 29) implantierten Hydrogel-Lentikel in Kaninchen-Hornhäute und berichteten über einen Beobachtungszeitraum von 11 Monaten über anhaltende Transparenz der Implantate. Histologisch ließen sich bei den anfänglich verwendeten Lentikelversionen im Bereich der Implantatränder häufiger stromale Ausdünnungen beobachten (McCarey & Andrews, 1981, S. 107), seltener Keratitiden mit der Entstehung von Vaskularisationen, die bis hin zu Ulzerationen und zur Extrusion der Implantate führten (Ohrloff et al., 1984, S. 422). Durch Veränderung des Lentikeldesigns, besonders im Bereich der Implantatränder, konnte das Auftreten solch schwerer Komplikationen deutlich reduziert werden (Beekhuis et al., 1986, S. 192).

Werblin implantierte Hydrogel-Lentikel erstmalig in Hornhäute von Primaten (Werblin et al., 1984a, S. 1127; Werblin et al., 1984b, S. 197). Sie waren über eine Dauer von 5-8 Jahren biokompatibel und anhaltend transparent (Werblin et al., 1992b, S. 12; McDonald et al., 1993, S. 213), so dass erste in-vivo-Versuche an humanen Hornhäuten folgten. Auch hier waren die Hydrogele biokompatibel (Werblin et al., 1992a, S. 23; Steinert et al., 1996, S. 135; Keates et al., 1995, S. 519).

Bei Langzeitbeobachtungen an Tier und Mensch traten dezente stromale Trübungen auf. Histologisch fand sich eine Verdünnung des Epithels (Yamaguchi et al., 1984, S. 1170), eine Abnahme der Keratozytenzahl (Peiffer et al., 1985, S. 1294), vakuolige Einschlüsse in den Keratozyten (Parks & McCarey, 1991, S. 216), kristalline und lipoidale Einlagerungen (Parks et al., 1993, S. 29; Rodrigues et al., 1990, S. 32), sowie eine erhöhte Fibroblastenaktivität in der Umgebung der Implantate (McDonald et al., 1993, S. 213). Epitheliale Einschlüsse, die gelegentlich im Interface zwischen Stroma und Implantat nachweisbar waren (Beekhuis et al., 1987, S. 116; Alio et al., 2004, S. 1441), wurden mit dem intraoperativen Einschleppen von Epithelzellen, etwa bei Ausführung des lamellären Keratomschnittes oder beim Einbringen des Lentikels, erklärt.

4.2.3 Stand der Entwicklung synthetischer Hornhautimplantate

In den letzten Jahren entstanden einige Arbeiten über die korneale Nährstoffversorgung nach Lentikelimplantation. Dies geschah mit dem Ziel, den nutritiven Bedürfnissen des vorderen Stromas und des Epithels Rechnung zu tragen. Sweeney et al. (1998, S. 284) konnten zeigen, dass intrastromale Membranen eine bestimmte Porengröße und -dichte aufweisen müssen, um den Nährstoffbedarf der vorderen Hornhautanteile sicherzustellen. Der experimentell ermittelte, notwendige Porendurchmesser lag mit 100 nm deutlich über dem Wert, der für die Diffusion von kleinen Molekülen wie Glucose erforderlich gewesen wäre. Sie folgerten daher, dass korneale Implantate die Passage deutlich größerer Moleküle als Glucose zulassen müssen, um die dauerhafte Integrität des Epithels und vorderen Stromas sicherzustellen.

In den letzten Jahren wurden Implantate aus verschiedenen neuen Hydrogel-Polymeren mit hohem Wassergehalt und verbesserter Nährstoff-Permeabilität entwickelt, die teils im Tierversuch, teils bei menschlichen Probanden eingesetzt wurden (Ismail, 2002, S. 527; Peyman et al., 2005, S. 389). Sweeney und Mitarb. (2008, S. 56) entwickelten ein Fluoropolymer, das so genannte *Perfluoropolyether* (PFPE), welches nach tierexperimentellen Studien bei Kaninchen, Katzen und Schweinen bereits als Inlay im Rahmen einer klinischen Phase-1-Studie untersucht wurde.

Die neuen Materialien besaßen über Beobachtungszeiträume von bis zu 2-3 Jahren hin eine hohe Biostabilität und Biokompatibilität. Entzündungsreaktionen und Vaskularisationen blieben aus. Es wurde lediglich die Ausbildung von geringgradigem Haze beobachtet (Petroll et al., 2006, S. 1119; Sweeney et al., 2008, S. 56). Histologisch zeigte sich an Kaninchenhornhäuten mit PFPE-Inlays eine leicht reduzierte Epithelhöhe mit durchschnittlich fünf Zellschichten (gegenüber normalerweise sechs) und eher kubischen anstatt der normalerweise hochprismatischen Basalzellen.

Die Anforderungen an Biostabilität, Biokompatibilität sowie ausreichende Permeabilität für Nährstoffe wurden genannt. Wenn ein künstliches Lentikel nicht intrastromal, sondern als Onlay unmittelbar unter das korneale Epithel implantiert wird, muß es darüber hinaus eine rasche Epithelialisierung seiner Oberfläche und dauerhaft die Adhäsion des Epithels und dessen mehrschichtigen Zusammenhalt ermöglichen. Bei der anfänglichen Verwendung unbeschichteter Hydrogel-Implantate im Rahmen einer alloplastischen Epikeratophakie ließ sich in vivo keine ausreichende Epithelialisierung erzeugen (McDonald, 1988, S. 158).

Deshalb wurde an der Entwicklung verschiedener Oberflächenmodifikationen gearbeitet (Latkany et al., 1997, S. 29; Trinkaus-Randall et al., 1997, S. 1185; Merrett et al., 2001, S. 647). In-vitro-Experimente deuteten daraufhin, dass ein Onlay grundsätzlich porös sein muss, damit sich an seiner Oberfläche ein mehrschichtiger Epithelzellverband mit hemidesmosomalen Anheftungskomplexen ausbilden kann (Dalton et al., 1999, S. 384). Entscheidend scheint dabei die Größe und Dichte der Kontinuitätsunterbrechungen. Poren von 100 nm, wie sie für den Nährstofftransport erforderlich sind, waren in vitro kein Hindernis für die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels (Evans et al., 1999, S. 485; 2003, S. 357). Poren mit einem Durchmesser über 1 µm wirkten sich hingegen auf die Epithelialisierung ungünstig aus.

Besonders viel versprechende Ergebnisse konnten *in vivo* mit porösen Oberflächen erzielt werden, die zusätzlich mit Kollagen-I beschichtet sind (Sweeney et al., 2003, S. 3301).

Es konnte gezeigt werden, dass sich eine derartige Beschichtung (*Coating*) nicht negativ auf die Nährstoffdiffusion durch ein korneales Implantat auswirkt (Xie et al., 1999, S. 335). Bei Versuchen an felines Hornhäuten konnte eine schnelle Epithelmigration auf der Oberfläche Kollagen-I-beschichteter Onlays aus PFPE nachgewiesen werden (Evans et al., 1998, S. S40; 2000, S. 1674). Es bildete sich ein mehrschichtiges Epithel, das über eine mehrwöchige Studiendauer erhalten blieb. Die Zahl der Zellschichten war mit 5 (gegenüber den 10-12 Schichten des normalen felines Hornhautepithels) allerdings reduziert. Im Interface von Epithel und Onlay ließen sich immunhistochemisch die Basalmembranbestandteile *Laminin* und *Kollagen-VII* nachweisen, sowie elektronenmikroskopisch die Ausbildung einer Basalmembran und hemidesmosomaler Plaques.

Weitere Studien zur Implantation der aktuellen Lentikelmodelle insbesondere in humane Hornhäute werden erforderlich sein. Dabei wird insbesondere zu prüfen sein, ob diese, anders als frühere Implantatversionen, dauerhaft die vorderen Hornhautanteile mit Nährstoffen versorgen können. Ihre beständige Biokompatibilität hängt hiervon maßgeblich ab.

Mehr Erfahrungen – bis hin zu klinischen Phase-1-Studien – konnten bisher mit synthetischen Lentikeln als *Inlays* gesammelt werden. Ob die Erfahrungen auf beschichtete *Onlays* übertragbar sind, und letztere die fortbestehende Adhäsion eines intakten Epithelzellverband und dessen Versorgung mit Nährstoffen gewährleisten können, werden klinische und histologisch-ultrastrukturelle Langzeituntersuchungen zeigen müssen.

4.3 Erzeugung einer subepithelialen Tasche

Neben den genannten Anforderungen an dauerhaft subepithelial bzw. epistromal positionierte synthetische Lentikel ist die Herstellung einer subepithelialen Hornhauttasche zur Unterbringung und Befestigung des Lentikels die herausfordernde Voraussetzung für den Erfolg des neuen operativen Ansatzes einer alloplastischen Epikeratophakie. Dieser erste Schritt wurde deshalb in dieser Arbeit untersucht.

Es war daher die Aufgabe dieser Arbeit, das Schneideverhalten eines neuen Keratoms, des Pocket-Delaminator-Systems, zu untersuchen, mit dem in der Hornhaut eine solche subepitheliale Tasche für korneale Onlays erzeugt werden soll. Die Anforderungen, die an die Herstellung einer derartigen Tasche gestellt werden, sollen nachfolgend dargelegt werden.

Zunächst soll dabei auf die Besonderheiten der kornealen Wundheilung eingegangen werden. Denn Wundheilungsvorgänge haben nach refraktiven Eingriffen einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß und die Dauerhaftigkeit der erzielten Korrektur sowie auf die fortbestehende Transparenz der Hornhaut.

4.3.1 Wundheilungsvorgänge in der Hornhaut

Während rein epitheliale Läsionen der Hornhaut in der Regel reversibel sind, führen Verletzungen von Bowman-Membran und Hornhautstroma zu einem Verlust des ursprünglichen, regelmäßigen Aufbaus dieser Anteile. Die zugrunde liegenden Wundheilungsvorgänge lassen sich in epitheliale und stromale Prozesse unterteilen, die miteinander in enger Verbindung stehen.

Bei einer epithelialen Schädigung werden Zytokine und Wachstumsfaktoren wie *Interleukin-1* (IL-1), *Tumor-Nekrose-Faktor α* (TNF- α), der *epitheliale Wachstumsfaktor* (EGF) und der *transformierende Wachstumsfaktor β* (TGF- β) von Epithelzellen ausgeschüttet (Mohan et al., 1997, S. 575; Jester et al., 2002, S. 645). Sie lösen nach Bindung an Rezeptoren benachbarter unbeschädigter Epithelzellen eine Zellmigration zum Epitheldefekt aus, wodurch dieser zunächst mit einer einschichtigen Zell-Lage gedeckt wird (Suzuki et al., 2003, S. 113). Ebenfalls Zytokin-vermittelt proliferieren und differenzieren sich die Zellen und bilden dann wieder einen mehrschichtigen Verband. Falls auch die Basalmembran geschädigt wurde, wird die Adhäsion des Epithels durch Neusynthese von Basalmembran-Bausteinen wie Fibronektin und Laminin wiederhergestellt. Hierfür scheint insbesondere EGF von Bedeutung zu sein, dass an EGF-Rezeptoren der Basalzellen bindet (Suzuki et al., 2000, S. 2495; Kurpakus et al., 1999, S. 106).

Der Stimulus für diese epithelialen Regenerationsvorgänge korreliert dabei mit der Größe des epithelialen Defektes (Netto et al., 2005, S. 509). Daher können bei großflächigen Defekten überschießende Reaktionen beobachtet werden. Vorübergehend wird ein hyperplastisches Epithel aufgebaut, das auch längerfristig persistieren kann (Marshall et al., 1988, S. 1411; Hanna et al., 1989, S. 895; Del Pero et al., 1990, S. 419; Fantès et al., 1990, S. 665; Lohmann et al., 1991, S. 173). Liegt ein zentraler Defekt zugrunde, kann durch Hyperplasie die zentrale Epitheldicke und damit auch die Hornhautkrümmung zunehmen (Simon et al., 1993, S. 42; Patel et al., 1995, S. 100; Lohmann et al., 1996, S. 368).

Neben den epithelialen Veränderungen treten auch im Stroma Wundheilungsvorgänge auf. Die von Epithelzellen ausgeschütteten Zytokine, insbesondere das IL-1, aktivieren Keratozyten und beeinflussen damit maßgeblich die nachfolgend beschriebene stromale Wundheilung (Kim et al., 1999, S. 1364; Wilson et al., 1999b, S. 293). Auch das Tränensekret enthält Zytokine, die aufgrund der fehlenden epithelialen Barrierefunktion ungehindert in das Stroma gelangen (Wilson et al., 1999a, S. 2185). Je größer dabei der zugrunde liegende Epitheldefekt ist, desto intensiver fällt die stromale Reaktion auf die Verletzung aus.

Innerhalb der ersten Stunden nach Verletzung lassen sich im Bereich der Läsion Apoptosen von Keratozyten beobachten. Ein Peak tritt nach etwa 4 h auf (Helena et al., 1998, S. 276). Später entstehen Keratozyten-Nekrosen (Wilson et al., 2001, S. 625).

Nach 12 bis 24 h proliferieren die Keratozyten in der Umgebung des Defektes und wandern in das betroffene Stromaareal ein. Sie geben Chemokine wie den *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) ab, durch den Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten und Monozyten aus limbalen Gefäßen und möglicherweise aus dem Tränenfilm angelockt werden

(O'Brien et al., 1998, S. 1470). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass diese Chemokine vermehrt exprimiert werden, wenn Keratozyten zuvor durch IL-1 aktiviert worden sind (Hong et al., 2001, S. 2795).

Im Stroma treten weiterhin so genannte *Myofibroblasten* auf. Es wird angenommen, dass sie sich unter dem Einfluß des epithelial sezernierten TGF- β aus Keratozyten differenzieren. Sie zeichnen sich gegenüber letzteren durch Kontraktilität und eine geringere Transparenz aus. Sie sind sehr stoffwechselaktiv und produzieren in größeren Mengen Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrixmoleküle wie Kollagen, Glykosaminoglykane sowie Kollagenasen. Dadurch tragen sie zu einer Neubildung von extrazellulärer Matrix bei, die gegenüber dem normalen regelhaft lamellären Stroma durch einen ungeordneten Aufbau charakterisiert ist. Insbesondere konnte eine starke Anhäufung von Kollagen-IV experimentell beobachtet werden. Abhängig davon, wie viele Keratozyten in Myofibroblasten umgewandelt werden, kann im Rahmen dieses *Remodeling* die Dicke des Stromas in relevantem Maße zunehmen. Dies kann, wie eine Epithelhyperplasie, eine Änderung der zentralen Hornhautbrechkraft nach sich ziehen. Außerdem verliert die Hornhaut durch die geringere Lichtdurchlässigkeit der Myofibroblasten selbst sowie durch die Umbauvorgänge der Extrazellulärschicht an Transparenz. Die Anhäufung von Kollagen-IV scheint hier ursächlich beteiligt zu sein (Chen et al., 2005, S. 79). Diese Trübung wird nach refraktiven Eingriffen als „Haze“ (Dunst) bezeichnet.

Eine Beeinflussung zwischen epithelialen und stromalen Prozessen erfolgt auch in umgekehrter Richtung. Denn aktivierte Keratozyten und Myofibroblasten produzieren Zytokine wie den *Keratinocyte Growth Factor* (KGF), die wiederum die Epithelzellproliferation fördern.

Die Rolle der epithelialen Basalmembran im Rahmen der Wundheilung ist nicht vollständig geklärt. Sie begünstigt die Migration aktivierter Epithelzellen und damit den Verschluss epithelialer Läsionen (Fujikawa et al., 1984, S. 128; Zieske et al., 1987, S. 1668; Ebihara et al., 2000, S. 69). Des Weiteren scheint eine intakte Basalmembran auch eine modulierende Wirkung auf die epithelial-stromalen Interaktionen zu besitzen, indem sie beispielsweise die epitheliale Abgabe von TGF- β und damit die Aktivierung von Myofibroblasten hemmt (Fini & Stramer, 2005, S. S2; Stramer et al., 2003, S. 4237).

Für eine aktive Funktion der zellfreien Bowman-Membran findet sich in der Literatur kein Anhalt. Da ihr Vorhandensein die Diffusionsstrecke für die Zytokine verlängert, könnte ihr dennoch eine hemmende Wirkung auf überschießende Wundheilungsvorgänge zukommen (Obata & Tsuru, 2007, S. S82).

4.3.2 Korneale Wundheilung nach refraktiver Chirurgie

Die beschriebenen Vorgänge der kornealen Wundheilung werden regelmäßig, wenn auch in unterschiedlicher Intensität, nach refraktiver Hornhautchirurgie beobachtet. Sie können je nach zugrunde liegender Ametropie zu Über- oder Unterkorrekturen führen. Bei der myopen LASIK werden beispielsweise zentrale Anteile des Stromas mit dem Laser ablatiert, um dadurch die Hornhautkrümmung zu reduzieren. Wenn dieser Effekt durch eine Epithelhyper-

plasie oder ein Remodeling des Stromas im Zentrum der Hornhaut teilweise aufgehoben wird, resultiert eine Unterkorrektur, die dann als *Regression* bezeichnet wird.

Durch Umbauvorgänge im Stroma, Neubildung von ungeordneter Extrazellulärsubstanz und die Existenz vieler Myofibroblasten, kann zudem die Transparenz der Hornhaut beeinträchtigt werden. Die Trübung, die dann beobachtet werden kann, wird als Haze (Dunst) bezeichnet.

Für die Laserverfahren konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Regression, als auch ein Haze-Phänomen bei der PRK häufiger und ausgeprägter sind als bei der LASIK (Pallikaris & Siganos, 1994, S. 498; Van Gelder et al., 2002, S. 462). Nach der PRK, bei der das Epithel im Ablationsbereich großflächig abgetragen wird, wird bei der Re-Epithelialisierung der Hornhautmitte zumindest vorübergehend ein hyperplastisches Epithel aufgebaut. Die Hyperplasie persistiert bei einigen Individuen dauerhaft, was durch die Größe des anfänglich erzeugten Epitheldefektes erklärt wird (Marshall et al., 1988, S. 1411; Hanna et al., 1989, S. 895; Del Pero et al., 1990, S. 419; Fantès et al., 1990, S. 665; Lohmann et al., 1991, S. 173). Demgegenüber entsteht bei der LASIK nur ein kleiner, peripherer Epitheldefekt im Randbereich des Flaps.

Die ausgeprägteren, regenerativen Prozesse nach PRK werden unter anderem darauf zurückgeführt, dass nach Ablation der Bowman-Membran ein unmittelbarer Kontakt zwischen sich regenerierendem Epithelzellen und den ebenfalls aktivierten Keratozyten entsteht. Die wechselseitige Aktivierung über Zytokine wird hierdurch verstärkt (Mohan et al., 2003, S. 71).

Die Entfernung der epithelialen Basalmembran, der eine hemmende Wirkung auf die Entstehung von Myofibroblasten und damit des *Haze* zugesprochen wird (Stramer et al., 2003, S. 4237), bildet einen weiteren Erklärungsansatz. Dementsprechend konnten morphologische Studien zeigen, dass bei der LASIK ein dezenter *Haze* nur im Randbereich des Flaps auftritt, wo er wiederum mit Brüchen in der Basalmembran vergesellschaftet ist (Ivarsen et al., 2003, S. 1272).

4.3.3 Konsequenzen für die Erzeugung einer subepithelialen Tasche

Aus den Kenntnissen über die korneale Wundheilung und ihre Bedeutung für das Langzeit-Ergebnis refraktiver Eingriffe lassen sich einige Forderungen für die erfolgreiche Herstellung einer subepithelialen Tasche ableiten.

Eine Schädigung von Epithelzellen einerseits und von Keratozyten andererseits sollte weitestgehend vermieden werden, um eine Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu verhindern. Anderenfalls könnten überschießende korneale Wundheilungsvorgänge mit epithelialer Hyperplasie und einem Remodeling des Stromas auftreten, die die Brechkraft der Hornhautmitte verändern könnten. Eine postoperative Unter- oder Überkorrektur je nach zugrunde liegender Fehlsichtigkeit wäre die Folge. Durch Aktivierung von Myofibroblasten könnte sich zudem ein Haze ausbilden, der die Sehschärfe einschränkt.

Wenn die *alloplastische Epikeratophakie* in vollem Umfang dem Anspruch gerecht werden soll, reversibel zu sein, ist außerdem zu fordern, dass die Bowman-Membran und das Horn-

hautstroma bei Erzeugung der subepithelialen Tasche intakt bleiben. Denn Verletzungen dieser Anteile gehen mit einem Verlust des ursprünglichen, regelhaften Aufbaus und einer Narbenbildung einher. Wie die Erfahrungen mit *Epi-Keratomen* zeigen, muss ein unerwünschter Einschnitt in das Stroma zwar nicht zwangsläufig eine optisch relevante Narbe verursachen (Kim et al., 2006, S. 1759). Es ist jedoch denkbar, dass Epithelzellen mit der Klinge in das Keratozyten-haltige Stroma implantiert werden. Das würde wiederum intensive Wundheilungsvorgänge induzieren.

Der Erhalt der Bowman-Membran erscheint wünschenswert. Zwar zeigen die Erfahrungen mit der PRK, dass der Verlust der Bowman-Membran keine dauerhafte Funktionseinschränkung der Hornhaut nach sich zieht (Wilson & Hong, 2000, S. 417). Dennoch könnte die Bowman-Membran möglicherweise eine Bedeutung als physiologische Barriere in der Hornhaut haben, indem sie durch Verlängerung der Diffusionsstrecke für Zytokine überschießende, regenerative Prozesse zu verhindern hilft (Obata & Tsuru, 2007, S. S82).

4.3.4 Weitere Anforderungen an die Erzeugung einer Hornhaut-Tasche

Bei der Herstellung einer Hornhaut-Tasche sollte der Epithelzellverband in seiner Gesamtheit von der Hornhaut abgeschert und nicht durch einen zu oberflächlichen Keratomschnitt durchtrennt werden. Dies ist unabhängig von zuvor genannten, überschießenden Wundheilungsvorgängen zu fordern, die durch Epithelverletzungen induziert werden können.

Würde das Keratom durch die Epithelzellschicht hindurch schneiden oder befänden sich nach dem Schneidevorgang zumindest einzelne intakte Basalzellen *stromaseitig* des Keratomschnittes, so würden diese Zellen später unter dem Onlays liegen. Es ist denkbar, dass sich ein unter dem Implantat eingeschlossenes Epithel durch geänderte metabolische Bedingungen ähnlich degenerativ verändern würde, wie dies beim so genannten *epithelialen Einwachsen* (*epithelial ingrowth*) der Fall ist. Dies ist eine seltene Komplikation nach LASIK, bei der Epithelzellen vom Rand des Flaps in das Flap-Interface vor wachsen (Wang & Maloney, 2000, S. 746; Knorz, 2002, S. 242) und dort Eintrübungen verursachen. Histologische Untersuchungen konnten zeigen, dass die eingewachsenen Epithelzellen, unter anderem metabolisch bedingt, degenerieren (Naoumidi et al., 2003, S. 950). Die zunächst normal konfigurierten Zellen verlieren ihre typische Morphologie und ihre geschichtete Anordnung. Im Laufe von Monaten nehmen die zellulären Anteile und die Zahl ihrer Zell-zu-Zell-Kontakte ab, während gleichzeitig amorphe Grundsubstanz und Kollagenfasern narbenartig um die zellulären Überreste angehäuft werden. Klinisch gehen diese Veränderungen anfänglich mit einer leichten Trübung und perlenartigen Epithel-Einschlüssen einher. Später zeigen sich dichtere weißlich-flächige Trübungen (Asano-Kato et al., 2005, S. 130).

Würden bei der alloplastischen Epikeratophakie Epithelzellen unter dem Onlay liegen, könnten die eingeschlossenen Zellen also möglicherweise aufgrund der veränderten metabolischen Situation ihren geschichteten Zusammenhalt verlieren und sich degenerativ verändern. Somit könnte eine Trübung im Interface entstehen.

Der Epithelzellverband soll im Rahmen der alloplastischen Epikeratophakie auch mechanische Funktion übernehmen. Er bildet die äußere Begrenzung der Hornhauttasche und muss als solche dem Onlay einen ausreichenden Halt bieten. Würde das Epithel beim Schneidevorgang des Keratoms verletzt, wäre die Tasche wahrscheinlich nicht mehr ausreichend stabil, um ein Onlay zu implantieren. Es ist denkbar, dass eine solche Tasche bereits beim Implantationsversuch oder im weiteren Verlauf einreißt und damit das Onlay verloren geht.

Auch Einschnitte in das korneale Stroma sollten möglichst vermieden werden. Dies lässt sich einerseits dadurch begründen, dass durch Verletzung von Keratozyten oben beschriebene Wundheilungsvorgänge angestoßen werden. Zum anderen könnte ein tieferes Eindringen der Keratomklinge die *Formstabilität* der Hornhaut gefährden und eine unzureichende Resthornhautdicke verursachen. Folglich könnte eine iatrogene Keratektasie entstehen, wie sie selten nach LASIK, bei einem zu starken Substanzabtrag oder zu tiefem Verlauf des Keratomschnittes, beobachtet wird (vgl. 4.1.1).

4.4 Schneideverhalten des Pocket-Delaminator-Systems

4.4.1 Beurteilung der technischen Handhabbarkeit des PDS

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste Erfahrungen in der Anwendung des PDS als Keratom für die refraktive Chirurgie gesammelt werden.

Dabei erwies sich seine Handhabbarkeit als einfach. Der Zusammenbau sowie das Zerlegen des Keratoms in seine Einzelkomponenten gestaltete sich vor jeder neuen Anwendung problemlos und war schnell und zuverlässig durchführbar.

Durch die Möglichkeit der getrennten Sterilisierung der einzelnen Bestandteile, namentlich des Schneidekopfes, des Saugringes und des Klingenhalters mit Klinge, erfüllt das PDS insbesondere die hygienischen Anforderungen, die an ein routinemäßig im klinischen Alltag anwendbares Keratom gestellt werden müssen.

Im Hinblick auf einen dauerhaft gleichbleibenden Schneidevorgang ist zu fordern, dass Schnitt-relevante Parameter des PDS, wie die Schärfe der Klinge, ihr Auftreffwinkel auf die Hornhaut, oder die Gleichmäßigkeit der transversalen Oszillationen des Klingenhalters, auch bei regelmäßiger bis hochfrequenter Anwendung keinen Veränderungen unterliegen. Dies ist nur bei hochgradiger Formstabilität der während des Schneidevorgangs aneinander entlang gleitenden PDS-Komponenten zu gewährleisten.

Es wird daher weiterhin zu prüfen sein, ob, oder nach wievielen Einsätzen, reibungsbedingte Abnutzungserscheinungen bzw. Formveränderungen am metallischen Schneidekopf auftreten, die durch die oszillierende Einheit aus Klingenhalter und Klinge einerseits oder den Saugring andererseits verursacht werden könnten. Umgekehrt könnten im Dauergebrauch solche Veränderungen auch an den dem Schneidekopf zugewandten Kontaktflächen des Saugringes entstehen.

Eine gleichmässige Schärfe der PDS-Klinge sollte dauerhaft dadurch gewährleistet sein, dass es sich bei der Einheit aus Klingenthaler und Stahlklinge um eine Einwegkomponente handeln soll.

Lediglich an einem humanen Bulbus lief der Schneidevorgang mit dem PDS aufgrund eines technischen Defektes nicht ordnungsgemäß ab. Es handelte sich hierbei am ehesten um einen Fehler in der Elektronik, der aber nicht als systematisch angesehen wird. Es sollte dennoch ein Ziel bei der weiteren Entwicklung des PDS auf dem Wege zur klinischen Anwendbarkeit sein, derartige technische Aussetzer weitestgehend zu eliminieren.

4.4.2 Möglichkeiten und Grenzen des Hornhautmodells zur Evaluation des PDS

4.4.2.1 Porkine Hornhäute als Modell

In Rahmen dieser Arbeit fanden Schweinehornhäute als präklinisches Modell Anwendung. Sie sind mit 700-800 µm dicker als humane Hornhäute. Ihr Epithel ist ebenfalls dicker und zeigt in der Regel einen 6- bis 9-schichtigen Aufbau (Ehlers, 1970, S. 161; Merindano et al., 1998, S. 105).

Eine wie beim Menschen eindeutig vom Hornhautstroma abgrenzbare, zellfreie Bowman-Membran ist beim Schwein nicht oder nur andeutungsweise vorhanden (Camber et al., 1987; Merindano et al., 2002). Eine scharfe, mikroskopisch sichtbare Grenze zwischen ungeordneten Kollagenfibrillen einer Bowman-Membran und der streng lamellären Fibrillen-Anordnung im angrenzenden oberflächlichen Stroma liegt jedenfalls nicht vor. Dennoch gehen auch beim Schwein, wenn auch weniger abrupt, die Kollagenfasern im oberflächlichen, an die epitheliale Basalmembran angrenzenden Stroma in einen zunehmend ungeordneten und stärker verflochtenen Verlauf über. Auch die für die Bowman-Membran typischen Verankerungsfilamente aus Kollagen-VII sind in diesem Bereich der porkinen Kornea nachweisbar.

Dieser strukturelle Unterschied sowie ein etwas höherer Wassergehalt der Schweinehornhaut wurden von Wilmes und Mitarb. (Wilmes et al., 1992, S. 147) als Erklärungsansätze für die höhere Elastizität und den geringeren Schneidewiderstand gegenüber LASIK-Keratomklingen angeführt, welche porkine im Vergleich mit humanen Hornhäuten experimentell offenbarten. Im Einklang hiermit stehen Ergebnisse anderer In-vitro-Experimente, bei denen isolierte porkine Hornhautpräparate eine etwas geringere Steifigkeit als entsprechende humane Präparate aufwiesen, bei ansonsten vergleichbaren thermalen und biomechanischen Charakteristika (Kampmeier et al., 2000, S. 355).

Von dem genannten Unterschied im Bereich der Bowman-Membran abgesehen ist die anatomische Gliederung der Schweinehornhaut bis hin zum feinstrukturellen Aufbau der einzelnen Schichten der menschlichen Kornea sehr ähnlich (Prince et al., 1960). Die Durchmesser und Krümmungsradien ähneln sich ebenfalls bei beiden Spezies (Nielsen & Lind, 2005, S. 9).

Schweinehornhäute werden deshalb, insbesondere in Anbetracht der knappen Zahl humaner Bulbi, die für experimentelle Zwecke zur Verfügung stehen, häufig als Modell in der experi-

mentellen Ophthalmologie verwendet, so auch schon im Rahmen der Evaluation von Mikrokeratomen (Zaune, 2004, S. 1).

Insofern boten sich porkine Hornhäute auch für die In-vitro-Erprobung des PDS an. Sollte die genannte, etwas höhere Elastizität und der somit vermeintlich geringere Schneidewiderstand für das Schneidverhalten des PDS von Relevanz sein, so ließe sich beim Auftreffen der PDS-Klinge auf porkines Hornhautgewebe eher ein tieferes Einschneiden bzw. Vordringen erwarten als bei humanen Hornhäuten. Damit wäre das Modell sogar etwas sensitiver bezüglich des Risikos stromaler Einschnitte als humane Präparate.

Unter Verwendung der Schweinehornhäute war eine immunhistochemische Anfärbung des Basalmembran-Bestandteils Laminin wiederholt nicht erfolgreich. Laut Angaben des Herstellers Sigma-Aldrich ist der verwendete Primärantikörper (monoclonal Anti-laminin clone LAM-89) für die Markierung der Basalmembranen verschiedener Spezies (darunter Mensch und Schwein) geeignet. Eine Erklärung könnte möglicherweise eine geringere Affinität des Primärantikörpers gegenüber porkinen Basalmembranen darstellen. Durch Erhöhung der Konzentration des Primärantikörpers oder der Proteaselösung im Anwendungsprotokoll hätte möglicherweise eine bessere Anfärbung der porkinen Basalmembranen erzielt werden können. Die humanen Schnitte sowie auch die Positivkontrollen an humanen Tonsillenpräparaten ließen sich dagegen problemlos anfärben und zeigten eine Laminin-Markierung in typischer Lokalisation.

Aufgrund der erfolgreichen Markierung von Kollagen-VII und der vorhandenen elektronenmikroskopischen Ergebnisse waren Tiefe und Verlauf der Keratomschnitte an den porkinen Hornhäuten bereits ausreichend beurteilbar. Auf weitere Versuche der Laminin-Markierung wurde daher verzichtet.

4.4.2.2 Humane Kadaveraugen als Modell

Grundsätzlich erscheinen humane Leichenaugen als präklinisches Modell für die Erprobung eines für refraktive Zwecke entwickelten Keratomes am besten geeignet, da sie in ihren topographischen und biomechanischen Charakteristika dem menschlichen Patientenaugen, also dem vorgesehenen Einsatzort des Keratomes, am nächsten kommen. Gewisse Unterschiede sind aufgrund postmortaler Strukturveränderungen gegenüber vitalen menschlichen Augen allerdings zu erwarten. Sie sind nicht allein abhängig von der Post-mortem-Zeit, der Zeitdauer also, die zwischen dem Todeszeitpunkt und der experimentellen Verwendung solcher Bulbi vergeht, sondern insbesondere auch von der Art der zwischenzeitlichen Lagerung.

Im Falle der bei dieser Arbeit vorliegenden humanen Kadaveraugen waren Lagerung und Transport einzeln in auf 4 °C gekühlten Feuchtkammern erfolgt. Die kurzfristige Lagerung von zu Transplantationszwecken gewonnenen Bulbi in derartigen feuchten Kammern ist ein etabliertes Verfahren, das bereits in den 1930er Jahren zum Einsatz kam (Filatov & Sitchevska, 1935, S. 321). Reim (1967, S. 39) konnte zeigen, dass eine Kühlung von Autopsieaugen auf unter 7 °C nekrotische Vorgänge in der Hornhaut aufhalten und ein Überleben des kornealen Endothels auf bis zu 48 h verlängern kann. Auch in aktuellen Veröffentlichun-

gen wird eine Aufbewahrungszeit von bis zu 48 h in einer gekühlten Feuchtkammer für ganze Bulbi als vertretbar erachtet (Basu, 1995, S. 55). Bei längeren Lagerungszeiten als diesen kommt es durch Ansammlung toxischer Autolyse-Produkte im Kammerwasser zu einem progressiven Endothelzelluntergang. Heute übliche Verfahren der Langzeitaufbewahrung und -kultivierung von Hornhautgewebe sind dagegen nur durch eine frühzeitige corneosklerale Präparation und anschließende isolierte Lagerung der Spenderhornhäute in einer Gewebekultur möglich (McCarey & Kaufman, 1974, S. 165; Bigar et al., 1975, S. 115; Breslin et al., 1976, S. 1976).

Zwar beziehen sich die akzeptierten Lagerungszeiten für gekühlte Feuchtkammern insbesondere auf das Überleben von Endothelzellen. Dennoch sind Schädigungen bis hin zu nekrotischen Zelluntergängen auch im Epithel zu erwarten, wenn die Lagerung post mortem die genannte Dauer von 48 h wesentlich übersteigt.

Post-mortem-Zeiten zwischen 3,5 und 6 Tagen bei den hier vorliegenden humanen Kadaveraugen sind somit als zu lang anzusehen und können den bereits vor Anwendung des PDS reduzierten Epithelzustand mindestens anteilig erklären. Epitheliale Vorschädigungen, die bei allen humanen Bulbi in unterschiedlichem Ausmaß zu beobachten waren, äußerten sich *mikroskopisch* in unregelmäßigen, gestippten Hornhautoberflächen. *Mikroskopisch* imponierten eine generell herabgesetzte Zahl von epithelialen Zellschichten und ein durchgreifendes Epithelödem mit vakuolär veränderten, avital erscheinenden Epithelzellen in allen Schichten (Abb. 3-7 und 3-11, *Pfeile*).

Es kommt hinzu, dass die Bulbi beim Transport in feuchten Kammern von NaCl-getränkten Gazetupfern vollständig umhüllt waren, wodurch das den Tupfern unmittelbar anliegende Epithel mechanisch in Mitleidenschaft gezogen worden sein könnte. Dies stellt - abgesehen von grundsätzlich auch denkbaren prämortalen Epithelläsionen - einen weiteren Erklärungsansatz für die reduzierte Schichtenzahl und die vorbestehenden Erosiones bei 2 humanen Hornhäuten dar.

Beim Auftreten von nekrotischen und apoptotischen Zelluntergängen werden durch lytische Prozesse desmosomale Zell-Zell-Verbindungen sowie die hemidesmosomalen Anheftungen des Epithels an seiner Basalmembran gelockert beziehungsweise gelöst (Weiske et al., 2001, S. 41175). Keratomschnittverläufe durch das Epithel hindurch, das Verbleiben einzelner Epithelzellen auf der stromalen Schnittseite, aber auch das Abreißen von Epithelflaps, wie sie hier beobachtet wurden, lassen sich dadurch erklären. Auch eine größere Empfindlichkeit gegenüber Manipulationen wie dem Zuschneiden der noch nicht eingebetteten Präparate ist zu erwarten.

Aus den aufgezählten Gründen können die vorliegenden humanen Präparate nur bedingt als Modell dafür herangezogen werden, wie ein vitaler Epithelzellverband sich gegenüber dem Ein- und Vordringen der PDS-Klinge verhalten würde.

Andere wichtige Schlüsse bezüglich des Schneiderverhaltens des PDS lassen sich anhand dieser Präparate jedoch ziehen, insbesondere bezüglich der Eindringtiefe der Klinge. Dies ist ein entscheidender Bewertungsparameter, da die geforderte geringe Invasivität, Reversibilität und

Wiederholbarkeit des Keratomschnittes nur dann gewährleistet ist, wenn eine Durchtrennung der Bowman-Membran und ein Einschnitt ins Stroma ausbleibt. Anders formuliert gibt die Eindringtiefe an den humanen Kadaveraugen Hinweise zu dem Verletzungsrisiko, das von der PDS-Klinge ausgeht, und damit zur Sicherheit des Verfahrens.

Alio und Mitarb. (Alio et al., 2007, S. 1871) postulierten, dass eine durchgehende, intakte Bowman-Membran präoperativ erforderlich ist, um ein Eindringen von - ähnlich dem PDS konfigurierten - Epikeratomklingen in das Stroma *in vivo* zu verhindern. Diese Bedingung war, wie sich in der Lichtmikroskopie nach Anwendung des PDS zeigte, bei allen humanen Augen erfüllt. Ebenfalls verfügte das Stroma aller humanen Präparate lichtmikroskopisch über eine reguläre, narbenfreie Kollagenfaserschichtung, eine physiologische Dichte an Keratozyten und keinerlei Anzeichen entzündlicher Infiltrate.

Veränderte biomechanische Eigenschaften im Vergleich mit vitalen Hornhäuten könnten bei den vorliegenden humanen Präparaten aufgrund postmortaler, wenn auch mikroskopisch noch nicht sichtbarer autolytischer Veränderungen im Kollagenfasergeflecht - im Sinne einer Kollagenolyse durch freigewordene Proteasen - vorgelegen haben. Hieraus könnte gegebenenfalls auch ein veränderter Schneidewiderstand gegenüber der auftreffenden PDS-Klinge resultiert haben. Ein verglichen mit vitalem humanen Hornhautgewebe erhöhtes Risiko für eine Durchtrennung der Bowman-Membran und ein stromales Einschneiden durch das PDS ist in Anbetracht dieser Erwägungen denkbar.

4.4.2.3 Fallzahlen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 24 Hornhautpräparate, davon 6 porkine und 18 humane Präparate, mikroskopisch ausgewertet. Es ist sinnvoll, die hier vorgenommenen Untersuchungen an einer größeren Fallzahl von Präparaten zu wiederholen, um die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich der Schnitttiefe, des Schnittverlauf und einer Taschenbildung (Vorhandensein eines *Flaps*) auf ihre Wiederholbarkeit hin zu prüfen.

Aus praktischen Erwägungen böten sich hier insbesondere weitere porkine Präparate als Versuchsmaterial an. Vor einer ersten klinischen Erprobung des PDS müßte dabei ein Augenmerk insbesondere auf die Sicherheit des Keratomschnittes, also auf das dauerhafte Ausbleiben Narben induzierender, irreversibler Stromaeinschnitte gerichtet sein. Gerade zur Abschätzung dieses Risikos scheinen porkine Bulbi aufgrund des etwas geringeren Schneidewiderstands ihrer Hornhaut gegenüber einer Keratomklinge besonders gut als Modell geeignet (vgl. Kap. 4.4.2.1).

Es wäre zudem wünschenswert, auch noch eine größere Anzahl humaner Präparate mit dem PDS bearbeiten zu können, deren Post-mortem-Zeiten 48 Stunden nicht überschritten haben. Dies ist jedoch aufgrund der generellen Knappheit humanen kornealen Spendermaterials, das bei Erfüllung entsprechender Qualitätskriterien immer in allererster Linie für die Verwendung bei Keratoplastiken bestimmt zu sein hat, nur schwer zu bewerkstelligen.

4.4.2.4 Ergänzende methodische Schritte

Grundsätzlich ließen die histologischen Ergebnisse dieser Arbeit in Kombination mit der makroskopischen Beurteilung der Hornhäute nach dem Keratomschnitt erkennen, dass die Erzeugung einer subepithelialen Tasche mit dem PDS möglich ist. Das methodische Vorgehen bei dieser Arbeit ließ jedoch grundsätzlich nur eine ausschnittsweise histologische Beurteilung des PDS-Schneideverhaltens zu, was darin begründet ist, dass, für die Lichtmikroskopie einerseits und die Elektronenmikroskopie andererseits, jeweils nur Hornhauthälften verwendet wurden und diese Hälften wiederum nur ausschnittsweise mikroskopiert werden konnten.

Weitere experimentelle Schritten böten sich daher an, bei denen die Hornhaut nach Anwendung des PDS im Ganzen beurteilt werden kann. Eine methodische Möglichkeit bestünde in der Applikation einer Fluoreszein-haltigen Lösung in die Taschenöffnung, um dann unter Beleuchtung mit Blaulicht, zum Beispiel an der Spaltlampe, die Ausbreitung des Farbstoffes unter dem Epithel zu beobachten. Es könnte auf diese Weise erstens untersucht werden, ob sich, wie erwünscht, eine etwa 8 x 8 mm² große annähernd quadratische Fläche subepithelial anfärbt, und zweitens, ob Farbstoff außer an der spaltförmigen, 8 mm langen Taschenöffnung auch an anderen Stellen aus der Tasche austritt, ob letztere also eine geschlossene Abdeckung besitzt.

Darüber hinaus könnte es sinnvoll sein, sich bei der weiteren Auswertung nicht-invasiver optischer Techniken wie der *Optischen Kohärenz-Tomographie* (OCT) zu bedienen. Für die LASIK konnte bereits gezeigt werden, dass mit dieser Methode die Abgrenzung eines kornealen Flaps vom Stromabett sowie die Messung von Epitheldicke, Flapdicke und Gesamthornhautdicke möglich ist (Maldonado et al., 2000, S. 81; Ustundag et al., 2000, S. 1458; Wirbelauer & Pham, 2004, S. 1851).

Eine weitere Möglichkeit bestünde im Einsatz der *Ultraschall-Biomikroskopie* (UBM), mit der ebenfalls erfolgreich das korneale Epithel, die Flapdicke sowie die Dicke des Stromabettes nach LASIK bestimmt werden konnte (Reinstein et al., 2000, S. 414; Reinstein et al., 2005, S. 480).

Diese optischen Verfahren würden sich insbesondere für zukünftige In-vivo-Experimente eignen. Durch ihren nicht-invasiven Charakter würden mechanische Schädigungen des Epithels, die zum Beispiel im Abreißen eines Flaps bestehen könnten, verhindert.

Bei meinen Experimenten könnte es etwa beim Zuschneiden der Hornhäute vor der Einbettung zu derartigen methodisch bedingten Schäden gekommen sein.

4.4.3 Relevanz der Ergebnisse

4.4.3.1 Porkine Präparate

Die porkinen Präparate zeigten, von einer Ausnahme abgesehen, alle einen anhängenden Flap. Dies galt sowohl für die Präparate, welche aus dem seitlichen Randbereich des Keratomschnittes stammten als auch für jene, die am Taschenende entnommen waren. Diese Ergebnisse wiesen somit auf die erfolgreiche Herstellung einer Hornhaut-Tasche hin. Lichtmikroskopisch liess sich erkennen, dass die Schnitte im Grenzbereich von Basalmembran und Epithelzellbasis verliefen, unter Abscherung des gesamten Epithelzellverbandes. Das Stroma blieb in allen Fällen unangetastet. Lediglich bei einem Präparat verlief der Schnitt partiell durch den Epithelzellverband hindurch und spaltete ihn in diesem Bereich.

Die immunhistochemischen Ergebnisse zeigten durchweg epistromale Schnittverläufe, was sich in einer linearen Kollagen-VII-Markierung auf der Stromaseite des Schnittes ausdrückte. Dies wurde auch untermauert und bestätigt durch die elektronenmikroskopische Begutachtung, bei der die Schnitte ebenfalls epistromal verliefen, und zwar teilweise innerhalb der Basalmembran, und teilweise unter Anschneiden epithelialer Basalzellen.

4.4.3.2 Humane Präparate

Die insgesamt 17 ausgewerteten humanen Präparate zeigten nach Anwendung des PDS - von einer Ausnahme abgesehen, die einen stromalen Einschnitt aufwies (Präparat HH_h 24, Abb. 3-10) - durchweg Schnittverläufe, die eine durchgehende, intakte Bowman-Membran und ein unangetastetes Stroma auf der stromalen Schnittseite hinterließen.

Die genauere immunhistochemische Betrachtung liess bei ausgewählten humanen Präparaten mit Flap erkennen, dass die Schnitte teils innerhalb der Basalmembran (Färbung von Laminin auf beiden Schnittseiten), teils innerhalb oberflächlicher Anteile der Bowman-Membran (Kollagen-VII-Färbung beidseits des Schnittes) verliefen. Korrespondierend hierzu liessen die elektronenmikroskopischen Ergebnisse bei den ausgewählten menschlichen Hornhäuten ebenfalls Schnittverläufe teils innerhalb der Basalmembran, teils innerhalb der Bowman-Membran erkennen.

Wenn auch bei einem Großteil der Präparate ein Flap als Indiz für die Herstellung einer Hornhaut-Tasche fehlte, so war der Epithelzellverband doch zumeist (bei 12 von 18 HE-Präparaten) in toto durch das PDS abgesichert worden. Seltener zeigten sich vereinzelte epitheliale Überreste auf der stromalen Schnittseite.

Das häufige Fehlen eines Flaps wurde weniger auf den Keratomschnitt an sich, als vielmehr auf den insgesamt minderwertigen Ausgangszustand des Epithels der humanen Präparate zurückgeführt, der vornehmlich den genannten unbefriedigenden – externen – Aufbereitungs- und Lagerungsbedingungen geschuldet gewesen sein dürfte (vgl. Kap. 4.4.2.2). Hierfür spricht auch, dass gerade jene histologischen Präparate über einen Flap verfügten, bei denen die zugehörige Hornhaut makroskopisch vor Anwendung des PDS eine verhältnismäßig glatte

und regelmässige epitheliale Oberfläche besessen hatten. Die wunschgemäße Erzeugung eines zusammenhängenden und im Randbereich der Tasche anhängenden Flaps scheint also von einem intakten Ausgangszustand des kornealen Epithels abzuhängen.

Auch die bei einigen Präparaten nachweisbaren, intraepithelialen PDS-Schnittverläufe oder auf der stromalen Schnittseite verbliebene einzelne Epithelzellen müssen im Kontext der vorbestehenden Epithelschäden betrachtet werden.

In wie weit die Ergebnisse an humanen Präparaten Folge der vorbestehenden Schädigungen waren und damit ein für das PDS untypischer Schnittverlauf zustande kam, bleibt somit insbesondere bei ihrer isolierten Betrachtung fraglich. Die Beobachtungen an den humanen Präparaten lassen sich daher nur im Zusammenhang mit den Ergebnissen an den Schweine-Präparaten deuten.

4.4.3.3 Zusammenfassende Bewertung

Unter vornehmlicher Berücksichtigung der Ergebnisse an Schweinehornhäuten konnte durch die vorliegenden Versuche gezeigt werden, dass das Pocket-Delaminator-System grundsätzlich imstande ist, unter Abscherung des Epithelzellverbandes eine subepitheliale Tasche in der Hornhaut zu erzeugen.

Mit immunhistochemischen und feinstrukturellen Methoden konnte an den untersuchten porzinen Präparaten nachgewiesen werden, dass der Keratomschnitt, wie angestrebt, gleichmäßig subepithelial, beziehungsweise epistromal, verlief.

Diesbezüglich zeigten die Keratomschnitte also den angestrebten Verlauf. Die nicht vollständig regenerationsfähigen, unterhalb der epithelialen Basalmembran gelegenen kornealen Anteile blieben vom Eingriff unberührt, wodurch die Bedingungen erfüllt sind, die an einen vollständig reversiblen, refraktiven Operationsansatz gestellt werden müssen.

Zu diesen Bedingungen zählt die Unversehrtheit des Stromas, die erforderlich ist, um Visus-limitierende und Brechkraft-verändernde Narbenbildungen zu verhindern, und auch um die Hornhaut nicht in ihrer räumlichen Konfiguration zu destabilisieren. Zu den Bedingungen zählt aus theoretischen Überlegungen bei der menschlichen Hornhaut auch der Erhalt der Bowman-Membran. Zwar ist ihre physiologische Bedeutung für die Hornhaut umstritten. Aufgrund der Besonderheiten der kornealen Wundheilung könnte sich der Erhalt einer zellfreien Schicht zwischen Epithelzellen und Keratozyten nach refraktiver Chirurgie jedoch positiv auswirken, indem durch räumliche Trennung dieser zellulären Anteile Zytokin-vermittelte Wundheilungsvorgänge eingeschränkt würden.

Die Ergebnisse an humanen Schnitten ließen erkennen, dass die Keratomklinge hier teilweise innerhalb oberflächlicher Anteile der Bowman-Membran verlief, mit einem erhaltenen Anteil der Bowman-Membran auf der Stromaseite. Lediglich bei einem humanen Präparat hatte die Keratomklinge die Bowman-Membran durchtrennt und war tiefer in das Hornhautstroma eingedrungen. Dieses Ergebnis wird nicht als typisch angesehen. Auf Grund der erheblichen post-mortalen Veränderungen des humanen Materials könnte ein post-mortal aufgelockertes

Gewebe der Bowman-Membran und des Stromas der Keratomklinge einen nur unzureichenden Widerstand entgegengesetzt haben.

Wichtig für die spätere Funktion der Hornhaut-Tasche und damit für den Erfolg des Eingriffes war des weiteren das Erscheinungsbild des Flap. Diesbezüglich liessen die Ergebnisse erkennen, dass das PDS in der Lage ist, den gesamten mehrschichtigen Epithelzellverband von seiner Unterlage abzuscheren. Dabei zeigte sich allerdings elektronenmikroskopisch, dass durch den Keratomschnitt epitheliale Basalzellen teilweise nahe ihrer hemidesmosomalen Anheftung angeschnitten beziehungsweise durchtrennt worden waren.

Bei Erzeugung epithelialer Flaps mit verschiedenen Epikeratom-Modellen, deren Klängen ähnlich konfiguriert sind wie die des PDS, wurden von einigen Arbeitsgruppen ähnliche histologische Beobachtungen gemacht. Tanioka et al. (2007, S. 1195) berichteten, dass die meisten der Basalzellen nach Epi-Keratomschnitt histologisch avital erscheinen. Katsanevaki et al. machten diese Beobachtungen hingegen nur an einer Minderheit von Zellen (Katsanevaki et al., 2006, S. 151; Kollias et al., 2007, S. 2118). Choi et al. (2008, S. 667) beobachteten ebenfalls Flap-Anteile mit Basalzellschädigungen. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnten Chen et al. (2008b, S. 2416) auch *in vivo* deutliche postoperative Reparaturvorgänge in der Basalzellschicht ausmachen.

Es steht fest, dass Verletzungen des Epithels während des Schneidevorgangs mit dem PDS weitgehend vermieden werden sollten. Aufgrund der mechanischen Anforderungen an die Epithelbedeckung des Onlays gilt dies für das PDS in größerem Maße als für Keratome der Epi-LASIK. Es ist anzunehmen, dass die epitheliale Tasche umso widerstandsfähiger gegenüber mechanischer Beanspruchung ist, je weniger beschädigte Epithelzellen in den ersten Tagen nach dem Eingriff ersetzt werden müssen. Bei diesem Epithelzellersatz müssen angrenzende Basalzellen die Defekte in der Basalzellschicht schließen und limbale Stammzellen gleichzeitig vermehrt proliferieren.

Inwieweit die beobachteten und voraussichtlich letalen Verletzungen der Basalzellen die postoperative Stabilität der Epitheltasche so schwächt, dass Erosionen resultieren und daher die Onlays extrudiert würden, wird in weiteren Untersuchungen *in vivo* zu klären sein.

Ein noch weiter oberflächlicher Keratomschnittverlauf, der das Epithel spaltete und größere Epithelanteile auf der Stromaseite hinterließ, wurde partiell an zwei humanen und einem porzinen Präparat beobachtet. Diese Einzelfälle scheinen für das Keratomverhalten nicht typisch zu sein und sind - zumindest im Falle der humanen Präparate - im Zusammenhang mit den genannten epithelialen Vorschädigungen vor PDS-Anwendung zu sehen. Selbst wenn solche Epithelschäden durch den Keratomschnitt häufiger aufträten und daher, in Ermangelung einer stabilen Tasche, kein Onlay implantiert werden könnte, wäre das nicht als dramatisch anzusehen. Aufgrund des Erhaltes von Bowman-Membran und Stroma wäre kein bleibender Schaden entstanden. Es könnte in diesem Fall nach Regeneration des Epithels ein erneuter Implantationsversuch unternommen werden.

4.4.3.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass das Pocket-Delaminator-System eine subepitheliale Tasche in der Hornhaut erzeugen kann. Weitere Versuche an unbeschädigten, humanen Hornhäuten sind notwendig, um zu klären, ob sich die erfolgversprechenden Schnittergebnisse, die vornehmlich an porkinen Hornhäuten erzielt werden konnten, bestätigen lassen.

Hierauf aufbauend sollten In-vivo-Untersuchungen zunächst an Tieraugen und später beim Menschen folgen. Mit Methoden wie der Optischen Kohärenz-Tomographie oder der Ultraschallbiomikroskopie (vgl. Kap. 4.4.2.4) könnten zuerst die Schnittergebnisse des PDS isoliert, also ohne Implantation eines Onlays, studiert werden. Mit den genannten Methoden ließe sich die subepitheliale Tasche bezüglich der Dicke und des Zusammenhalts der epithelialen Bedeckung sowie bezüglich der exakten Bemessungen der Tasche untersuchen.

In weiteren Schritten müssten verschiedene, mögliche Versionen von Onlays in die Hornhaut-Tasche, implantiert werden. Hierbei wird zu untersuchen sein, ob die epitheliale Taschenbedeckung zuerst dem Implantationsvorgang des Onlays und dann dem Onlay selbst mechanisch standhält. Auch diesbezüglich böten sich genannte, nicht invasive Untersuchungstechniken wie das OCT an.

Für den dauerhaften Erhalt der epithelialen Taschenbedeckung und den Verbleib des Onlays in seiner Position wird entscheidend sein, ob das jeweilige Implantat einen ausreichenden Nährstofftransport und zudem eine Adhäsion und Migration von Epithelzellen entlang seiner Oberfläche zulassen wird. Aus den bisherigen experimentellen Erfahrungen mit künstlichen Lentikeln lässt sich folgern, dass ein Onlay-Design diese Anforderungen am ehesten erfüllen wird, wenn es ausreichend porös ist und zudem über eine oberflächliche Beschichtung, zum Beispiel mit Kollagen-I, verfügt (vgl. Kap. 4.2.3).

Den Erfolg der histologischen und morphologischen Ex-vivo- und In-vivo-Untersuchungen vorausgesetzt, werden prospektive klinische Studien zeigen müssen, ob die alloplastische Epikeratophakie durch Auswahl geeigneter Lentikelstärken Refraktionsfehler präzise und vorher-sagbar korrigieren können wird.

5 Zusammenfassung

Die refraktive Chirurgie versucht, Fehlsichtigkeiten operativ zu korrigieren. Sie hat insbesondere seit Entwicklung der Excimerlaser-Verfahren und der heutigen Linsen Chirurgie an Bedeutung gewonnen. Die heute etablierten Verfahren der refraktiven Chirurgie sind irreversibel, nur begrenzt wiederholbar oder bringen teilweise aufgrund Ihrer Invasivität ein nicht zu vernachlässigendes Risiko für schwere Komplikationen mit sich. Um diese Nachteile zu überwinden, wird an der Entwicklung neuer Operationskonzepte gearbeitet.

Ein solches Konzept besteht in der so genannten *alloplastischen Epikeratophakie*, bei der synthetische Lentikel subepithelial in der Hornhaut implantiert werden. Diese Implantate werden als *Onlays* bezeichnet. Sie sollen die Krümmung der Hornhautvorderfläche und damit die Brechkraft der Hornhaut den Anforderungen entsprechend verändern.

Bei der Entwicklung einer alloplastischen Epikeratophakie wird nach Möglichkeiten gesucht, Onlays in subepithelialer Position beziehungsweise *epistromal* zu befestigen. Eine der möglichen Optionen besteht darin, Onlays in subepitheliale Taschen zu implantieren.

Zur Herstellung einer solchen Tasche wurde mit dem *Pocket-Delaminator-System (PDS)* ein neuartiges Keratom entwickelt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Schneidverhalten des PDS ex vivo an Schweineaugen und menschlichen Kadaveraugen zu untersuchen. Es sollte geklärt werden, ob das PDS eine subepitheliale Tasche in der Hornhaut erzeugen kann, ob die Keratomschnitte gleichmäßig unterhalb des Epithels verlaufen, und ob irreversible Schädigungen der Bowman-Membran und des Hornhautstromas ausbleiben. Hierzu wurden die porkinen und humanen Hornhautpräparate nach Anwendung des PDS für die lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Begutachtung aufbereitet. Zudem wurden zur Bestimmung des Schnittverlaufes die extrazellulären Matrixbestandteile Laminin und Kollagen-VII immunhistochemisch markiert.

Anhand der Ergebnisse an den Schweinehornhäuten ließ sich zeigen, dass das PDS in der Lage ist, das Hornhautepithel vollständig als Flap von seiner Unterlage abzuscheren. Der Keratomschnitt verlief dabei epistromal. Untersuchungen an humanem Spendermaterial ergaben grundsätzlich ähnliche Ergebnisse. Aufgrund der Vorschädigungen des humanen Materials besaßen diese jedoch eine eingeschränkte Aussagekraft.

Es ergibt sich aus diesen Untersuchungen, dass das PDS ein geeignetes Instrument zum Erzeugen subepithelialer Taschen für die refraktive Chirurgie mit alloplastischen Onlays darstellt. Weitere Untersuchungen ex vivo sowie in vivo sind erforderlich, um zu zeigen, ob sich das Konzept der alloplastischen Epikeratophakie bis zur klinischen Anwendbarkeit hin entwickeln lässt.

6 Literatur

- Albinet, P., Romanet, J. P., Mouillon, M., Zerdab, I., Gravagna, P., Tayot, J. L., Dupont, D., & Eloy, R. (1990). [Epikeratoplasty without sutures using collagen IV lens in monkeys: description of the surgical technic]. *J Fr Ophthalmol*, 13(3), 109-114.
- Alio, J. L., Mulet, M. E., Zapata, L. F., Vidal, M. T., De Rojas, V., & Javaloy, J. (2004). Intracorneal inlay complicated by intrastromal epithelial opacification. *Archives of Ophthalmology*, 122(10), 1441-1446.
- Alio, J. L., Rodriguez, A. E., Mendez, M. C., & Kanellopoulos, J. (2007). Histopathology of epi-LASIK in eyes with virgin corneas and eyes with previously altered corneas. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 33(11), 1871-1876.
- Altmann, J., Grabner, G., Husinsky, W., Mitterer, S., Baumgartner, I., Skorpik, F., & Asenbauer, T. (1991). Corneal lathing using the excimer laser and a computer-controlled positioning system: Part I--Lathing of epikeratoplasty lenticules. *Refractive and Corneal Surgery*, 7(5), 377-384.
- Arenas-Archila, E., Sanchez-Thorin, J. C., Naranjo-Uribe, J. P., & Hernandez-Lozano, A. (1991). Myopic keratomileusis in situ: a preliminary report. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 17(4), 424-435.
- Asano-Kato, N., Toda, I., Hori-Komai, Y., Takano, Y., Dogru, M., & Tsubota, K. (2005). Histopathological findings of epithelial ingrowth after laser in situ keratomileusis. *Cornea*, 24(2), 130-134.
- Asbell, P. A., Maloney, R. K., Davidorf, J., Hersh, P., McDonald, M., & Manche, E. (2001). Conductive keratoplasty for the correction of hyperopia. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 99, 79-84; discussion 84-7.
- Asbell, P. A. & Ucakhan, O. O. (2001). Long-term follow-up of Intacs from a single center. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 27(9), 1456-1468.
- Azar, R. F. (1979). Secondary implantation. *International Ophthalmology Clinics*, 19(3), 211-225.
- Badr, I. A., Hussain, H. M., Jabak, M., & Wagoner, M. D. (1995). Extracapsular cataract extraction with or without posterior chamber intraocular lenses in eyes with cataract and high myopia. *Ophthalmology*, 102(8), 1139-1143.
- Baikoff, G., Arne, J. L., Bokobza, Y., Colin, J., George, J. L., Lagoutte, F., Lesure, P., Montard, M., Saragoussi, J. J., & Secheyron, P. (1998). Angle-fixated anterior chamber phakic intraocular lens for myopia of -7 to -19 diopters. *Journal of Refractive Surgery*, 14(3), 282-293.
- Baikoff, G. & Colin, J. (1990). Damage to the corneal endothelium using anterior chamber intraocular lenses for myopia. *Refractive and Corneal Surgery*, 6(5), 383.
- Baikoff, G. & Joly, P. (1990). Comparison of minus power anterior chamber intraocular lenses and myopic epikeratoplasty in phakic eyes. *Refractive and Corneal Surgery*, 6(4), 252-260.
- Baker, K. S., Anderson, S. C., Romanowski, E. G., Thoft, R. A., & SundarRaj, N. (1993). Trigeminal ganglion neurons affect corneal epithelial phenotype. Influence on type VII collagen expression in vitro. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 34(1), 137-144.

- Barraquer, J. I. (1965). [Autokeratoplasty with optical carving for the correction of myopia (Keratomileusis)]. *An Med Espec*, 51(1), 66-82.
- Barraquer, J. I. (1966). Modification of refraction by means of intracorneal inclusions. *International Ophthalmology Clinics*, 6(1), 53-78.
- Barraquer, J. I. (1967). Keratomileusis. *International Surgery*, 48(2), 103-117.
- Barraquer, J. I. (1972). Keratophakia. *Transactions of the Ophthalmological Society of the United Kingdom*, 92, 499-516.
- Basu, P. K. (1995). A review of methods for storage of corneas for keratoplasty. *Indian Journal of Ophthalmology*, 43(2), 55-58.
- Baumgartner, S. D. & Binder, P. S. (1985). Refractive keratoplasty. Histopathology of clinical specimens. *Ophthalmology*, 92(11), 1606-1615.
- Beekhuis, W. H., McCarey, B. E., van Rij, G., & Waring, G. O. r. (1987). Complications of hydrogel intracorneal lenses in monkeys. *Archives of Ophthalmology*, 105(1), 116-122.
- Beekhuis, W. H., McCarey, B. E., Waring, G. O., & van Rij, G. (1986). Hydrogel keratophakia: a microkeratome dissection in the monkey model. *British Journal of Ophthalmology*, 70(3), 192-198.
- Bende, T., Seiler, T., & Schilling, A. (1988). Reproduzierbarkeit von Exzisionstiefen in der Laser-Hornhautchirurgie. In J. Wollensak (Ed.), *Laser in der Ophthalmologie. Bücherei des Augenarztes, Bd. 113* (pp. 148). Stuttgart: Enke.
- Bigar, F., Kaufman, H. E., McCarey, B. E., & Binder, P. S. (1975). Improved corneal storage for penetrating keratoplasties in man. *American Journal of Ophthalmology*, 79(1), 115-120.
- Binder, P. S., Baumgartner, S. D., & Fogle, J. A. (1985). Histopathology of a case of epikeratophakia (aphakic epikeratoplasty). *Archives of Ophthalmology*, 103(9), 1357-1363.
- Binder, P. S., Beal, J. P. J., & Zavala, E. Y. (1982). The histopathology of a case of keratophakia. *Archives of Ophthalmology*, 100(1), 101-105.
- Biowski, R., Homolka, P., Barisani-Asenbauer, T., Baumgartner, I., Husinsky, W., Kaminski, S., Lametschwandtner, A., Muss, W., & Grabner, G. (2000). Corneal lathing using the excimer laser and a computer-controlled positioning system. *Journal of Refractive Surgery*, 16(1), 23-31.
- Bissen-Miyajima, H., Nakamura, K., Kaido, M., Shimmura, S., & Tsubota, K. (2004). Role of the endothelial pump in flap adhesion after laser in situ keratomileusis. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 30(9), 1989-1992.
- Bock, R. H. & Maumenee, A. E. (1953). Corneal fluid metabolism; experiments and observations. *AMA Arch Ophthalmol*, 50(3), 282-285.
- Boerhaave, Herman (1750). *De morbis oculorum praelectiones publicae ex codicibus auditorum editae. Editio Gottingensis altera, quinta parte auctior et emendata*. Göttingen: Officina Vandenhoeckiana.
- Bores, L. D. (2001a). Lamellar refractive surgery. In L. D. Bores (Ed.), *Refractive eye surgery* (pp. 365-367). Malden: Blackwell Science.
- Bores, L. D. (2001b). The Nature Of Ametropia. In L. D. Bores (Ed.), *Refractive Eye Surgery* (2 ed., pp. 6-45). Malden: Blackwell Science.
- Bourcier, T., Thomas, F., Borderie, V., Chaumeil, C., & Laroche, L. (2003). Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *British Journal of Ophthalmology*, 87(7), 834-838.
- Bourne, W. M. & Kaufman, H. E. (1976). Specular microscopy of human corneal endotheli-

- um in vivo. *American Journal of Ophthalmology*, 81(3), 319-323.
- Breslin, C. W., Sherrard, E. S., & Rice, N. S. (1976). McCarey-Kaufman technique of corneal storage before penetrating keratoplasties in rabbits. An evaluation. *Archives of Ophthalmology*, 94(11), 1976-1979.
- Brittain, G. P., Rostron, C. K., Morton, D. B., & Rees, J. E. (1989). The use of a biological adhesive to achieve sutureless epikeratophakia. *Eye*, 3(Pt 1), 56-63.
- Buratto, L. & Ferrari, M. (1989). Retrospective comparison of freeze and non-freeze myopic epikeratophakia. *Refractive and Corneal Surgery*, 5(2), 94-97.
- Buratto, L., Ferrari, M., & Rama, P. (1992). Excimer laser intrastromal keratomileusis. *American Journal of Ophthalmology*, 113(3), 291-295.
- Burris, T. E., Ayer, C. T., Evensen, D. A., & Davenport, J. M. (1991). Effects of intrastromal corneal ring size and thickness on corneal flattening in human eyes. *Refractive and Corneal Surgery*, 7(1), 46-50.
- Burris, T. E., Baker, P. C., Ayer, C. T., Loomas, B. E., Mathis, M. L., & Silvestrini, T. A. (1993). Flattening of central corneal curvature with intrastromal corneal rings of increasing thickness: an eye-bank eye study. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 19 Suppl, 182-187.
- Camber, O., Rehbinder, C., Nikkila, T., & Edman, P. (1987). Morphology of the pig cornea in normal conditions and after incubation in a perfusion apparatus. *Acta Vet Scand*, 28(2), 127-134.
- Camellin, M. (2003). Laser epithelial keratomileusis for myopia. *Journal of Refractive Surgery*, 19(6), 666-670.
- Chen, L., Kato, T., Toshida, H., Nakamura, S., & Murakami, A. (2005). Immunohistochemical characterization of epithelial cells implanted in the flap-stroma interface of the cornea. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 49(2), 79-83.
- Chen, L. J., Chang, Y. J., Kuo, J. C., Rajagopal, R., & Azar, D. T. (2008a). Metaanalysis of cataract development after phakic intraocular lens surgery. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 34(7), 1181-1200.
- Chen, W. L., Chang, H. W., & Hu, F. R. (2008b). In vivo confocal microscopic evaluation of corneal wound healing after epi-LASIK. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(6), 2416-2423.
- Cheng, K. H., Leung, S. L., Hoekman, H. W., Beekhuis, W. H., Mulder, P. G., Geerards, A. J., & Kijlstra, A. (1999). Incidence of contact-lens-associated microbial keratitis and its related morbidity. *Lancet*, 354(9174), 181-185.
- Choi, C. Y., Kim, J. Y., Kim, M. J., & Tchah, H. (2008). Transmission electron microscopy study of corneal epithelial flaps following removal using mechanical scraping, alcohol, and epikeratome techniques. *Journal of Refractive Surgery*, 24(7), 667-670.
- Choyce, D. P. (1966). Intra-cameral and intra-corneal implants. A decade of personal experience. *Transactions of the Ophthalmological Society of the United Kingdom*, 86, 507-525.
- Choyce, D. P. (1968). The present status of intra-cameral and intra-corneal implants. *Canadian Journal of Ophthalmology*, 3(4), 295-311.
- Choyce, D. P. (1985). The correction of refractive errors with polysulfone corneal inlays. A new frontier to be explored? *Transactions of the Ophthalmological Society of the United Kingdom*, 104(Pt 3), 332-342.
- Citron, C. (1997). Molekulare Struktur des gesunden und des erkrankten Hornhautstromas. In K. W. Jacobi (Ed.), *Erkrankungen des äußeren Auges Chandler/Sugar/Edelhauser* (pp.

5.1-5.5). Berlin; Wiesbaden: Ullstein Mosby.

Climenhaga, H., Macdonald, J. M., McCarey, B. E., & Waring, G. O. r. (1988). Effect of diameter and depth on the response to solid polysulfone intracorneal lenses in cats. *Archives of Ophthalmology*, 106(6), 818-824.

Colin, J. & Malet, F. J. (2007). Intacs for the correction of keratoconus: two-year follow-up. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 33(1), 69-74.

Craig, A. S. & Parry, D. A. (1981). Collagen fibrils of the vertebrate corneal stroma. *J Ultrastruct Res*, 74(2), 232-239.

da Vinci, L. (1608). *Manuscrit D de Leonardo da Vinci (Folio 3 verso et 7 verso)*. Paris: Bibliothèque de l'Institut de France.

Dalton, B. A., Evans, M. D., McFarland, G. A., & Steele, J. G. (1999). Modulation of corneal epithelial stratification by polymer surface topography. *J Biomed Mater Res*, 45(4), 384-394.

Davidorf, J. M., Zaldivar, R., & Oscherow, S. (1998). Posterior chamber phakic intraocular lens for hyperopia of +4 to +11 diopters. *Journal of Refractive Surgery*, 14(3), 306-311.

Deg, J. K. & Binder, P. S. (1988). Histopathology and clinical behavior of polysulfone intracorneal implants in the baboon model. Polysulfone lens implants. *Ophthalmology*, 95(4), 506-515.

Del Pero, R. A., Gigstad, J. E., Roberts, A. D., Klintworth, G. K., Martin, C. A., L'Esperance, F. A. J., & Taylor, D. M. (1990). A refractive and histopathologic study of excimer laser keratectomy in primates. *American Journal of Ophthalmology*, 109(4), 419-429.

Descartes, R. (1637). La dioptrique. In *Discours De La Methode Pour bien conduire sa raison, & chercher la verite dans les sciences. Plus La Dioptrique. Les Meteores. Et La Geometrie. Qui sont des essais de cete Methode*. Leiden: Joannes Maire.

Dohlman, C. H., Refojo, M. F., & Rose, J. (1967). Synthetic polymers in corneal surgery. I. Glyceryl methacrylate. *Archives of Ophthalmology*, 77(2), 252-257.

Dossi, F. & Bosio, P. (1987). Myopic keratomileusis: results with a follow-up over one year. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 13(4), 417-420.

Duarte, M. C. & Kim, T. (2007). Sutureless lamellar keratoplasty: a modified approach for fibrin glue application. *Cornea*, 26(9), 1127-1128.

Duffey, R. J. & Leaming, D. (2005). US trends in refractive surgery: 2004 ISRS/AAO Survey. *Journal of Refractive Surgery*, 21(6), 742-748.

Dullaert, H., Foets, B. J., & Missotten, L. (1994). Epikeratophakia, a valid surgical alternative for the treatment of selected patients with aphakia. *Bulletins de la Société Belge d'Ophtalmologie*, 252, 9-16.

Dupont, D., Gravagna, P., Albinet, P., Tayot, J. L., Romanet, J. P., Mouillon, M., & Eloy, R. (1989). Biocompatibility of human collagen type IV intracorneal implants. *Cornea*, 8(4), 251-258.

Ebihara, N., Mizushima, H., Miyazaki, K., Watanabe, Y., Ikawa, S., Nakayasu, K., & Kanai, A. (2000). The functions of exogenous and endogenous laminin-5 on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*, 71(1), 69-79.

Ehlers, N. (1970). Morphology and histochemistry of the corneal epithelium of mammals. *Acta Anat (Basel)*, 75(2), 161-198.

Erickson, A. C. & Couchman, J. R. (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem*, 48(10), 1291-1306.

Evans, M. D., Dalton, B. A., & Steele, J. G. (1999). Persistent adhesion of epithelial tissue is

- sensitive to polymer topography. *J Biomed Mater Res*, 46(4), 485-493.
- Evans, M. D., Taylor, S., Dalton, B. A., & Lohmann, D. (2003). Polymer design for corneal epithelial tissue adhesion: pore density. *J Biomed Mater Res A*, 64(2), 357-364.
- Evans, M. D., Xie, R. Z., Fabbri, M., Madigan, M. C., Chaouk, H., Beumer, G. J., Meijs, G. F., Griesser, H. J., Steele, J. G., & Sweeney, D. F. (2000). Epithelialization of a synthetic polymer in the feline cornea: a preliminary study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(7), 1674-1680.
- Evans, M. D., Xie, R. Z., Tout, S. D., Steele, J. G., & Sweeney, D. F. (1998). Persistent adhesion of corneal epithelial tissue on synthetic lenticules in vivo. *Aust N Z J Ophthalmol*, 26 Suppl 1, S40-3.
- Fantes, F. E., Hanna, K. D., Waring, G. O. r., Pouliquen, Y., Thompson, K. P., & Savoldelli, M. (1990). Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Archives of Ophthalmology*, 108(5), 665-675.
- Fechner, P. U. (1987). Die Irisklauen-Linse. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 191(1), 26-29.
- Fechner, P. U. (1991). Iris claw lens. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 17(6), 860-861.
- Ferry, A. P. (1986). "Professor" Charles Tyrrell and his ideal sight restorer. *Ophthalmology*, 93(9), 1246-1257.
- Fick, A. E. (1888). Eine Contactbrille. *Archiv für Augenheilkunde*, 18, 279-289.
- Fick, A. E. (1892). Einige Bemerkungen über die Contactbrille. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 30, 306-310.
- Filatov, V. P. & Sitchevska, O. (1935). Transplantation of the Cornea. *Archives of Ophthalmology*, 13, 321-347.
- Fini, M. E. & Stramer, B. M. (2005). How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea*, 24(8 Suppl), S2-S11.
- Fleming, J. F., Wan, W. L., & Schanzlin, D. J. (1989). The theory of corneal curvature change with the Intrastromal Corneal Ring. *CLAO J*, 15(2), 146-150.
- Friedlander, M. H., Rich, L. F., Werblin, T. P., Kaufman, H. E., & Granet, N. (1980). Keratophakia using preserved lenticules. *Ophthalmology*, 87(7), 687-692.
- Friedlander, M. H., Safir, A., McDonald, M. B., Kaufman, H. E., & Granet, N. (1983). Update on keratophakia. *Ophthalmology*, 90(4), 365-368.
- Friedlander, M. H., Werblin, T. P., Kaufman, H. E., & Granet, N. S. (1981). Clinical results of keratophakia and keratomileusis. *Ophthalmology*, 88(8), 716-720.
- Fujikawa, L. S., Foster, C. S., Gipson, I. K., & Colvin, R. B. (1984). Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: immunofluorescence and ultrastructural studies. *Journal of Cell Biology*, 98(1), 128-138.
- Fukala, V. (1890). Operative Behandlung der höchstgradigen Myopie durch Aphakie. *Graefes Archiv für Ophthalmologie*, 36, 230-244.
- Funk, R. H., Apple, D. J., & Naumann, G. (1997). Embryologie, Anatomie und Untersuchungstechnik. In G. Naumann (Ed.), *Pathologie des Auges (I)* (pp. 1-90). Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Fyodorov, S. N. & Durnev, V. V. (1979). Operation of dosaged dissection of corneal circular ligament in cases of myopia of mild degree. *Annals of Ophthalmology*, 11(12), 1885-1890.
- Gilbert, M. L., Roth, A. S., & Friedlander, M. H. (1990). Corneal flattening by shallow circu-

- lar trephination in human eye bank eyes. *Refractive and Corneal Surgery*, 6(2), 113-116.
- Goldman, J. N. & Benedek, G. B. (1967). The relationship between morphology and transparency in the nonswelling corneal stroma of the shark. *Invest Ophthalmol*, 6(6), 574-600.
- Goldman, J. N., Benedek, G. B., Dohlman, C. H., & Kravitt, B. (1968). Structural alterations affecting transparency in swollen human corneas. *Invest Ophthalmol*, 7(5), 501-519.
- Goodman, D. F., Gottsch, J. D., Smith, P. W., Stark, W. J., & Green, W. R. (1989). Lamellar keratectomy and repeat epikeratoplasty following failed epikeratoplasty. A clinicopathologic report. *Cornea*, 8(4), 295-298.
- Grabner, G. (1991). [Complications of epikeratophakia in correction of aphakia, myopia, hyperopia and keratoconus]. *Fortschritte der Ophthalmologie*, 88(1), 4-11.
- Greenbaum, A., Kaiserman, I., & Avni, I. (2007). Long-term reversibility of epikeratophakia. *Cornea*, 26(10), 1210-1212.
- Hanna, K. D., Pouliquen, Y., Waring, G. O. r., Savoldelli, M., Cotter, J., Morton, K., & Menasche, M. (1989). Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. *Archives of Ophthalmology*, 107(6), 895-901.
- Haverbeke, L. & Levy, J. P. (1990). *La kératotomie radiaire*. Paris: Masson.
- Helena, M. C., Baerveldt, F., Kim, W. J., & Wilson, S. E. (1998). Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 39(2), 276-283.
- Herrmann, W. A., Hillenkamp, J., Hufendiek, K., Prahs, P., Lohmann, C. P., Helbig, H., & Kobuch, K. (2008). Epi-laser in situ keratomileusis: comparative evaluation of epithelial separation with 3 microkeratomes. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 34(10), 1761-1766.
- Herschel, J. F. W. (1829). Of the structure of the eye and of vision. In E. Smedley (Ed.), *Encyclopedia Metropolitana, 4th division. Light*. (pp. 394-404). London: Fellow and Rivington.
- Hirschberg, J. (1982). The middle ages (vol. 2). In F. C. Blodi (Ed.), *the history of ophthalmology*. Bonn: Wayenborgh Verlag.
- Hoffman, F. & Harnisch, J. P. (1981). Effects of freezing on the corneal stroma of the rabbit after keratophakia. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, 215(4), 243-248.
- Hogan, R. N., Brown, P., Heck, E., & Cavanagh, H. D. (1999). Risk of prion disease transmission from ocular donor tissue transplantation. *Cornea*, 18(1), 2-11.
- Holden, B. A. & Mertz, G. W. (1984). Critical oxygen levels to avoid corneal edema for daily and extended wear contact lenses. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 25(10), 1161-1167.
- Holden, B. A., Sweeney, D. F., & Sanderson, G. (1984). The minimum precorneal oxygen tension to avoid corneal edema. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 25(4), 476-480.
- Holladay, J. T., Prager, T. C., Ruiz, R. S., Lewis, J. W., & Rosenthal, H. (1986). Improving the predictability of intraocular lens power calculations. *Archives of Ophthalmology*, 104(4), 539-541.
- Homolka, P., Biowski, R., Kaminski, S., Barisani, T., Husinsky, W., Bergmann, H., & Grabner, G. (1999). Laser shaping of corneal transplants in vitro: area ablation with small overlapping laser spots produced by a pulsed scanning laser beam using an optimizing ablation algorithm. *Phys Med Biol*, 44(5), 1169-1180.
- Hong, J. W., Liu, J. J., Lee, J. S., Mohan, R. R., Mohan, R. R., Woods, D. J., He, Y. G., & Wilson, S. E. (2001). Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory

- cell infiltration into the cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(12), 2795-2803.
- Horgan, S. E., Fraser, S. G., Choyce, D. P., & Alexander, W. L. (1996). Twelve year follow-up of unfenestrated polysulfone intracorneal lenses in human sighted eyes. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 22(8), 1045-1051.
- Ibrahim-Elzembely, H. A., Kaufman, S. C., & Kaufman, H. E. (2003). Human fibrin tissue glue for corneal lamellar adhesion in rabbits: a preliminary study. *Cornea*, 22(8), 735-739.
- Ismail, M. M. (2002). Correction of hyperopia with intracorneal implants. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 28(3), 527-530.
- Ivarsen, A., Laurberg, T., & Moller-Pedersen, T. (2003). Characterisation of corneal fibrotic wound repair at the LASIK flap margin. *British Journal of Ophthalmology*, 87(10), 1272-1278.
- Jakobiec, F. A., Koch, P., Iwamoto, T., Harrison, W., & Troutman, R. (1981). Keratophakia and keratomileusis: comparison of pathologic features in penetrating keratoplasty specimens. *Ophthalmology*, 88(12), 1251-1259.
- Jester, J. V., Huang, J., Petroll, W. M., & Cavanagh, H. D. (2002). TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res*, 75(6), 645-657.
- Jester, J. V., Steel, D., Salz, J., Miyashiro, J., Rife, L., Schanzlin, D. J., & Smith, R. E. (1981). Radial keratotomy in non-human primate eyes. *American Journal of Ophthalmology*, 92(2), 153-171.
- Kampmeier, J., Radt, B., Birngruber, R., & Brinkmann, R. (2000). Thermal and biomechanical parameters of porcine cornea. *Cornea*, 19(3), 355-363.
- Kang, P. C., Carnahan, M. A., Wathier, M., Grinstaff, M. W., & Kim, T. (2005). Novel tissue adhesives to secure laser in situ keratomileusis flaps. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 31(6), 1208-1212.
- Katakami, C., Sahori, A., Kazusa, R., & Yamamoto, M. (1991). Keratocyte activity in wound healing after epikeratophakia in rabbits. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 32(6), 1837-1845.
- Katsanevaki, V. J., Naoumidi, I. I., Kalyvianaki, M. I., & Pallikaris, G. (2006). Epi-LASIK: histological findings of separated epithelial sheets 24 hours after treatment. *Journal of Refractive Surgery*, 22(2), 151-154.
- Kaufman, H. E. (1980). The correction of aphakia. XXXVI Edward Jackson Memorial Lecture. *American Journal of Ophthalmology*, 89(1), 1-10.
- Kaufman, H. E., Insler, M. S., Ibrahim-Elzembely, H. A., & Kaufman, S. C. (2003). Human fibrin tissue adhesive for sutureless lamellar keratoplasty and scleral patch adhesion: a pilot study. *Ophthalmology*, 110(11), 2168-2172.
- Keates, R. H., Martines, E., Tennen, D. G., & Reich, C. (1995). Small-diameter corneal inlay in presbyopic or pseudophakic patients. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 21(5), 519-521.
- Kelley, C. G., Keates, R. H., & Lembach, R. G. (1986). Epikeratophakia for pediatric aphakia. *Archives of Ophthalmology*, 104(5), 680-682.
- Kim, J. H., Oh, C. H., Song, J. S., & Kim, H. M. (2006). Inadvertent stromal dissection during mechanical separation of the corneal epithelium using an epikeratome. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 32(10), 1759-1763.
- Kim, W. J., Mohan, R. R., Mohan, R. R., & Wilson, S. E. (1999). Effect of PDGF, IL-1alpha,

- and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 40(7), 1364-1372.
- Kirkness, C. M. & Steele, A. D. (1985). Polysulfone corneal inlays. *Lancet*, 1(8432), 811.
- Klyce, S. D. & Beuerman, R. W. (1988). Structure and function of the cornea. In H. E. Kaufman, B. A. Barron, M. B. McDonald, & S. R. Waltmann (Eds.), *The cornea* (pp. 3-54). New York: Churchill Livingstone.
- Knorz, M. C. (2002). Flap and interface complications in LASIK. *Curr Opin Ophthalmol*, 13(4), 242-245.
- Kohnen, T. (2002). Iatrogenic keratectasia: current knowledge, current measurements. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 28(12), 2065-2066.
- Kohnen, T., Baumeister, M., & Cichocki, M. (2005). [Intraocular lenses for the correction of refraction errors. Part 1: phakic anterior chamber lenses]. *Ophthalmologe*, 102(10), 1003-7; quiz 1018.
- Kohnen, T., Husain, S. E., & Koch, D. D. (1996). Corneal topographic changes after noncontact holmium:YAG laser thermal keratoplasty to correct hyperopia. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 22(4), 427-435.
- Kohnen, T., Villarreal, R. t., Menefee, R., Berry, M., & Koch, D. D. (1997). Hyperopia correction by noncontact holmium: YAG laser thermal keratoplasty: five-pulse treatments with 1-year follow-up. *Graefes Archive of Clinical and Experimental Ophthalmology*, 235(11), 702-708.
- Kollias, A., Ulbig, M. W., Spitzlberger, G. M., Abdallat, W. H., Froehlich, S., Welge-Luesen, U., & Lackerbauer, C. A. (2007). Epi-LASIK using the Amadeus II microkeratome: evaluation of cut quality using light and electron microscopy. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 33(12), 2118-2121.
- Krumeich, J. H. (1981). [Keratomileusis. A new surgical technic in eye surgery. Information for the general practitioner]. *Z. Allgemeinmed*, 57(17), 1321-1326.
- Krumeich, J. H. (2000). Freeze-Keratomileusis. In T. Seiler (Ed.), *Refraktive Chirurgie der Hornhaut* (pp. 96-116). Stuttgart: Thieme.
- Krumeich, J. H. & Knuelle, A. (1990). [Non-freeze epikeratophakia (live epikeratophakia)]. *Fortschritte der Ophthalmologie*, 87(1), 20-24.
- Krumeich, J. H. & Swinger, C. A. (1987). Nonfreeze epikeratophakia for the correction of myopia. *American Journal of Ophthalmology*, 103(3 Pt 2), 397-403.
- Kurpakus, M. A., Daneshvar, C., Davenport, J., & Kim, A. (1999). Human corneal epithelial cell adhesion to laminins. *Curr Eye Res*, 19(2), 106-114.
- Kuwayama, Y. & Stone, R. A. (1987). Distinct substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in the guinea pig eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 28(12), 1947-1954.
- Kymionis, G. D., Siganos, C. S., Kounis, G., Astyrakakis, N., Kalyvianaki, M. I., & Pallikaris, I. G. (2003). Management of post-LASIK corneal ectasia with Intacs inserts: one-year results. *Archives of Ophthalmology*, 121(3), 322-326.
- Lane, S. L., Lindstrom, R. L., Cameron, J. D., Thomas, R. H., Mindrup, E. A., Waring, G. O. r., McCarey, B. E., & Binder, P. S. (1986). Polysulfone corneal lenses. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 12(1), 50-60.
- Lans, L. J. (1898). Experimentelle Untersuchungen über Entstehung von Astigmatismus durch nicht-perforierende Corneawunden. *Graefes Archiv für Ophthalmologie*, 45, 117.

- Latkany, R., Tsuk, A., Sheu, M. S., Loh, I. H., & Trinkaus-Randall, V. (1997). Plasma surface modification of artificial corneas for optimal epithelialization. *J Biomed Mater Res*, 36(1), 29-37.
- Lee, T. J., Wan, W. L., Kash, R. L., Kratz, K. L., & Schanzlin, D. J. (1985). Keratocyte survival following a controlled-rate freeze. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 26(9), 1210-1215.
- Linsenmayer, T. F., Fitch, J. M., Gordon, M. K., Cai, C. X., Igoe, F., Marchant, J. K., & Birk, D. E. (1998). Development and roles of collagenous matrices in the embryonic avian cornea. *Prog Retin Eye Res*, 17(2), 231-265.
- Lohmann, C. P., Gartry, D. S., Muir, M. K., Timberlake, G. T., Fitzke, F. W., & Marshall, J. (1991). Corneal haze after excimer laser refractive surgery: objective measurements and functional implications. *Eur J Ophthalmol*, 1(4), 173-180.
- Lohmann, C. P., Heeb, M., Linde, H. J., Gabel, V. P., & Reischl, U. (1998). Diagnosis of infectious endophthalmitis after cataract surgery by polymerase chain reaction. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 24(6), 821-826.
- Lohmann, C. P., Linde, H. J., & Reischl, U. (2000). Improved detection of microorganisms by polymerase chain reaction in delayed endophthalmitis after cataract surgery. *Ophthalmology*, 107(6), 1047-51; discussion 1051-2.
- Lohmann, C. P., Patmore, A., Reischl, U., & Marshall, J. (1996). The importance of the corneal epithelium in excimer-laser photorefractive keratectomy. *Ger J Ophthalmol*, 5(6), 368-372.
- Lohmann, C. P., Winkler von Mohrenfels, C., Gabler, B., Hermann, W., & Muller, M. (2002). [Excimer laser subepithelial ablation (ELSA) or laser epithelial keratomileusis (LASEK) - a new kerato-refractive procedure for myopia. Surgical technique and first clinical results on 24 eyes and 3 months follow-up]. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 219(1-2), 26-32.
- Lyle, W. A. & Jin, G. J. (1996). Initial results of automated lamellar keratoplasty for correction of myopia: one year follow-up. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 22(1), 31-43.
- Lyle, W. A. & Jin, G. J. (1998). Hyperopic automated lamellar keratoplasty: complications and visual results. *Archives of Ophthalmology*, 116(4), 425-428.
- Maddox, R. A., Belay, E. D., Curns, A. T., Zou, W. Q., Nowicki, S., Lembach, R. G., Geschwind, M. D., Haman, A., Shinozaki, N., Nakamura, Y., Borer, M. J., & Schonberger, L. B. (2008). Creutzfeldt-Jakob disease in recipients of corneal transplants. *Cornea*, 27(7), 851-854.
- Maldonado, M. J., Ruiz-Oblitas, L., Munuera, J. M., Aliseda, D., Garcia-Layana, A., & Moreno-Montanes, J. (2000). Optical coherence tomography evaluation of the corneal cap and stromal bed features after laser in situ keratomileusis for high myopia and astigmatism. *Ophthalmology*, 107(1), 81-7; discussion 88.
- Manche, E. E., Judge, A., & Maloney, R. K. (1996). Lamellar keratoplasty for hyperopia. *Journal of Refractive Surgery*, 12(1), 42-49.
- Manche, E. E. & Maloney, R. K. (1996). Keratomileusis in situ for high myopia. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 22(10), 1443-1450.
- Marshall, J., Trokel, S. L., Rothery, S., & Krueger, R. R. (1988). Long-term healing of the central cornea after photorefractive keratectomy using an excimer laser. *Ophthalmology*, 95(10), 1411-1421.
- Maurice, D. M. (1957). The structure and transparency of the cornea. *Journal of Physiology*, 136(2), 263-286.
- McCarey, B. E. & Andrews, D. M. (1981). Refractive keratoplasty with intrastromal hydrogel

- lenticular implants. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 21(1 Pt 1), 107-115.
- McCarey, B. E., Andrews, D. M., Hatchell, D. L., & Pederson, H. (1982). Hydrogel implants for refractive keratoplasty: corneal morphology. *Curr Eye Res*, 2(1), 29-38.
- McCarey, B. E. & Kaufman, H. E. (1974). Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol*, 13(3), 165-173.
- McCarey, B. E., Storie, B. R., van Rij, G., & Knight, P. M. (1990). Refractive predictability of myopic hydrogel intracorneal lenses in nonhuman primate eyes. *Archives of Ophthalmology*, 108(9), 1310-1315.
- McCarey, B. E., Waring, G. O. r., & Street, D. A. (1987). Refractive keratoplasty in monkeys using intracorneal lenses of various refractive indexes. *Archives of Ophthalmology*, 105(1), 123-126.
- McDermott, M. C. (1994). Das Epithel der Kornea. In K. W. Jacobi (Ed.), *Erkrankungen des äußeren Auges/Chandler/Sugar/Edelhauser* (pp. 4.1-4.4). Berlin; Wiesbaden: Ullstein Mosby.
- McDonald, M. (2002). Conductive keratoplasty for the correction of low to moderate hyperopia: one-year results on the first 54 eyes. *Ophthalmology*, 109(9), 1583.
- McDonald, M. B. (2005). Conductive keratoplasty: a radiofrequency-based technique for the correction of hyperopia. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 103, 512-536.
- McDonald, M. B., Kaufman, H. E., Aquavella, J. V., Durrie, D. S., Hiles, D. A., Hunkeler, J. D., Keates, R. H., Morgan, K. S., & Sanders, D. R. (1987a). The nationwide study of epikeratophakia for aphakia in adults. *American Journal of Ophthalmology*, 103(3 Pt 2), 358-365.
- McDonald, M. B., Kaufman, H. E., Aquavella, J. V., Durrie, D. S., Hiles, D. A., Hunkeler, J. D., Keates, R. H., Morgan, K. S., & Sanders, D. R. (1987b). The nationwide study of epikeratophakia for myopia. *American Journal of Ophthalmology*, 103(3 Pt 2), 375-383.
- McDonald, M. B., Kaufman, H. E., Frantz, J. M., Shofner, S., Salmeron, B., & Klyce, S. D. (1989). Excimer laser ablation in a human eye. Case report. *Archives of Ophthalmology*, 107(5), 641-642.
- McDonald, M. B., Klyce, S. D., Suarez, H., Kandarakis, A., Friedlander, M. H., & Kaufman, H. E. (1985). Epikeratophakia for myopia correction. *Ophthalmology*, 92(10), 1417-1422.
- McDonald, M. B., Koenig, S. B., Safir, A., Friedlander, M. H., Kaufman, H. E., & Granet, N. (1983). Epikeratophakia: the surgical correction of aphakia. Update: 1982. *Ophthalmology*, 90(6), 668-672.
- McDonald, M. B., McCarey, B. E., Storie, B., Beuerman, R. W., Salmeron, B., van Rij, G., & Knight, P. M. (1993). Assessment of the long-term corneal response to hydrogel intrastromal lenses implanted in monkey eyes for up to five years. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 19(2), 213-222.
- McDonald, M. B. (1988). The future direction of refractive surgery. *Journal of Refractive Surgery*, 4, 158-168.
- McLaughlin, B. J., Caldwell, R. B., Sasaki, Y., & Wood, T. O. (1985). Freeze-fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res*, 4(9), 951-961.
- Menezo, J. L., Peris-Martinez, C., Cisneros-Lanuza, A. L., & Martinez-Costa, R. (2004). Rate of cataract formation in 343 highly myopic eyes after implantation of three types of phakic intraocular lenses. *Journal of Refractive Surgery*, 20(4), 317-324.

- Merindano, M. D., Canals, M., Potau, J. M., Costa, J., & Ruano, D. (1998). Morphometrical features of the corneal epithelium in mammals. *Anat Histol Embryol*, 27(2), 105-110.
- Merindano, M. D., Costa, J., Canals, M., Potau, J. M., & Ruano, D. (2002). A comparative study of Bowman's layer in some mammals: Relationships with other constituent corneal structures. *Eur J Anat*, 6(3), 133-139.
- Merrett, K., Griffith, C. M., Deslandes, Y., Pleizier, G., & Sheardown, H. (2001). Adhesion of corneal epithelial cells to cell adhesion peptide modified pHEMA surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed*, 12(6), 647-671.
- Mester, U., Roth, K., & Dardenne, U. (1974). [Trial with 2-hydroxy-ethyl-methacrylate lenses as keratophakia material]. *Ber Zusammenkunft Dtsch Ophthalmol Ges*, 72, 326-329.
- Mester, U., Stein, H. J., & Meier, J. (1978). [Permeability of hydrogel plastics (PHEMA) to different substances of corneal metabolism (author's transl)]. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, 205(3), 207-212.
- Mimouni, F., Colin, J., Koffi, V., & Bonnet, P. (1991). Damage to the corneal endothelium from anterior chamber intraocular lenses in phakic myopic eyes. *Refractive and Corneal Surgery*, 7(4), 277-281.
- Mohan, R. R., Hutcheon, A. E., Choi, R., Hong, J., Lee, J., Mohan, R. R., Ambrosio, R. J., Zieske, J. D., & Wilson, S. E. (2003). Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res*, 76(1), 71-87.
- Mohan, R. R., Liang, Q., Kim, W. J., Helena, M. C., Baerveldt, F., & Wilson, S. E. (1997). Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res*, 65(4), 575-589.
- Morgan, K. S., Arffa, R. C., Marvelli, T. L., & Verity, S. M. (1986). Five year follow-up of epikeratophakia in children. *Ophthalmology*, 93(4), 423-432.
- Morgan, K. S., McDonald, M. B., Hiles, D. A., Aquavella, J. V., Durrie, D. S., Hunkeler, J. D., Kaufman, H. E., Keates, R. H., & Sanders, D. R. (1988). The nationwide study of epikeratophakia for aphakia in older children. *Ophthalmology*, 95(4), 526-532.
- Morgan, K. S., Stephenson, G. S., McDonald, M. B., & Kaufman, H. E. (1984). Epikeratophakia in children. *Ophthalmology*, 91(7), 780-784.
- Müller, A. (1889). *Brillengläser und Hornhautlinsen*. Kiel.
- Munnerlyn, C. R., Koons, S. J., & Marshall, J. (1988). Photorefractive keratectomy: a technique for laser refractive surgery. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 14(1), 46-52.
- Nakamura, M., Kawahara, M., Morishige, N., Chikama, T., Nakata, K., & Nishida, T. (2003a). Promotion of corneal epithelial wound healing in diabetic rats by the combination of a substance P-derived peptide (FGLM-NH2) and insulin-like growth factor-1. *Diabetologia*, 46(6), 839-842.
- Nakamura, M., Kawahara, M., Nakata, K., & Nishida, T. (2003b). Restoration of corneal epithelial barrier function and wound healing by substance P and IGF-1 in rats with capsaicin-induced neurotrophic keratopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(7), 2937-2940.
- Nano, H. D. & Muzzin, S. (1998). Noncontact holmium:YAG laser thermal keratoplasty for hyperopia. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 24(6), 751-757.
- Naoumidi, I., Papadaki, T., Zacharopoulos, I., Siganos, C., & Pallikaris, I. (2003). Epithelial ingrowth after laser in situ keratomileusis: a histopathologic study in human corneas. *Archives of Ophthalmology*, 121(7), 950-955.

- Netto, M. V., Mohan, R. R., Ambrosio, R. J., Hutcheon, A. E., Zieske, J. D., & Wilson, S. E. (2005). Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea*, 24(5), 509-522.
- Neumann, A. C., Fyodorov, S., & Sanders, D. R. (1990). Radial thermokeratoplasty for the correction of hyperopia. *Refractive and Corneal Surgery*, 6(6), 404-412.
- Neumann, A. C., Sanders, D., Raanan, M., & DeLuca, M. (1991). Hyperopic thermokeratoplasty: clinical evaluation. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 17(6), 830-838.
- Nielsen, L. S. & Lind, N. M. (2005). Measurements of Three Ocular Parameters in the Göttingen Minipig. *Scand. J. Lab. Anim. Sci*, 32(1), 9-16.
- Nishida, T. (1997). Cornea. In J. H. Krachmer, M. J. Mannis, & E. J. Holland (Eds.), *Cornea. Fundamentals of Cornea and External Disease (Vol. 1)* (pp. 10-11). St. Louis: Mosby.
- O'Brien, T. P., Li, Q., Ashraf, M. F., Matteson, D. M., Stark, W. J., & Chan, C. C. (1998). Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy. *Archives of Ophthalmology*, 116(11), 1470-1474.
- Obata, H. & Tsuru, T. (2007). Corneal wound healing from the perspective of keratoplasty specimens with special reference to the function of the Bowman layer and Descemet membrane. *Cornea*, 26(9 Suppl 1), S82-9.
- Ohrloff, C., Duffin, M., Apple, D. J., & Olson, R. J. (1984). Opacification, vascularization, and chronic inflammation produced by hydrogel corneal lamellar implants. *American Journal of Ophthalmology*, 98(4), 422-425.
- Pallikaris, I. G., Katsanevaki, V. J., Kalyvianaki, M. I., & Naoumidi, I. I. (2003). Advances in subepithelial excimer refractive surgery techniques: Epi-LASIK. *Curr Opin Ophthalmol*, 14(4), 207-212.
- Pallikaris, I. G., Kymionis, G. D., & Astyrakakis, N. I. (2001). Corneal ectasia induced by laser in situ keratomileusis. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 27(11), 1796-1802.
- Pallikaris, I. G., Naoumidi, T. L., & Astyrakakis, N. I. (2005). Long-term results of conductive keratoplasty for low to moderate hyperopia. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 31(8), 1520-1529.
- Pallikaris, I. G., Papatzanaki, M. E., Stathi, E. Z., Frenschock, O., & Georgiadis, A. (1990). Laser in situ keratomileusis. *Lasers Surg Med*, 10(5), 463-468.
- Pallikaris, I. G. & Siganos, D. S. (1994). Excimer laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy for correction of high myopia. *Journal of refractive and corneal surgery*, 10(5), 498-510.
- Panas, P. (1888). le traitement du k ratocone. *Bull Acad Med*, 19, 400-401.
- Parks, R. A. & McCarey, B. E. (1991). Hydrogel keratophakia: long-term morphology in the monkey model. *CLAO J*, 17(3), 216-222.
- Parks, R. A., McCarey, B. E., Knight, P. M., & Storie, B. R. (1993). Intrastromal crystalline deposits following hydrogel keratophakia in monkeys. *Cornea*, 12(1), 29-34.
- Patel, S., Marshall, J., & Fitzke, F. W. r. (1995). Refractive index of the human corneal epithelium and stroma. *Journal of Refractive Surgery*, 11(2), 100-105.
- Pearson, R. M. (1989). Kalt, keratoconus, and the contact lens. *Optometry and Vision Science*, 66(9), 643-646.
- Peiffer, R. L., Werblin, T. P., & Fryczkowski, A. W. (1985). Pathology of corneal hydrogel alloplastic implants. *Ophthalmology*, 92(9), 1294-1304.
- Perez-Santonja, J. J., Iradier, M. T., Benitez del Castillo, J. M., Serrano, J. M., & Zato, M. A.

- (1996). Chronic subclinical inflammation in phakic eyes with intraocular lenses to correct myopia. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 22(2), 183-187.
- Petroll, W. M., Goldberg, D., Lindsey, S. S., Kelley, P. S., Cavanagh, H. D., Bowman, R. W., Parmar, D. N., Verity, S. M., & McCulley, J. P. (2006). Confocal assessment of the corneal response to intracorneal lens insertion and laser in situ keratomileusis with flap creation using IntraLase. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 32(7), 1119-1128.
- Peyman, G. A., Beyer, C. F., Bezerra, Y., Vincent, J. M., Arosemena, A., Friedlander, M. H., Hoffmann, L., Kangelor, J., & Roussau, D. (2005). Photoablative inlay laser in situ keratomileusis (PAI-LASIK) in the rabbit model. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 31(2), 389-397.
- Pop, M. & Payette, Y. (2004). Initial results of endothelial cell counts after Artisan lens for phakic eyes: an evaluation of the United States Food and Drug Administration Ophtec Study. *Ophthalmology*, 111(2), 309-317.
- Price, F. W. J., Whitson, W. E., Gonzales, J. S., Gonzales, C. R., & Smith, J. (1996). Automated lamellar keratomileusis in situ for myopia. *Journal of Refractive Surgery*, 12(1), 29-35.
- Prince, J. H., Diesem, C. H., Eglitis, I., & Ruskell, G. L. (1960). *Anatomy and histology of the eye and orbit in domestic animals*. Springfield: Charles C. Thomas.
- Pulhorn, G. & Thiel, H. J. (1973). [Electron microscope investigation in basal membrane regeneration of epithelium (author's transl)]. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, 189(1), 21-32.
- Puliafito, C. A., Steinert, R. F., Deutsch, T. F., Hillenkamp, F., Dehm, E. J., & Adler, C. M. (1985). Excimer laser ablation of the cornea and lens. Experimental studies. *Ophthalmology*, 92(6), 741-748.
- Raja, N. & Niazi, M. K. (2004). Effects of depth of incision on final outcome in radial keratotomy. *J Pak Med Assoc*, 54(7), 361-364.
- Ramos, M., Kruger, E. F., & Lashkari, K. (2002). Biostatistical analysis of pseudophakic and aphakic retinal detachments. *Seminars in Ophthalmology*, 17(3-4), 206-213.
- Randleman, J. B., Russell, B., Ward, M. A., Thompson, K. P., & Stulting, R. D. (2003). Risk factors and prognosis for corneal ectasia after LASIK. *Ophthalmology*, 110(2), 267-275.
- Rapuano, C. J., Sugar, A., Koch, D. D., Agapitos, P. J., Culbertson, W. W., de Luise, V. P., Huang, D., & Varley, G. A. (2001). Intrastromal corneal ring segments for low myopia: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*, 108(10), 1922-1928.
- Refojo, M. F. (1969). Artificial membranes for corneal surgery. *J Biomed Mater Res*, 3(2), 333-347.
- Reim, M., Lax, F., Lichte, H., & Turss, R. (1967). Steady state levels of glucose in the different layers of the cornea, aqueous humor, blood and tears in vivo. *Ophthalmologica*, 154(1), 39-50.
- Reinstein, D. Z., Ameline, B., Puech, M., Montefiore, G., & Laroche, L. (2005). VHF digital ultrasound three-dimensional scanning in the diagnosis of myopic regression after corneal refractive surgery. *Journal of Refractive Surgery*, 21(5), 480-484.
- Reinstein, D. Z., Silverman, R. H., Raevsky, T., Simoni, G. J., Lloyd, H. O., Najafi, D. J., Rondeau, M. J., & Coleman, D. J. (2000). Arc-scanning very high-frequency digital ultrasound for 3D pachymetric mapping of the corneal epithelium and stroma in laser in situ keratomileusis. *Journal of Refractive Surgery*, 16(4), 414-430.
- Ridley, H. (2003). Intra-ocular acrylic lenses after cataract extraction. 1952. *Bull World Health Organ*, 81(10), 758-761.

- Robin, J. B., Picciano, P., Kusleika, R. S., Salazar, J., & Benedict, C. (1988). Preliminary evaluation of the use of mussel adhesive protein in experimental epikeratoplasty. *Archives of Ophthalmology*, 106(7), 973-977.
- Rodrigues, M. M., McCarey, B. E., Waring, G. O. r., Hidayat, A. A., & Kruth, H. S. (1990). Lipid deposits posterior to impermeable intracorneal lenses in rhesus monkeys: clinical, histochemical, and ultrastructural studies. *Refractive and Corneal Surgery*, 6(1), 32-37.
- Rostron, C. (1990). Epikeratophakia with biological adhesive. *British Journal of Ophthalmology*, 74(6), 384.
- Rostron, C. K., Brittain, G. P., Morton, D. B., & Rees, J. E. (1988). Experimental epikeratophakia with biological adhesive. *Archives of Ophthalmology*, 106(8), 1103-1106.
- Rousselle, P., Lunstrum, G. P., Keene, D. R., & Burgeson, R. E. (1991). Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *Journal of Cell Biology*, 114(3), 567-576.
- Ruckhofer, J., Stoiber, J., Alzner, E., & Grabner, G. (2000). [Intrastromal corneal ring segments (ICRS, KeraVision Ring, Intacs): clinical outcome after 2 years]. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 216(3), 133-142.
- Salz, J. J., Lee, T., Jester, J. V., Villasenor, R. A., Steel, D., Bernstein, J., & Smith, R. E. (1983). Analysis of incision depth following experimental radial keratotomy. *Ophthalmology*, 90(6), 655-659.
- Sato, T., Akiyama, K., & Shibata, H. (1953). A new surgical approach to myopia. *American Journal of Ophthalmology*, 36(6:1), 823-829.
- Schanzlin, D. J., Jester, J. V., & Kay, E. (1983). Cryolathe Corneal Injury. *Cornea*, 2(1), 57-68.
- Schinz, H. & Schutte, E. (1991). [Aphakic retinal detachment in myopic eyes]. *Fortschritte der Ophthalmologie*, 88(2), 142-147.
- Schlichtemeier, W. R. (1987). Epikeratophakia for myopia. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 13(1)(1), 84.
- Schmack, I., Dawson, D. G., McCarey, B. E., Waring, G. O. r., Grossniklaus, H. E., & Edelhauser, H. F. (2005). Cohesive tensile strength of human LASIK wounds with histologic, ultrastructural, and clinical correlations. *Journal of Refractive Surgery*, 21(5), 433-445.
- Seiler, T., Koufala, K., & Richter, G. (1998). Iatrogenic keratectasia after laser in situ keratomileusis. *Journal of Refractive Surgery*, 14(3), 312-317.
- Seiler, T., Matallana, M., & Bende, T. (1990). Laser thermokeratoplasty by means of a pulsed holmium:YAG laser for hyperopic correction. *Refractive and Corneal Surgery*, 6(5), 335-339.
- Siganos, C. S., Kymionis, G. D., Astyrakakis, N., & Pallikaris, I. G. (2002). Management of corneal ectasia after laser in situ keratomileusis with INTACS. *Journal of Refractive Surgery*, 18(1), 43-46.
- Siganos, C. S., Kymionis, G. D., Kartakis, N., Theodorakis, M. A., Astyrakakis, N., & Pallikaris, I. G. (2003). Management of keratoconus with Intacs. *American Journal of Ophthalmology*, 135(1), 64-70.
- Simon, G., Ren, Q., Kervick, G. N., & Parel, J. M. (1993). Optics of the corneal epithelium. *Refractive and Corneal Surgery*, 9(1), 42-50.
- Steinert, R. F., Storie, B., Smith, P., McDonald, M. B., van Rij, G., Bores, L. D., Colin, J. P., Durrie, D. S., Kelley, C., Price, F. J., Rostron, C., Waring, G. O. r., & Nordan, L. T. (1996). Hydrogel intracorneal lenses in aphakic eyes. *Archives of Ophthalmology*, 114(2), 135-141.

- Stone, R. A. & McGlenn, A. M. (1988). Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in human and rhesus monkey eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 29(2), 305-310.
- Stramer, B. M., Zieske, J. D., Jung, J. C., Austin, J. S., & Fini, M. E. (2003). Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(10), 4237-4246.
- Sturm, J. C. (1838). Mémoire sur l'optique. *J Math Pures Appl*, 3, 357-384.
- Suzuki, K., Saito, J., Yanai, R., Yamada, N., Chikama, T., Seki, K., & Nishida, T. (2003). Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing. *Prog Retin Eye Res*, 22(2), 113-133.
- Suzuki, K., Tanaka, T., Enoki, M., & Nishida, T. (2000). Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(9), 2495-2500.
- Svedbergh, B. & Bill, A. (1972). Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 50(3), 321-336.
- Sweeney, D. F., Vannas, A., Hughes, T. C., Evans, M. D., McLean, K. M., Xie, R. Z., Pravin, V. K., & Prakasam, R. K. (2008). Synthetic corneal inlays. *Clin Exp Optom*, 91(1), 56-66.
- Sweeney, D. F., Xie, R. Z., Evans, M. D., Vannas, A., Tout, S. D., Griesser, H. J., Johnson, G., & Steele, J. G. (2003). A comparison of biological coatings for the promotion of corneal epithelialization of synthetic surface in vivo. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(8), 3301-3309.
- Sweeney, D. F., Xie, R. Z., O'Leary, D. J., Vannas, A., Odell, R., Schindhelm, K., Cheng, H. Y., Steele, J. G., & Holden, B. A. (1998). Nutritional requirements of the corneal epithelium and anterior stroma: clinical findings. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 39(2), 284-291.
- Swinger, C., Krumeich, J., & Cassiday, D. (1986). Planar lamellar refractive keratoplasty. *Journal of Refractive Surgery*, 2(1), 17-24.
- Swinger, C. A. & Barker, B. A. (1984). Prospective evaluation of myopic keratomileusis. *Ophthalmology*, 91(7), 785-792.
- Swinger, C. A. & Barraquer, J. I. (1981). Keratophakia and keratomileusis--clinical results. *Ophthalmology*, 88(8), 709-715.
- Swinger, C. A., Troutman, R. C., & Forman, J. S. (1987). Keratophakia--postoperative astigmatism. *Cornea*, 6(3), 202-206.
- Swinger, C. A. & Wisnicki, H. J. (1985). Freezing increment in keratophakia. *Cornea*, 4(4), 225-228.
- Tan, B. U., Purcell, T. L., Torres, L. F., & Schanzlin, D. J. (2006). New surgical approaches to the management of keratoconus and post-LASIK ectasia. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 104, 212-220.
- Tanioka, H., Hieda, O., Kawasaki, S., Nakai, Y., & Kinoshita, S. (2007). Assessment of epithelial integrity and cell viability in epithelial flaps prepared with the epi-LASIK procedure. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 33(7), 1195-1200.
- Taylor, D. M., Stern, A. L., Romanchuk, K. G., & Keilson, L. R. (1981). Keratophakia. Clinical evaluation. *Ophthalmology*, 88(11), 1141-1150.
- Thoft, R. A. & Friend, J. (1983). The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 24(10)(10), 1442-1443.

- Thoft, R. A., Friend, J., & Dohlman, C. H. (1971a). Corneal glucose concentration. Flux in the presence and absence of epithelium. *Archives of Ophthalmology*, 85(4), 467-472.
- Thoft, R. A., Friend, J., & Dohlman, C. H. (1971b). Corneal glucose flux. II. Its response to anterior chamber blockade and endothelial damage. *Archives of Ophthalmology*, 86(6), 685-691.
- Thompson, K. P. & Daniel, J. (1997). Synthetic Epikeratoplasty. In J. H. Krachmer, M. J. Mannis, & E. J. Holland (Eds.), *Cornea. Surgery of the Cornea and Conjunctiva (Vol. 3)* (pp. 2233-2241). St. Louis: Mosby.
- Thompson, K. P., Hanna, K., Waring, G. O. r., Gipson, I., Liu, Y., Gailitis, R. P., Johnson-Wint, B., & Green, K. (1991). Current status of synthetic epikeratoplasty. *Refractive and Corneal Surgery*, 7(3), 240-248.
- Thompson, K. P., Hanna, K. D., Gipson, I. K., Gravagna, P., Waring, G. O. r., & Johnson-Wint, B. (1993). Synthetic epikeratoplasty in rhesus monkeys with human type IV collagen. *Cornea*, 12(1), 35-45.
- Trinkaus-Randall, V., Wu, X. Y., Tablante, R., & Tsuk, A. (1997). Implantation of a synthetic cornea: design, development and biological response. *Artif Organs*, 21(11), 1185-1191.
- Twa, M. D., Karpecki, P. M., King, B. J., Linn, S. H., Durrie, D. S., & Schanzlin, D. J. (1999). One-year results from the phase III investigation of the KeraVision Intacs. *J Am Optom Assoc*, 70(8), 515-524.
- Ustundag, C., Bahcecioglu, H., Ozdamar, A., Aras, C., Yildirim, R., & Ozkan, S. (2000). Optical coherence tomography for evaluation of anatomical changes in the cornea after laser in situ keratomileusis. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 26(10), 1458-1462.
- Van Gelder, R. N., Steger-May, K., Yang, S. H., Rattanatham, T., & Pepose, J. S. (2002). Comparison of photorefractive keratectomy, astigmatic PRK, laser in situ keratomileusis, and astigmatic LASIK in the treatment of myopia. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 28(3), 462-476.
- van Rij, G. & Waring, G. O. r. (1984). Changes in corneal curvature induced by sutures and incisions. *American Journal of Ophthalmology*, 98(6), 773-783.
- Verzella, F. (1986). [Severe myopia: extraction of the crystalline lens and implantation in the posterior chamber for optical purposes]. *Bull Mem Soc Fr Ophtalmol*, 97, 347-350.
- Verzella, F. (1985). Microsurgery of the lens in high myopia for optical purposes [letter]. *Journal of the American Intraocular Implant Society*, 11(1), 65.
- Vinciguerra, P., Kohnen, T., Azzolini, M., Radice, P., Epstein, D., & Koch, D. D. (1998). Radial and staggered treatment patterns to correct hyperopia using noncontact holmium:YAG laser thermal keratoplasty. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 24(1), 21-30.
- Wang, M. Y. & Maloney, R. K. (2000). Epithelial ingrowth after laser in situ keratomileusis. *American Journal of Ophthalmology*, 129(6), 746-751.
- Waring, G. O. r., Lynn, M. J., Nizam, A., Kutner, M. H., Cowden, J. W., Culbertson, W., Laibson, P. R., McDonald, M. B., Nelson, J. D., Obstbaum, S. A., & et, a. (1991). Results of the Prospective Evaluation of Radial Keratotomy (PERK) Study five years after surgery. The Perk Study Group. *Ophthalmology*, 98(8), 1164-1176.
- Weiske, J., Schoneberg, T., Schroder, W., Hatzfeld, M., Tauber, R., & Huber, O. (2001). The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41175-41181.
- Werblin, T. P., Fryczkowski, A. W., & Peiffer, R. L. (1984a). Myopic correction using alloplastic implants in non-human primates--a preliminary report. *Annals of Ophthalmology*,

16(12), 1127-1130.

Werblin, T. P. & Kaufman, H. E. (1981). Epikeratophakia: the surgical correction of aphakia. II. Preliminary results in a non-human primate model. *Curr Eye Res*, 1(3), 131-137.

Werblin, T. P., Kaufman, H. E., Friedlander, M. H., & Granet, N. (1981). Epikeratophakia: the surgical correction of aphakia. III. Preliminary results of a prospective clinical trial. *Archives of Ophthalmology*, 99(11), 1957-1960.

Werblin, T. P. & Klyce, S. D. (1981). Epikeratophakia: the surgical correction of aphakia. I. Lathing of corneal tissue. *Curr Eye Res*, 1(3), 123-129.

Werblin, T. P., Patel, A. S., & Barraquer, J. I. (1992a). Initial human experience with Permalens myopic hydrogel intracorneal lens implants. *Refractive and Corneal Surgery*, 8(1), 23-26.

Werblin, T. P., Peiffer, R. L., Binder, P. S., McCarey, B. E., & Patel, A. S. (1992b). Eight years experience with Permalens intracorneal lenses in nonhuman primates. *Refractive and Corneal Surgery*, 8(1), 12-22.

Werblin, T. P., Peiffer, R. L., & Fryczkowski, A. (1984b). Myopic hydrogel keratophakia: preliminary report. *Cornea*, 3(3), 197-204.

Wichterle, O. & Lim, D. (1960). Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 185(4706), 117-118.

Wilmes, C., Draeger, J., & Kohlhaas, M. (1992). [Precision of lenticular thickness in relation to full stroma corneal thickness. Experimental results with the lamellar microkeratome]. *Ophthalmologie*, 89(2), 147-150.

Wilson, S. E. & Hong, J. W. (2000). Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea*, 19(4), 417-420.

Wilson, S. E., Liang, Q., & Kim, W. J. (1999a). Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 40(10), 2185-2190.

Wilson, S. E., Liu, J. J., & Mohan, R. R. (1999b). Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res*, 18(3), 293-309.

Wilson, S. E., Mohan, R. R., Mohan, R. R., Ambrosio, R. J., Hong, J., & Lee, J. (2001). The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res*, 20(5), 625-637.

Wirbelauer, C. & Pham, D. T. (2004). Monitoring corneal structures with slitlamp-adapted optical coherence tomography in laser in situ keratomileusis. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 30(9), 1851-1860.

Woo, G. C. & Wilson, M. A. (1990). Current methods of treating and preventing myopia. *Optometry and Vision Science*, 67(9), 719-727.

Woodhams, J. T. (1987). Regression of myopic epikeratophakia effects. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 13(3)(3), 343-344.

Worst, J. G. (1980). Iris claw lens. *Journal of the American Intraocular Implant Society*, 6(2)(2), 166-167.

Xie, R. Z., Sweeney, D. F., Griesser, H. J., Tout, S., Cheng, H. Y., & Steele, J. G. (1999). A thin glycoprotein coating of a synthetic lenticule does not cause nutritional deficiency of the anterior cornea. *Curr Eye Res*, 18(5), 335-341.

Yamaguchi, T., Koenig, S. B., Hamano, T., Kimura, T., Santana, E., McDonald, M. B., & Kaufman, H. E. (1984). Electron microscopic study of intrastromal hydrogel implants in pri-

mates. *Ophthalmology*, 91(10), 1170-1175.

Yoon, Y. D., Waring, G. O. r., Stulting, R. D., Edelhauser, H. F., & Grossniklaus, H. E. (1998). Keratocyte repopulation in epikeratoplasty specimens. *Cornea*, 17(2), 180-184.

Zaldivar, R., Davidorf, J. M., & Oscherow, S. (1998). Posterior chamber phakic intraocular lens for myopia of -8 to -19 diopters. *Journal of Refractive Surgery*, 14(3), 294-305.

Zaldivar, R. & Rocha, G. (1996). The current status of phakic intraocular lenses. *International Ophthalmology Clinics*, 36(4), 107-111.

Zaune, K. M. (2004). *Vergleichende Untersuchungen der Schnittdicke und Schnittqualität von LASIK-Mikrokeratomen*. Ludwigs-Maximilians-Universität, München.

Zavala, E. Y., Krumeich, J., & Binder, P. S. (1987). Laboratory evaluation of freeze vs non-freeze lamellar refractive keratoplasty. *Archives of Ophthalmology*, 105(8), 1125-1128.

Zieske, J. D., Higashijima, S. C., Spurr-Michaud, S. J., & Gipson, I. K. (1987). Biosynthetic responses of the rabbit cornea to a keratectomy wound. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 28(10), 1668-1677.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Chris Lohmann möchte ich mich oftmals für die Themenstellung und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Frau Dr. Karin Kobuch beriet und unterstützte mich bei Planung, Umsetzung und Korrektur des methodischen Teils dieser Arbeit.

Frau Petra Eberl und Frau Andrea Dannullis standen mir bei der praktischen Umsetzung der Experimente stets helfend zur Seite.

Mein Vater, Herr Prof. Dr. Hans-Reinhard Koch, unterstützte mich mit vielen wertvollen Anregungen, Diskussionen und dem Korrekturlesen der Arbeit.

Herr Markus Gäckle, Leiter Vertrieb und Marketing der Gebauer Medizintechnik GmbH, stellte mir die in der Arbeit enthaltenen Abbildungen des Pocket-Delaminator-Systems zur Verfügung und half mir mit technischen Informationen zum PDS und zu Mikrokeratomen im Allgemeinen.

Herr Prof Dr. Ulrich Mester, Sulzbach, sowie Herr Dr. Jörg H. Krumeich, Bochum, stellten mir freundlicherweise einige Ihrer Publikationen auf dem Gebiete der refraktiven Chirurgie zur Verfügung.

Auch ihnen allen gebührt mein herzlicher Dank.