UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

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

Auswirkungen von Perfluorbutylpentan (F4H5) auf corneale Endothelzellen im porcinen Hornhautmodell

Dissertation

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

vorgelegt von

Daniel Alexander Wenzel

aus Tübingen

Hamburg 2019

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.11.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: Prof. Dr. med. Martin Spitzer

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Sven Anders

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Sebastian Thaler

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Pars-Plana-Vitrektomie und Silikonöl 2

1.2 Entstehung von „Sticky Silicone Oil“ 3

1.3 Perfluorbutylpentan (F4H5) 6

1.3.1 Perfluorbutylpentan zur Entfernung von „Sticky Silicone Oil“ 8

1.3.2 Perfluorbutylpentan zur Entfernung von emulsifiziertem Silikonöl 8

1.3.3 Weitere Anwendungen von Perfluorbutylpentan 9

1.3.4 Toxizität von semifluorierten Alkanen und Perfluorbutylpentan 10

1.4 Das corneale Endothel 11

1.5 „Split Corneal Buttons” – ein porcines Hornhautmodell 13

1.6 Ziel der Dissertation 18

2 Material und Methoden 20

2.1 Verwendete Materialien 20

2.1.1 Schweineaugen 20

2.1.1 Verwendete Substanzen 20

2.1.2 Instrumente und Verbrauchsmaterial 21

2.1.3 Geräte & Software 22

2.2 Methoden 23

2.2.1 Präparation der Schweineaugen 23

2.2.2 Vorbereitung des Kulturmediums 23

2.2.3 Exzision der porcinen Hornhautlamellen („Split Corneal Buttons“) 24

2.2.4 Wechsel des Kulturmediums 26

2.2.5 Mikroskopie der porcinen Hornhautlamellen 27

2.2.6 Biokompatibilitätstestung von Perfluorbutylpentan 29

2.2.7 Färbung der Hornhautlamellen 30

2.2.8 Statistische Analyse 33

3 Ergebnisse 34

3.1 Auswirkungen von Perfluorbutylpentan auf die Endothelzelldichte 34

3.2 Morphologische Veränderungen durch Perfluorbutylpentan 41

3.2.1 Reformationsfiguren 41
3.2.2 Rosettenformationen 42
3.2.3 Alizarin-rote Areale 44
3.3 Einfluss der Färbung auf das Ergebnis der Endothelzelldichte 45
4 Diskussion 47
4.1 Anwendung von Perfluorbutylpentan zur Silikonöl-Entfernung 47
4.2 Auswirkungen von Perfluorbutylpentan auf das corneale Endothel 48
4.2.1 Auswirkungen von Perfluorbutylpentan auf die Endothelzelldichte 48
4.2.2 Auswirkungen von Perfluorbutylpentan auf die Zell-Morphologie 50
4.2.3 Interpretation der Ergebnisse 51
4.2.4 Konsequenzen für die klinische Anwendung 58
4.3 „Split Corneal Buttons“ – Bewertung des Hornhautmodells 58
4.4 Einfluss der Färbung auf die Quantifizierung der Endothelzelldichte 62
5 Zusammenfassung 64
6 Literaturverzeichnis 68
7 Anhang 77
7.1 Abkürzungsverzeichnis 77
7.2 Tabellenverzeichnis 78
7.3 Abbildungsverzeichnis 80
7.4 Veröffentlichungen 84
8 Danksagungen 85
9 Lebenslauf 86
10 Eidesstattliche Versicherung 87

1 Einleitung

Netzhautablösungen repräsentieren eine der häufigsten Ursachen für eine akute Visusminderung, wobei die rhegmatogene (rissbedingte) Form mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 10,5 Fällen pro 100.000 Personen die häufigste Form ist und überwiegend Patienten im Alter zwischen 60 und 70 Jahren betrifft (Mitry et al. 2010). Die Pars-Plana-Vitrektomie (PPV) hat hierbei im Rahmen der Therapie der Netzhautablösung einen zunehmend höheren Stellenwert eingenommen (Ramulu et al. 2010). Als Glaskörperersatz werden dabei abhängig von Lokalisation und Ausmaß der Netzhautablösung neben Gasen auch verschiedene Silikonöle verwendet (McCuen et al. 1985; Romano et al. 2008; Mohamed & Lai 2010). Insbesondere die Verwendung von Silikonöl kann im Verlauf jedoch auch zu Komplikationen führen (Federman & Schubert 1988; Honavar et al. 1996; Stalmans et al. 2015). So kommt es im Verlauf nahezu zwangsläufig zur Bildung einer Katarakt (Federman & Schubert 1988; Duan et al. 2011). Bei Kontakt zwischen Silikonöl und dem Hornhautendothel kann es zu Endothelschäden und schließlich zu einer silikonölinduzierten Bandkeratopathie kommen (McCuen et al. 1985; Casswell & Gregor 1987; Federman & Schubert 1988; Abrams et al. 1995). Während der Tamponade oder erst nach deren Entfernung sind erneute Netzhautablösungen sowie eine Erhöhung oder Erniedrigung des intraokularen Drucks möglich (Federman & Schubert 1988; Barr et al. 1993; Hutton et al. 1994; Abrams et al. 1995; Jonas et al. 2001; Duan et al. 2011). Zudem kommt es nach einer gewissen Zeit häufig zur Emulsifikation des Silikonöls in kleine Silikonöltröpfchen, wenn das Silikonöl nicht rechtzeitig entfernt wurde, was beispielsweise zu einem Sekundärglaukom führen kann (Duan et al. 2011; Toklu et al. 2012; Miller et al. 2014). Ein weiterer potentieller Zwischenfall ist das Auftreten von „sticky silicone oil“ – Silikonöl, welches sich an Netzhaut oder intraokularen Linsen festsetzen und dabei zu Sehbeeinträchtigungen führen kann (Apple et al. 1996; H. H. Ghoraba et al. 2017).

Perfluorbutylpentan (F4H5), ein semifluoriertes Alkan (SFA) mit amphiphilen Moleküleigenschaften, gilt als vielversprechende Substanz für die Entfernung von „sticky silicone oil“ und emulsifiziertem Silikonöl (Liang et al. 2008; Stappler et al. 2010; Stalmans et al. 2015; Coppola et al. 2017). Bisher zeigte F4H5 zwar eine gute

Biokompatibilität, jedoch wurden die Auswirkungen auf corneale Endothelzellen bisher nicht untersucht, was jedoch für die Anwendung im vorderen Augenabschnitt von hoher Bedeutung ist (Mackiewicz, Mühling, et al. 2007).

1.1 Pars-Plana-Vitrektomie und Silikonöl

Die Pars-Plana-Vitrektomie (PPV) beschreibt die operative Entfernung des Glaskörpers über die Pars plana. Sie liegt zwischen dem Ziliarkörper und der Netzhaut und beinhaltet keine großen Gefäße oder funktionell wichtiges Gewebe. Daher stellt die Pars plana den idealen Zugangsweg für vitreoretinale Eingriffe dar (Kanski et al. 2012). Während zu Beginn zunächst durch Paul Cibis im Jahr 1962 Silikonöl noch schlichtweg in das nicht-vitrektomierte Auge injiziert wurde, etablierte Robert Machemer die Silikonölinjektion mit der vorangehenden Entfernung des Glaskörpers im Jahr 1972 (Cibis et al. 1962; Machemer et al. 1972). Über die Jahrzehnte wurde die PPV stetig weiterentwickelt, sodass diese inzwischen als Routineeingriff in einen zunehmend minimal-invasiveren Eingriff über immer kleinere Zugänge bei vielen vitreoretinalen Krankheitsbildern eingesetzt wird (Fujii et al. 2002; Eckhardt 2005; Vaziri et al. 2016).

Vereinfacht erfolgt die PPV in vier Schritten (Kanski et al. 2012):

1. Sklerotomie über die Pars plana und Einführung von drei Trokaren als Arbeitskanäle für Lichtquelle, Infusionskanülen und Operationsinstrumente;
2. Entfernung des Glaskörpers durch das Vitrektom;
3. Befüllen des Glaskörperraums mit Silikonöl oder Gasen;
4. Entfernung des Instrumentariums.

Seit dem Beginn der Entwicklung der PPV wird Silikonöl als Glaskörpertamponade genutzt (Cibis et al. 1962). Inzwischen gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Silikonöl-Präparaten, die sich unter anderem in ihrem spezifischen Gewicht unterscheiden: konventionelles Silikonöl ist mit einem spezifischen Gewicht von 0,97 g/cm³ leichter als Wasser (1,0 g/cm³) (Vaziri et al. 2016). Für Netzhautablösungen in der unteren Bulbushälfte können auch schwere Silikonöle (heavy silicone oils, HSO) zum Einsatz kommen, die beispielsweise durch Mischung (1,05 g/cm³) von Perfluorhexyloctan (F6H8) (1,35 g/cm³) mit Silikonöl (0,97 g/cm³) hergestellt werden (Cazabon et al. 2011; Vaziri et al. 2016).

Um das Risiko von Silikonöl-bedingten Komplikationen zu verringern, sollte das Öl in der Regel nach einigen Monaten entfernt werden. Wird das Silikonöl nicht rechtzeitig entfernt, kommt es früher oder später zur Emulsifikation des Silikonöls (Ichhpujani et al. 2009; Toklu et al. 2012). Im Mittel geschieht dies nach etwa 13,2 ± 4,8 Monaten (Toklu et al. 2012). Durch Migration emulsifizierter Silikonöltröpfchen in die Augenvorderkammer kann es in der Folge zur Verstopfung des Trabekelmaschenwerks und schließlich zu einer intraokularen Druckerhöhung kommen (Ni et al. 1983; Valone & McCarthy 1994; Ichhpujani et al. 2009; Toklu et al. 2012). Größere Mengen emulsifizierten Silikonöls können klinisch sowohl am hinteren Augenpol als auch in der Augenvorderkammer durch ein inverses Pseudohypoypyon (auch Hyperoleon) imponieren und unter Umständen die Sehkraft beeinträchtigen (Filloy et al. 2013; Gosse & Lochhead 2013; Tripathy & Sharma 2016).

Eine weitere Komplikation der Verwendung von Silikonöl ist das Auftreten von „sticky silicone oil“ (Dresp & Menz 2007), welches neben der Beseitigung von emulsifiziertem Silikonöl eine potentielle Indikation zur Verwendung der in dieser Arbeit verwendeten Substanz Perfluorbutylpentan (F4H5) darstellt.

1.2 Entstehung von „Sticky Silicone Oil“

„Sticky silicone oil“ bezeichnet das Auftreten von „klebrigem Silikonöl“, welches sich an verschiedenen Stellen im Auge festsetzen kann. In der Literatur taucht der Begriff „sticky silicone oil“ erstmals 2007 auf (Dresp & Menz 2007). Die Problematik ist jedoch in größerem Ausmaß schon vorher aufgetreten (beispielsweise 2001-2002 am University Medical Center Utrecht und Rotterdam Eye Hospital (Veckeneer et al. 2008)). Bereits seit den 1990er-Jahren wird wiederholt von stark adhärentem Silikonöl berichtet, welches sich an intraokularen Linsen festgesetzt hatte und sich nicht durch mechanische Verfahren entfernen ließ (Batterbury et al. 1994; Bartz-Schmidt et al. 1995; Kusaka et al. 1996; Apple et al. 1996; Arthur et al. 2001; McLoone et al. 2001; Yaman et al. 2007). Andere Autoren berichten von Fällen, in denen „sticky silicone oil“ äußerst stark an der Netzhaut haftete und ebenfalls durch mechanische Verfahren wie Absaugen oder Ziehen nicht zu entfernen war (Veckeneer et al. 2008; H. H. Ghoraba et al. 2017; Fukumoto et al. 2018).

Obwohl das Auftreten von „sticky silicone oil“ sicherlich keine sehr häufige Komplikation ist, kann es dennoch zu einer Sehbeeinträchtigung führen und erneute operative Eingriffe, wie zum Beispiel den Austausch von Intraokularlinsen (IOL), notwendig machen (Bartz-Schmidt et al. 1995; Kusaka et al. 1996; H. H. Ghoraba et al. 2017). Gleichzeitig lässt sich die Entstehung von „sticky silicone oil“ aber auch präventiv durch die richtige Handhabung der verschiedenen Substanzen während der PPV vermeiden bzw. das Risiko vermindern. „Sticky silicone oil” entsteht nach Kontakt von Silikonöl mit flüssigen Perfluorcarbonen (perfluorocarbon liquids, PFCLs) (Dresp & Menz 2007; Veckeneer et al. 2008; H. H. Ghoraba et al. 2017; Fukumoto et al. 2018). Zu den häufig verwendeten PFCLs gehören Perfluordecalin (PFD, $C_{10}F_{18}$) und Perfluoroctan (PFO, C_8F_{18}). PFCLs werden intraoperativ im Rahmen der PPV verwendet, um eine abgelöste Netzhaut wieder anzulegen, und werden anschließend durch Silikonöl oder Gase ersetzt (Mathis et al. 1992; Brazitikos et al. 2003).

Dresp & Menz (2007) analysierten den PFCL-Gehalt von 21 Proben entnommener Silikonöltamponaden. Bei sieben der 21 Proben wurde bei Entnahme eine klebrige Konsistenz festgestellt (Dresp & Menz 2007). Die mittlere Konzentration von PFD war schließlich 2,4-fach höher als in den Proben, die nicht eine derartige Konsistenz hatten (Dresp & Menz 2007). Ebenfalls zeigten in vitro Untersuchungen ein hypervisköses „klebriges Verhalten“ von schwerem Silikonöl (heavy silicone oil, HSO) nach Kontakt mit PFCL-Resten (Dresp & Menz 2007; Romano et al. 2012; Fukumoto et al. 2018). Veckeneer et al. (2008) berichten sogar von einer Epidemie in der Augenklinik Rotterdam, als sie in 28 von 234 Fällen (ca. 12 %) nach Silikonölentfernung einen an der Retina „klebenden“ Silikonölrest („sticky silicone oil”) feststellen mussten. Außer visuellen Beeinträchtigungen bei vier Patienten stellte das Silikonöl an sich jedoch keine klinische Beeinträchtigung für die Patienten dar (Veckeneer et al. 2008). In zwei Fällen haftete das „sticky silicone oil“ allerdings derart fest an der Netzhaut, dass es bei dem Versuch einer mechanischen Entfernung zu choroidalen Einblutungen und Netzhauteinrissen kam (Veckeneer et al. 2008). Das Auftreten von „sticky silicone oil“ wurde ebenfalls mit der Verwendung von PFCLs (hier PFO) korreliert (Veckeneer et al. 2008). Bei allen Patienten wurde 1000 cSt-Silikonöl verwendet, welches direkt das vorher zur Entfaltung der Netzhaut eingebrachte PFCL ersetzte.

Eine weiteren Studie quantifiziert das Auftreten von „sticky silicone oil“ an der Netzhaut im Bereich des hinteren Augenpols nach Silikonölentfernung mit ca. 1 % (8/796 Patienten) (H. H. Ghoraba et al. 2017). Auch hier zeigte sich eine klare Korrelation zwischen dem Auftreten von „sticky silicone oil“ und der Benutzung von PFO und Silikonöl (5000 cSt oder 5500 cSt) nach direktem PFCL-Luft-Austausch mit dem, nicht jedoch bei Verwendung von PFD (Ghoraba et al. 2017). Ein Zusammenhang zwischen der Viskosität des verwendeten Silikonöls und dem Auftreten von „sticky silicone oil“ zeigte sich bisher nicht (Öner et al. 2003; H. H. Ghoraba et al. 2017).

Daraus folgt, dass zur Prävention der Entstehung von „sticky silicone oil“ eine möglichst restlose Entfernung der PFCLs vor der Injektion von Silikonöl erfolgen sollte, um das Risiko eines Kontaktes beider Substanzen zu minimieren. PFCLs werden entweder direkt durch Silikonöl ausgetauscht oder indirekt durch einen PFCL-Luft-Austausch und anschließend durchgeführten Luft-Silikonöl-Austausch (Dresp & Menz 2007). Veckeneer et al. (2008) empfehlen vor Injektion der Silikonöltamponade PFCLs durch Luft auszutauschen. Da PFCLs jedoch transparent sind und nahezu zwangsläufig eine dünne, makroskopisch nicht erkennbare Schicht an PFCLs im Auge verbleibt, ist eine komplette Entfernung von PFCLs meist unmöglich (Winter et al. 1999). Somit bleibt immer ein gewisses Restrisiko für die Entstehung von „sticky silicone oil“ bestehen. Gefärbte PFCL-Lösungen (PFCLs gemischt mit einem SFA als Färbemittelträger) könnten gegebenenfalls in Zukunft die (nahezu) vollständige Entfernung erleichtern (Rizzo et al. 2012; Rodrigues et al. 2014).

Ein anderer präventiver Ansatzpunkt ist die Wahl der richtigen IOL für Patienten mit erhöhtem Risiko im weiteren Verlauf einen vitreoretinalen Eingriff mit Einbringung einer Silikonöltamponade zu benötigen. Silikonlinsen, da lipophil, haben das höchste Interaktionspotential mit Silikonöl, jedoch bleibt Silikonöl auch an anderen Linsen-Typen bis zu einem gewissen Ausmaß haften (Apple et al. 1997; McLoone et al. 2001; Yaman et al. 2007; Stappler et al. 2010). Für vitreoretinale Risikopatienten wird die Verwendung einer hydrophilen Acryl-Linse empfohlen, da hier das geringste Interaktionspotential mit Silikonöl besteht (McLoone et al. 2001; Öner et al. 2003).

1.3 Perfluorbutylpentan (F4H5)

Perfluorbutylpentan (F4H5, C_4F_9—C_5H_{11}) ist eine Substanz aus der Stoffgruppe der semifluorierten Alkane (SFAs) und besteht im Sinne eines Diblock-Moleküls aus einer lipophoben fluorierten Kohlenstoffkette und einer lipophilen Kohlenwasserstoffkette (siehe Abbildung 1). Semifluorierte Alkane können generell in der Summenformel $F(CF_2)_m(CH_2)_nH$ abgebildet werden, jedoch orientiert sich die Nomenklatur der SFAs an der Anzahl der Fluorkohlenstoff- und Kohlenwasserstoffgruppen (R(F)R(H), zum Beispiel F4H5, F6H8) (Meinert & Roy 2000).

SFAs gelten als „physikalisch, chemisch und physiologisch inert, farblos“ und haben je nach Molekülgröße ein spezifisches Gewicht zwischen 1,1 und 1,7 g/cm³ (Meinert & Roy 2000). Das in dieser Arbeit untersuchte SFA Perfluorbutylpentan (F4H5) besitzt bei 25°C ein spezifisches Gewicht von 1,28 g/cm³ und ist damit schwerer als Wasser (1,0 g/cm³)(Liang et al. 2008).

Die physikochemischen Eigenschaften der SFAs sind unter anderem von der Länge und dem Verhältnis der Molekülketten abhängig. Durch Variation der jeweiligen Länge der F- bzw. H-Kette kann das physikochemische Verhalten beeinflusst und die Interaktion und Löslichkeit in verschiedenen Substanzen verändert werden (Meinert & Roy 2000). Je länger die Kohlenwasserstoffkette (H-Kette), desto lipophiler und löslicher ist das Molekül in Silikonöl, je länger die fluorierte Kohlenstoffkette (F-Kette), desto lipophober ist das Molekül; beispielsweise ist F6H8 löslicher in Silikonöl (lipophil) als F6H6 (Meinert & Roy 2000). Gleichzeitig ist die Löslichkeit von SFAs in niedrig-viskösen Silikonölen höher als in hoch-viskösen (beispielsweise bessere Löslichkeit in 1000cSt-Öl als in 5000cSt-Öl); SFAs mit einer langen fluorierten Kohlenstoffkette lösen sich prinzipiell schlechter in Silikonöl – da lipophober – als Moleküle mit im Verhältnis längerer Kohlenwasserstoffkette (Meinert & Roy 2000).

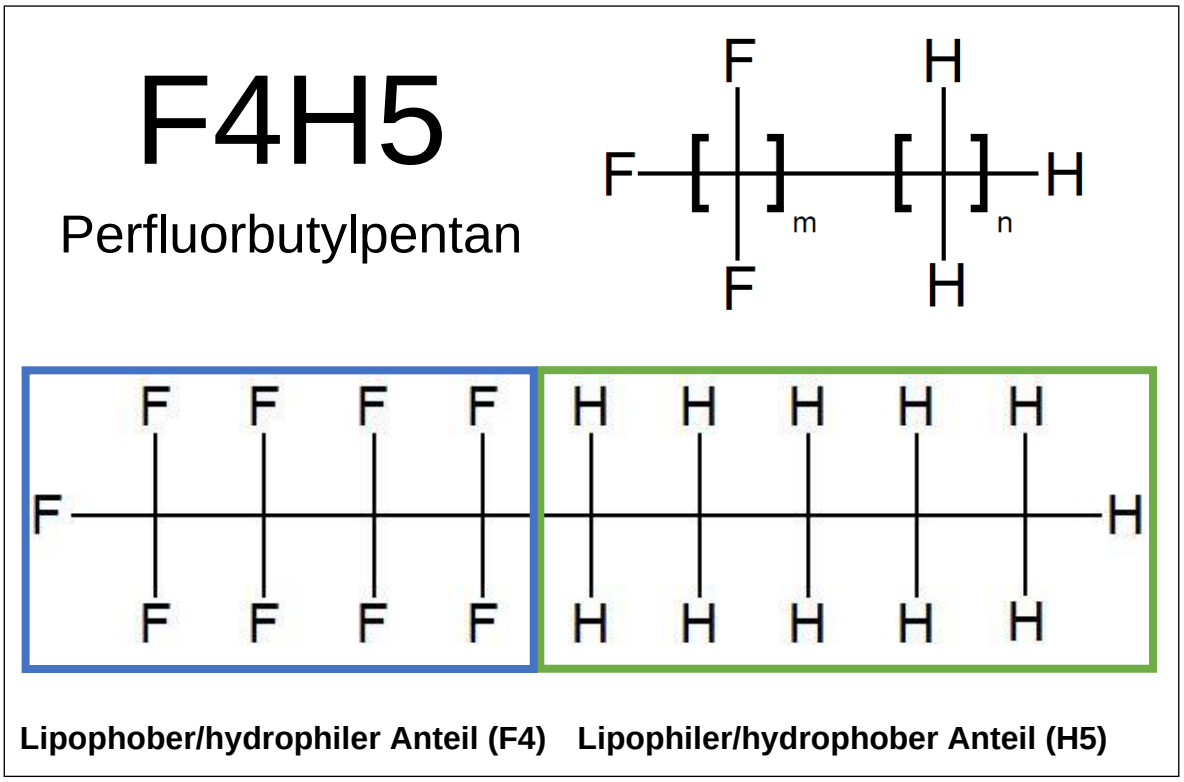

Abbildung 1 – Perfluorbutylpentan (F4H5): Generelle Strukturformel semifluorierter Alkane (oben; $F(CF_2)_m(CH_2)_nH$) und Strukturformel von Perfluorbutylpentan (F4H5) (unten). Semifluorierte Alkane bestehen aus einer lipophoben fluorierten Kohlenstoffkette und einer lipophilen Kohlenwasserstoffkette.

Die Eigenschaften der SFAs lassen sich neben den lipophilen/-phoben Eigenschaften der Molekülketten auch durch die Größe der Moleküle erklären. Je kleiner das SFA-Molekül desto einfacher ist die Interaktion mit den Seitenketten der Silikonöl-Polymere (v.a. hochvisköse Silikonöle) (Liang et al. 2008). Das führt beispielsweise dazu, dass F4H5 in jedem Verhältnis vollständig in 1000 cSt-Silikonöl gelöst werden kann, während F6H8 sich nur zu einem Anteil von maximal 73 % in 1000 cSt-Silikonöl auflösen lässt (Meinert & Roy 2000).

Die starke Interaktion mit anderen Oberflächen wie IOLs und der Netzhaut führt dazu, dass „sticky silicone oil“ mit mechanisch-operativen Methoden meist nicht effektiv entfernt werden kann (Bartz-Schmidt et al. 1995; Kusaka et al. 1996; Veckeneer et al. 2008). Durch die amphiphilen Eigenschaften semifluorierter Alkane wird die Entfernung von Silikonöl und Silikonölresten erheblich erleichtert (Langefeld et al. 1999; Stappler et al. 2008; Coppola et al. 2017).

1.3.1 Perfluorbutylpentan zur Entfernung von „Sticky Silicone Oil“

Zeitweise wurde Perfluorhexyloctan (F6H8) zur Auflösung von Sililkonölresten verwendet, jedoch erwies sich dessen Anwendung im Verlauf häufig als diffizil und ineffektiv, sodass dennoch eine mechanische Entfernung des Öls von den IOLs bzw. der Austausch der Linse selbst notwendig war (Langefeld et al. 1999; Dick & Augustin 2000; Liang et al. 2008).

In einem direkten Vergleich zeigte F4H5 gegenüber F6H8 eine deutliche Überlegenheit Silikonölreste von Silikonlinsen zu lösen (Liang et al. 2008). Sowohl in vitro als auch bei der Anwendung an 11 Patienten erwies sich F4H5 gegenüber F6H8 als effektiver und bewirkte eine effizientere Entfernung von „sticky silicone oil“ von Silikon-IOLs, sodass ein IOL-Austausch nicht mehr notwendig war (Liang et al. 2008). Während 3-5 ml F6H8 die Silikonölreste nur unzureichend entfernen konnten, waren lediglich 0,5 ml F4H5 nötig, um das Silikonöl nahezu restlos von der Linse zu entfernen. Ebenso leicht ließen sich bei zwei Patienten epiretinale Silikonöltröpfchen entfernen (Liang et al. 2008).

Stappler et al. (2010) testeten zudem die Effektivität von F4H5 „sticky silicone oil“ von verschiedenen IOL-Typen (Silikon-Linse, hydrophobe Acryl-Linse, PMMA-Linse) zu entfernen. Die Entfernung von „sticky silicone oil“ gelang dabei bei hydrophilen Linsen (PMMA-IOL) effektiver als bei hydrophoberen Linsen (Acryl-IOL, Silikon-IOL): durch einfache Immersion (bzw. mit zusätzlichen leichten Bewegungen) der Linse in F4H5 konnten von der PMMA-Linse 95,6% (respektive 100 %), von der Acryl-Linse 96,1 % (respektive 98,8 %) und von der Silikonlinse 91,8 % (respektive 93,7 %) entfernt werden (Stappler et al. 2010).

1.3.2 Perfluorbutylpentan zur Entfernung von emulsifiziertem Silikonöl

Perfluorbutylpentan (F4H5) zeigte auch bei der Entfernung von emulsifiziertem Silikonöl vielversprechende Ergebnisse: nach Spülung mit F4H5 zur Entfernung von Silikonöl (Siluron2000, Siluron5000 (Fluoron GmbH, Ulm)) konnte eine grenzwertig signifikant ($p = 0,061$) reduzierte Anzahl an intraokular verbliebenen emulsifizierten Silikonöltröpfchen beobachtet werden (Stalmans et al. 2015).

Coppola et al. (2017) behandelten acht Patienten mit F4H5 zur Entfernung von emulsifiziertem Silikonöl. Die vorgestellte chirurgische Prozedur mit zweimaliger F4H5-Spülung der Augenvorderkammer erzielte eine komplette Entfernung makroskopisch sichtbarer Silikonöltröpfchen (Coppola et al. 2017). Dies war zudem mit einer verkürzten Operationszeit gegenüber anderen Spülmethoden (beispielsweise mit F6H8 oder einer konventionellen BSS-Spülung) verbunden (Coppola et al. 2017).

Eine weitere Studie verglich die Fähigkeit von drei verschieden Spüllösungen (PBS vs. F4H5 (100%) vs. F4H5 mit 1 % Surfactant (perfluoriertes PFPE-PEG-PFPE)) emulsifizierte Silikonöltröpfchen aus einer künstlichen Augenkammer zu entfernen. Interessanterweise zeigte hier F4H5 allein keinerlei Vorteile gegenüber der PBS-Kontrollspülung, sondern hinterließ sogar eine signifikant höhere Anzahl an Silikonöltröpfchen in der Augenkammer (Chan et al. 2018). Die Spüllösung aus F4H5 mit 1 % Surfactant (PFPE-PEG-PFPE) hingegen erzielte gegenüber der PBS-Lösung eine signifikante Reduktion der in der Augenkammer verbliebenen Silikonöltröpfchen (Chan et al. 2018).

Durch die chemischen Eigenschaften scheint F4H5 eine hohe Effizienz und Effektivität in der Entfernung intraokularen Silikonresten zu versprechen. Letztlich muss die genaue Applikationsform gegebenenfalls durch weitere (klinische) Studien evaluiert werden.

1.3.3 Weitere Anwendungen von Perfluorbutylpentan

Die Fähigkeit von F4H5 lipophile Stoffe zu lösen versucht man auch für andere Anwendungen zu nutzen. Beispielsweise kann F4H5 aufgrund seines spezifischen Gewichts von 1,118 g/cm³ in Verbindung mit einem Silikonöl zur Behandlung von inferioren Netzhautablösungen verwendet werden (Rizzo et al. 2011). Weitere Studien untersuchten die Anwendung von F4H5 als Trägersubstanz zur inhalativen Applikation von Ibuprofen oder zur topischen okulären Applikation von Ciclosporin A bei trockenem Auge (Tsagogiorgas et al. 2012; Dutescu et al. 2014; Gehlsen et al. 2017).

1.3.4 Toxizität von semifluorierten Alkanen und Perfluorbutylpentan

F4H5 überzeugte bisher durch eine gute Biokompatibilität (Mackiewicz, Mühling, et al. 2007; Chan et al. 2018). Während für andere SFAs (F4H6, F4H8) eine starke intraokulare Inflammationsreaktion mit massiver Leukozyten-Infiltration in den Glaskörper und eine ausgeprägte retinale Degeneration nachgewiesen wurde, zeigte sich nach Verwendung von F4H5 und F6H8 bisher keine bzw. eine leichte Inflammation (vereinzelt präretinale Makrophagen bei F6H8) und eine gute retinale Verträglichkeit (Vote et al. 2003; Mackiewicz, Mühling, et al. 2007; Liansg et al. 2008).

Eine Proliferations-Hemmung von in vitro-Karzinomzellen als Indikator einer ausgeprägten Toxizität von SFAs (F4H5 bisher nicht getestet) wurde zwar ausgeschlossen (Meinert & Roy 2000), allerdings wiesen einige Studien eine starke Toxizität gegenüber in vitro-Zellkulturen nach, nachdem eine signifikante Reduktion von HCEC- (humanen cornealen Endothelzellen), rMC-1- (retinale Müller-Zelllinie) und ARPE-19-Zellkulturen (retinale Pigmentepithelzellen) nach Inkubation in F6H8 festgestellt wurde (Mertens et al. 2002; Chan et al. 2018). Für F4H5 liegen bisher keinerlei Anzeichen einer derartigen Toxizität vor (Chan et al. 2018). Auch bei der Anwendung eines Silikonöls mit einem F4H5-Anteil (HWS-45 3000, Fluoron GmbH, Ulm) zur Behandlung inferiorer Netzhautablösungen ergaben sich weder Hinweise auf eine proinflammatorische Wirkung noch auf eine zelluläre Toxizität (Rizzo et al. 2011).

Dementsprechend ergeben sich für F4H5 im Gegensatz zu anderen SFAs weder in vitro noch in vivo Hinweise auf negative Effekte, jedoch sind Tests bezogen auf das Hornhautendothel bisher ausstehend. Aufgrund eines potenziellen Kontaktes von F4H5 mit dem Hornhautendothel, insbesondere bei direkter Verwendung in der Augenvorderkammer, ist eine Toxizitätsanalyse notwendig, um eine sichere Anwendung im vorderen Augenabschnitt zu evaluieren. Da diesbezüglich keine Studien existieren, untersucht diese Arbeit die Auswirkungen von F4H5 auf das corneale Endothel.

1.4 Das corneale Endothel

Die Hornhaut des menschlichen Auges ist insgesamt ca. 540 µm dick und setzt sich aus fünf Schichten zusammen (Edelhauser 2006; Delmonte & Kim 2010):

- Epithel: mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel (ca. 40-50 µm)
- Bowman-Membran: azelluläre Kollagenfasern (ca. 15 µm)
- Stroma: parallele Kollagenfasern, Keratozyten, Proteoglykane (ca. 450-460 µm)
- Descemet-Membran: azelluläre kollagene Schicht (ca. 10 µm)
- Hornhautendothel: einlagige Zellschicht aus hexagonalen Zellen (ca. 4-5 µm)

Dua et al. konnten 2013 eine weitere azelluläre Schicht, die Dua-Schicht (Dicke: 10,15 µm ± 3,6 µm), zwischen Descemet-Membran und Hornhautstroma identifizieren, die sich als sehr belastbar darstellte und von einigen Leuten als sechste Hornhautschicht angesehen wird.

Da der Fokus dieser Arbeit auf den Auswirkungen von F4H5 auf das Hornhautendothel liegt, wird im Weiteren nur darauf eingegangen.

Entscheidend für die Funktion des Hornhautendothels ist ein funktionierender Zellverband. Als indirekter Hinweis für die Funktionalität des Hornhautendothels wird meist die Endothelzelldichte (ECD) bestimmt (Schroeter 2009). Das Alter stellt hier den größten Einflussfaktor auf die ECD dar (Filev et al. 2018). Die ECD nimmt vor allem in den ersten 10-20 Lebensjahren rapide ab und folgt dann, im Sinne einer negativen Korrelation zwischen Alter und ECD, einen gemäßigteren linearen Abfall (Waring et al. 1982; Williams et al. 1992; Moller-Pederson 1997; Krohn & Høvding 2005). Während bei Neugeborenen eine Zelldichte von bis zu 5700 Zellen/mm² beobachtet wurde, nimmt die Zelldichte im Laufe der Kindheit rapide auf bereits ca. 3500 Zellen/mm² im fünften Lebensjahr ab (Williams et al. 1992). Die rasante Abnahme in den ersten Lebensjahren wird vor allem dem schnellen Wachstum der Hornhaut in den ersten Lebensmonaten und –Jahren zugeschrieben (Murphy et al. 1984; Müller & Doughty 2002). Erwachsene weisen meist eine ECD von ca. 2500-3000 Zellen/mm² auf (Krohn & Høvding 2005; Filev et al. 2018). Die jährliche Abnahme der ECD im Erwachsenenalter wird in der Literatur zwischen -0,3 %/Jahr (Moller-Pederson 1997; Hollingsworth et al. 2001; Filev et al. 2018) und -0,6 %/Jahr (Murphy et al. 1984; Bourne & Nelson 1997) angegeben. Des Weiteren ist im

Vergleich zu zentralen Hornhautarealen in peripheren Abschnitten generell eine höhere ECD vorzufinden (Schimmelpfennig 1984; Amann et al. 2003).

Morphologisch weist das Endothel typischerweise apikal ein charakteristisches hexagonales und bienenwabenartiges Muster auf, während die Endothelzellen basal über komplexe interdigitierende Zellfortsätze und tight junctions miteinander verknüpft sind (He et al. 2016). Bei Geburt ist die Endothelzellschicht noch ca. 10 µm dick, und flacht bis zum Erwachsenenalter auf ca. 4 µm ab (Delmonte & Kim 2010). Eine Abnahme der ECD durch Alter oder Zelluntergang anderer Ursache wird von einem vermehrten Polymegathismus (gleichzeitiges Vorliegen von (v.a. vergrößerten) Endothelzellen unterschiedlicher Größe) und Polymorphismus (Endothelzellen mit unterschiedlicher Form) begleitet und schließlich durch Abweichung von der typischen hexagonalen Zellform kompensiert (Laing et al. 1976; Yee et al. 1985; Bourne & Nelson 1997; Schroeter 2009; Kunzmann et al. 2018). Bei punktuellem Untergang einzelner Endothelzellen schließen benachbarte Zellen die entstandene Lücke durch Abflachung und teils rosettenförmiges Zusammentreffen (Sperling 1978; Kunzmann et al. 2018). Die Kompensation von (altersbezogenem) Zelluntergang durch Polymorphismus und Polymegathismus ist durch einen Zellzyklusarrest der menschlichen cornealen Endothelzellen des Menschen in der G-1-Phase bedingt, sodass im Gegensatz zu anderen Spezies nur sehr begrenzt regenerative Prozesse stattfinden (Horn et al. 1977; Joyce et al. 1999; Joyce 2003).

Für die Transparenz, welche neben der Refraktion eine essentielle Eigenschaft und Funktion der Hornhaut darstellt, ist das Hornhautendothel unverzichtbar (Fischbarg & Maurice 2004). Tight junctions, aktive Transportproteine (u.a. Na^+-K^+-ATPase) in der endothelialen Zellmembran sowie weitere Faktoren sorgen in einem komplexen Zusammenspiel durch die Aufrechterhaltung der Dehydratation des cornealen Stromas für ein transparentes optisches Medium (Geroski & Edelhauser 1984; Fischbarg & Maurice 2004; Edelhauser 2006; Mergler & Pleyer 2007).

Bei endothelialen Pathologien, wie zum Beispiel der Fuchs‘ Dystrophie oder einer ECD unterhalb von ca. 500 Zellen/mm², kann es zur Dekompensation der endothelialen Pumpleistung und als Folge zur Anschwellung und Eintrübung der Hornhaut kommen (Edelhauser 2006; Mergler & Pleyer 2007; Delmonte & Kim 2010). Die Untergrenze der benötigten ECD potentieller Spenderhornhäute wird

daher meist bei 2000 Zellen/mm² festgelegt, wodurch im Regelfall eine ausreichende Funktionsfähigkeit transplantierter Spenderhornhäute für eine Dauer von bis zu 20 Jahren sichergestellt wird (Armitage et al. 2003).

1.5 „Split Corneal Buttons" – ein porcines Hornhautmodell

Da intakte menschliche Spenderhornhäute in der Regel für Hornhauttransplantationen benötigt werden und ein weltweiter Mangel an Transplantaten vorliegt, müssen für experimentelle Untersuchungen meist Ersatzmodelle herangezogen werden (Gain et al. 2016). Die Untersuchung der Auswirkungen von Perfluorbutylpentan (F4H5) in dieser Arbeit erfolgte deshalb an einem organo-typisch kultiviertem porcinen Hornhautmodell, das mit einem der Kultivierung vorangehenden Lamellieren der Schweinehornhäute verbunden ist (Kunzmann et al. 2018).

Die Eigenschaften von Schweinehornhäuten sind in weiten Teilen mit denen von menschlichen Hornhäuten vergleichbar (Elsheikh et al. 2008; Sanchez et al. 2011; Kim & Hara 2015). Zu beachten ist jedoch, dass die zentrale Hornhautdicke von Schweinehäuten in der Literatur je nach Studie mit einer (mittels Ultraschall-Pachymetrie) bestimmten mittleren zentralen Hornhautdicke von 666-1009 µm im Vergleich zur menschlichen Hornhaut (ca. 0,540 µm) als dicker beschrieben wird (Doughty & Zaman 2000; Faber et al. 2008; Jay et al. 2008; Sanchez et al. 2011; Lee et al. 2014; Menduni et al. 2018), wobei die hohe Streuungsbreite der Werte sicherlich auch auf inkonsistentes Untersuchungsmaterial z.B. im Sinne unterschiedlicher Schweinerassen/-alter und variierender Messmethoden zurückzuführen ist. Ein weiterer Unterschied ist die bei Schweinehornhäuten wahrscheinlich fehlende Bowman-Membran (Merindano et al. 2002).

Kunzmann et al. (2018) konnten eine Präparationsmethode etablieren, bei der der Endothelzellverlust von porcinen „split corneal buttons" (Hornhautstanzen, bei denen ein Teil des Stromas entfernt wurde, siehe Methodik) über die Zeit (-11,1 % Verlust in zwei Wochen) in etwa dem entspricht, der auch bei humanen Spenderhornhäuten während der Lagerung in der Hornhautbank (-9,2 %) beobachtet wird (Borderie et al. 1995).

Als Nachweis der Überlegenheit von „split corneal buttons“ wurde der Abfall der ECD von Schweinehornhäuten über 15 Tage in einem Vergleich von drei verschiedenen Präparationsmethoden beobachtet und miteinander verglichen (Kunzmann et al. 2018):

- corneosclerale Hornhaut-Exzidate (corneoscleral buttons),
- corneale Stanzen ohne Sklerarand (ø 7,5 mm, „(non-split-) corneal buttons“)
- lamellierte corneale Stanzen (ø 7,5 mm, „split corneal buttons“).

Bei den lamellierten cornealen Stanzen („split corneal buttons“) wurden Hornhautepithel und ein Teil des Stromas entfernt (siehe Abbildung 2).

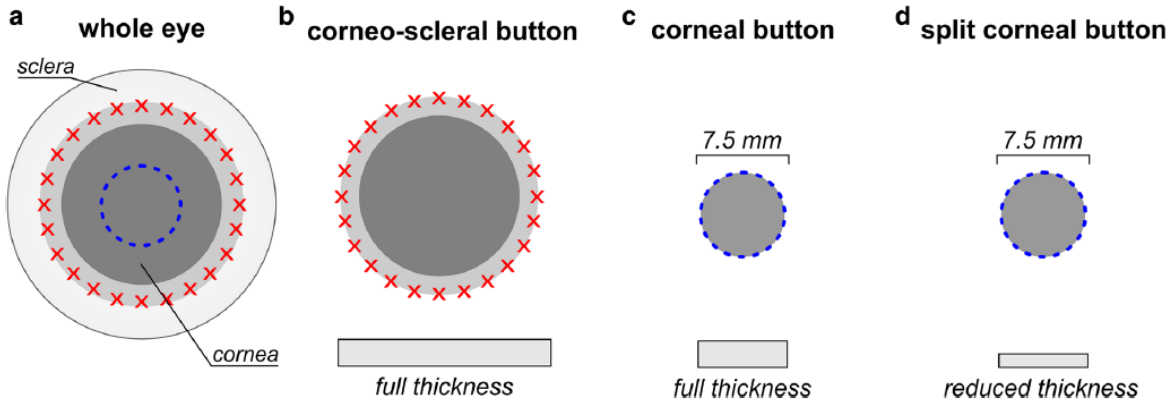

Fig. 1 Preparation methods. Illustrated are the two different cutting lines on a whole eye (**a**). The red crosses show the cutting line of corneoscleral buttons and the blue dashes the one of the corneal buttons and split corneal buttons. The three different preparation methods of corneoscleral buttons (**b**), corneal buttons (**c**) and split corneal buttons (**d**) are shown schematically. At the bottom of each scheme the thickness of the button is displayed

Abbildung 2 – Präparationsmethoden der Hornhautpräparate. Ganzes Auge (a, whole eye), corneosclerale Exzidate (b, corneo-scleral buttons), corneale Stanzen (c, non-split corneal buttons), lamellierte corneale Stanzen (d, split corneal buttons).

Mit freundlicher Genehmigung von Kunzmann et al. (2018)

Durch die verschiedenen Präparationsmethoden konnte der Endothelzellverlust, welcher insbesondere durch Aufquellen des Hornhautstromas in der Zellkultur und den hierdurch hervorgerufenen Zug- und Scherkräften entsteht, quantifiziert werden. Während corneosclerale Exzidate innerhalb von zwei Wochen den größten Endothelzellverlust verzeichneten, erlitten die lamellierten cornealen Stanzen noch weniger Endothelzellverluste als nicht-lamellierte corneale Stanzen (-11,1 % („split corneal buttons“) vs. 15,9 % („(non-split-)corneal buttons“)) (siehe Abbildung 3).

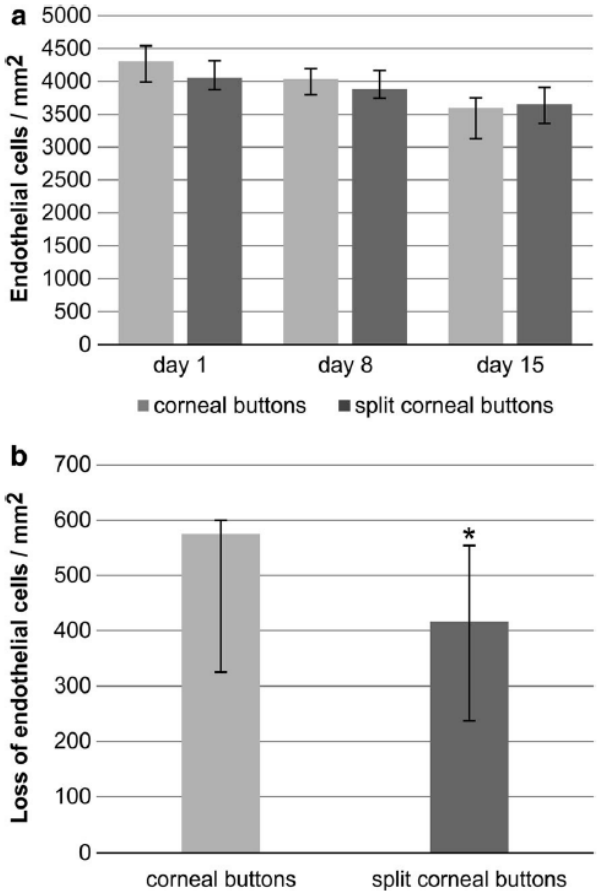

Fig. 4 Corneal endothelial cell count and cell loss. Bar graphs represent the absolute number of endothelial cells per mm^2 of corneal buttons and split corneal buttons on day 1, 8 and 15 (**a**) and loss of endothelial cells after 15 days of cultivation (**b**). Data are depicted as median ± 25%/75%-quantils, with * $p < 0.05$ (exact p value = 0.04136); n = 10–12

Abbildung 3 – Entwicklung der ECD. (a) ECD an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 von „corneal buttons“ (hellgrau) und „split corneal buttons“ (dunkelgrau). (b) Absoluter Endothelzellverlust nach 15 Tagen Inkubation. Der Zellverlust in „split corneal buttons“ fällt signifikant geringer aus als in „corneal buttons“.

Mit freundlicher Genehmigung von Kunzmann et al. (2018)

In gleichem Maße verhielten sich in den Gruppen die morphologischen Veränderungen mit einer Zunahme an Kompensationserscheinungen. So zeigten „split corneal buttons“ deutlich weniger Pleomorphismen der Endothelzellen (Polymegathismus (Variabilität der Zellgröße) und Polymorphismus (Variabilität der Zellform, Abnahme des Anteils hexagonaler Zellen)), Rosetten-Formationen und Reformations-Figuren (Auftreffen von 4 oder mehr Zellen an einem Punkt anstelle von 3 Zellen (Aufeinandertreffen von drei Zellen ≙ hexagonales Zellbild)) und Alizarin-rote Areale als „non-split corneal buttons“ (Kunzmann et al. 2018, siehe Abbildung 4).

Zusammenfassend sprechen alle Beobachtungen für stabilere Kultivierungsbedingungen mit einem verringerten Zelluntergang in „split corneal buttons“, wodurch eine bessere Beurteilung der zu testenden Einflüsse (wie zum

Beispiel die Testung von F4H5) als durch die Verwendung von „corneal buttons“ oder ganzen Schweinehornhäuten ermöglicht wird.

Die corneoscleralen Präparate waren nach 15 Tagen derart aufquollen, dass eine repräsentative Auszählung der Endothelzellen aufgrund starker Schäden nicht mehr möglich war (siehe Abbildung 5).

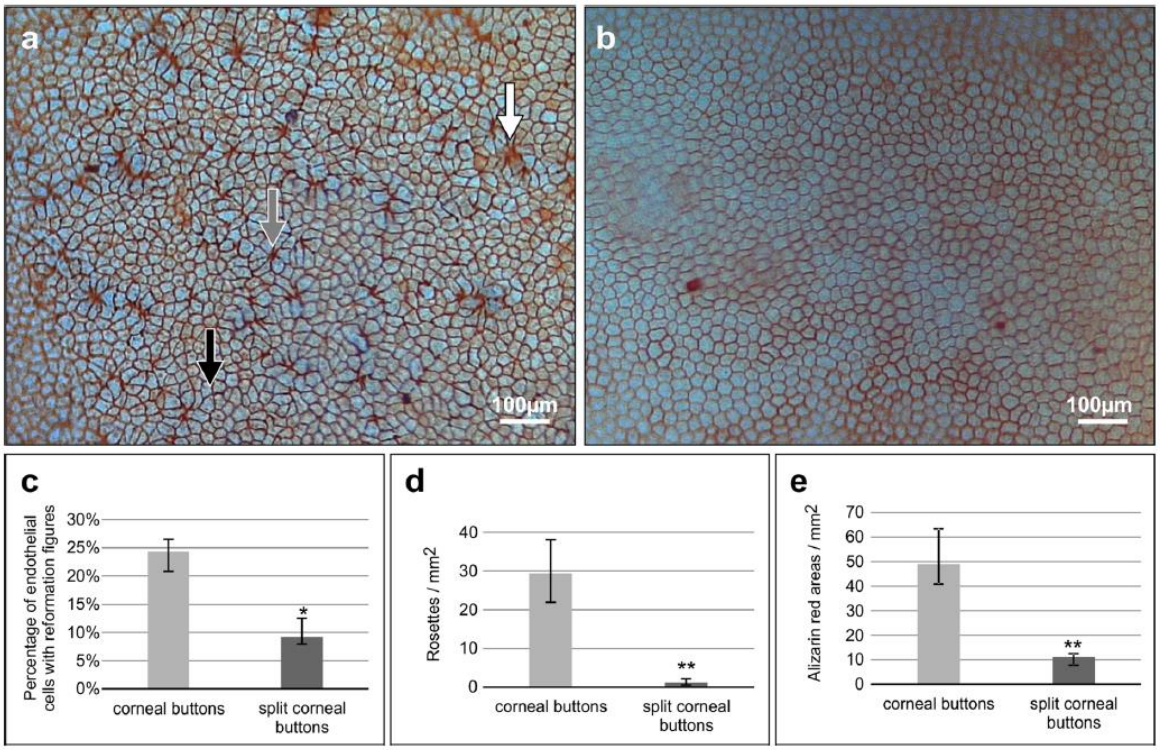

Fig. 3 Corneal endothelial cell morphology quantified. Photographs of the corneal endothelium show the morphology of trypan blue and alizarin red S stained corneal buttons (**a**) and split corneal buttons (**b**) on day 15. In picture a, arrows indicate reformation figures (black) ($p = 0.0041$), alizarin red-stained areas (white) ($p = 0.00012$) and rosette figures (grey) ($p = 0.0002$). Data are depicted as median ± 25%/75%-quantils, with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$; n = 10–12

Abbildung 4 – Morphologische Veränderungen der Endothelzellen. Durch das Präparieren von „split corneal buttons“ kommt es zu vermindertem Zellschaden (a, Endothel von „corneal buttons“; b, Endothel von „split corneal buttons“), was sich in einem geringeren Anteil an Reformationsfiguren (c), weniger Rosettenformationen (d) sowie weniger zerstörten Zellen (e, „alizarin red areas“) zeigt.

Mit freundlicher Genehmigung von Kunzmann et al. (2018)

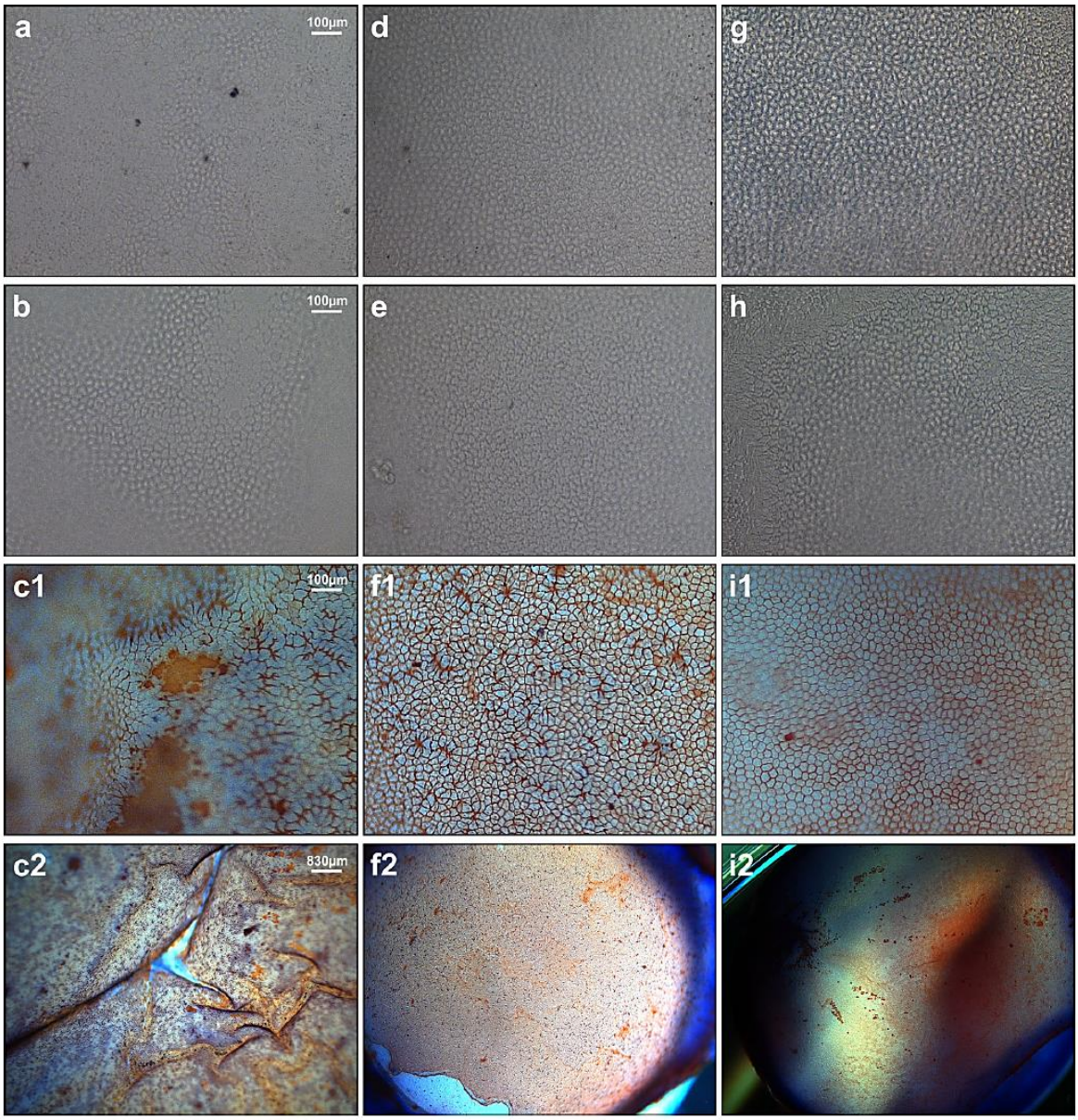

Fig. 2 Corneal endothelial cell morphology. Photographs of the corneal endothelium show the morphology of corneoscleral buttons (**a–c1**), corneal buttons (**d–f1**) and split corneal buttons (**g–i1**) on day 1 (**a**, **d**, **g**), day 8 (**b**, **e**, **h**) and day 15 (**c1**, **f1**, **i1**). On days 1 and 8 photographs without additional staining are shown, but on day 15 staining with trypan blue and alizarin red S was performed before photographs were taken. **c2**, **f2** and **i2** show an overview of the samples on day 15

Abbildung 5 – Einfluss der Präparationsmethode auf die Endothelzellen über einen Zeitraum von 15 Tagen. Corneosclerale Exzidate (a-c2), corneale Stanzen (d-f2), lamellierte corneale Stanzen (g-i2). Aufnahmen an Tag 1 (erste Reihe), Tag 8 (zweite Reihe), Tag 15 (dritte Reihe) und Übersichtsaufnahmen an Tag 15 (vierte Reihe).

Mit freundlicher Genehmigung von Kunzmann et al. (2018)

1.6 Ziel der Dissertation

Das Auftreten von „sticky silicone oil“ ist ein potenziell Visus-beeinträchtigender Zwischenfall einer Silikonöltamponade und stellt unter Umständen eine erneute Operationsindikation dar. Die mechanische Entfernung von „sticky silicone oil“ ist schwierig und kann mit weiteren Komplikationen verbunden sein. Zudem kann es nach einer gewissen Zeit, sofern die Silikonöltamponade nicht rechtzeitig entfernt wurde, zur Emulsifikation des Silikonöls kommen, was unter Umständen ein Sekundärglaukom verursachen kann.

Eine Alternative zu mechanischen Entfernung oder anderen bisher als ineffektiv getesteten Verfahren stellt hier die amphiphile Substanz F4H5 dar, welches „sticky silicone oil“ und emulsifiziertes Silikonöl sehr effektiv aus dem Auge entfernen kann. Durch eine einfache intraokulare Injektion kann das Silikonöl aufgrund der physikochemischen Eigenschaften dieser Substanz aufgelöst werden. Bisher wurde dem Medikament jedoch keine offizielle Zulassung zur Anwendung im vorderen Augenabschnitt erteilt, sodass der Einsatz von F4H5 hier nur als off-label-use stattfinden kann.

Diese Dissertation sollte am porcinen Hornhautmodell unter Verwendung von „split corneal buttons“ die Effekte von F4H5 auf corneale Endothelzellen untersuchen und quantifizieren. Anhand der ECD und der Veränderung von morphologischen Parametern, wie etwa dem vermehrten Auftreten von Reformationsfiguren, Rosettenformationen oder zerstörten Endothelzellen, sollte untersucht werden, ob F4H5 einen signifikanten Einfluss ($p \leq 0,05$) auf die ECD hat, um so Rückschlüsse auf die Biokompatibilität von F4H5 ziehen zu können.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss einer Gewebefärbung auf das Ergebnis der ausgezählten ECD untersucht werden. Die Quantifizierung ohne Färbung, wie sie in den hier vorliegenden Experimenten durchgeführt wurde hat den Vorteil, dass die Zellen im Anschluss weiter kultiviert und im Verlauf mehrfach ausgezählt werden können. Eine Färbung kann meist nur am Ende eines Untersuchungszeitraums erfolgen, da Färbemittel meist zytotoxisch sind und die Hornhautpräparate anschließend verworfen werden müssen. Die Auszählung gefärbter Zellen schneller durchführbar und genauer, da die Zellgrenzen besser sichtbar sind. Ob sie jedoch unterschiedliche Resultate erzielt, als die Auszählung

ungefärbter Zellen ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt in der Literatur nicht beschrieben worden. Um auch vitale Zellen über einen längeren Untersuchungszeitraum mehrfach quantifizieren zu können – wie im klinischen Ablauf vor einer Hornhauttransplantation – ist eine Auszählung ohne vorherige Färbung notwendig. Eine Validierung der Zählmethode nicht-gefärbter Zellen spielt in diesem Sinne für die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse eine große Rolle, weshalb untersucht wurde, ob die Zählung ohne Färbung signifikant unterschiedliche Ergebnisse liefert als die Analyse gefärbter Endothelzellen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Schweineaugen

Für die Experimente wurden ausschließlich Hornhäute von Schweinen verwendet. Da es sich um Schlachttiere handelte, war ein Ethikvotum oder eine Tierversuchsgenehmigung für die Durchführung der Experimente nicht notwendig. Die Schweineaugen wurden von einem lokalen Schlachtbetrieb (Itzehoe, Niedersachsen, Deutschland) bezogen. Die Enukleation der Augen wurde durch das Personal des Schlachtbetriebs unmittelbar post-mortem vor der thermischen Desinfektion der Tiere durchgeführt. Nach der Entnahme wurden die Schweineaugen innerhalb weniger Stunden in die Hornhautbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) transportiert, wo sie am gleichen Tag innerhalb weniger Stunden entsprechend zu „split corneal buttons“ präpariert und zur Inkubation in Kulturmedium vorbereitet wurden. Die Zeit zwischen Schlachtung und Präparation wurde so knapp wie möglich gehalten und betrug stets weniger als zehn Stunden.

2.1.1 Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
Povidon-Jod 7,5 %, Braunol	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Dulbecco’s PBS (1X), #14190094	Gibco, Paisley, Großbritannien
Culture Medium 1, #F9016	Biochrom GmbH, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS), S0415-GA	Biochrom GmbH, Berlin
Amphotericin B 250 µg/ml, A 2612	Biochrom GmbH, Berlin
Hypotone balancierte Salzlösung (Balanced Salt Solution), hBSS NaCl 4,9 g; KCl 0,75 g; CaCl x H2O 0,49 g; MgCl2 x H2O 0,3 g; Sodium Acetat x 3 H2O 3,9 g; Sodium Citrat x 2 H2O 1,7 g	Klinikinterne Apotheke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Trypanblau 0,4 %, #93595	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Alizarinrot S, #A5533-25G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natronlauge (NaOH) 0,1 M	laboreigene Ansetzung
Salzsäurelösung (HCl) 0,1 M	laboreigene Ansetzung
Natriumchlorid (NaCl), 0,9 %, 100 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Perfluorbutylpentan (F4H5) (steril verpackt, Stechampullen)	Fluoron GmbH, Ulm

Tabelle 1 – Verwendete Substanzen

2.1.2 Instrumente und Verbrauchsmaterial

Gegenstand	Hersteller
Petrischalen	VWR International, Radnor, USA
Plastikbecher (steril)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
MillexGV Filter Unit 0,22 µm	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland
Spritze, 5 ml	BD, Franklin Lakes, USA
Stumpfe Kanüle mit Filter (5 µm) 18G	BD, Franklin Lakes, USA
Einmal-Skalpell (flach)	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Kolibripinzette	Geuder AG, Heidelberg
Hockey-Messer	Geuder AG, Heidelberg
Fadenpinzette	Geuder AG, Heidelberg
Nadelhalter	Geuder AG, Heidelberg
Fadenschere	Geuder AG, Heidelberg
Präparationsschere	Geuder AG, Heidelberg
Federschere	Geuder AG, Heidelberg
Gebogene Schere	Geuder AG, Heidelberg
Trepan, ø 7,5 mm	Geuder AG, Heidelberg
Faden 10-0, Ethilon Polyamid 6	Ethicon Inc., Somerville, USA
Accu-jet pro	Brand GmbH, Wertheim
Serologische Pipette, 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Serologische Pipette, 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Bulbushalter	L. Klein
Zellkulturtestplatten (12-Well)	Corning Inc., Corning, USA
Handschuhe (steril), Peha-micron Plus	Hartmann GmbH, Heidenheim
OP-Kopfhaube	FarStar medical GmbH, Barsbüttel
OP-Gesichtsmaske	FarStar medical GmbH, Barsbüttel

Steriles Abdecktuch, Foliodrape	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Eppendorf-Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Wägepapier	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Faltenfilter, ø 185 mm	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Laborgewindeflasche, 100 ml	Schott AG, Mainz
Rührfisch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Becherglas, 50 ml	Schott AG, Mainz

Tabelle 2 – Verwendete Instrumente und Verbrauchsmaterial

2.1.3 Geräte & Software

Gegenstand	Hersteller
Binokulares OP-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena
Kaltlichtquelle KL 1500	Schott AG, Mainz
Sicherheitswerkbank LaminaAir HB2472	Heraeus GmbH, Hanau
Inkubationsschrank	Heraeus GmbH, Hanau
Feinwaage	Ohaus Europe GmbH, Greifensee, Schweiz
Magnetrührer mit Heizfunktion	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
pH-Meter pHenomenal	VWR International, Radnor, USA
Autoklav	Fedegari S.p.A., Albuzzano, Italien
Inverses Phasenkontrastmikroskop, Olympus IX51	Olympus GmbH, Tokio, Japan
Mikroskopkammera, Olympus XC30	Olympus GmbH, Tokio, Japan
CellSens Entry (Software)	Olympus GmbH, Tokio, Japan
Image J (Software)	National Institutes of Health, Bethesda, USA
CellCounter PlugIn für Image J	NIH/University of Sheffield, UK
Photoshop CS2 (Software)	Adobe Systems, San José, USA
R (Software)	R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; https://www.R-project.org/

Tabelle 3 – Verwendete Geräte und Software

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der Schweineaugen

Schweineaugen, die sichtbar bei der Schlachtung beziehungsweise bei der Enukleation verletzt worden waren (zum Beispiel Einschnitt durch Messer) oder eine makroskopisch sichtbare Hornhauttrübung aufwiesen, wurden nicht verwendet. Um eine ausreichende Desinfektion zu gewährleisten, die Kontaminationsgefahr der späteren Zellkultur zu senken und die Handhabbarkeit bei der späteren Präparation der Hornhautlamellen zu erleichtern, wurden die Schweinaugen zu Beginn mittels Präparationsschere und Pinzette von periorbitalem Gewebe (Fett, Muskel, Bindegewebe) befreit. Für die nachfolgende Desinfektion wurden 3 ml Jod (Braunol, Povidon-Jod 7,5 %) mit 57 ml PBS-Lösung (Dulbecco's PBS, Gibco) in einem sterilen Plastikbecher im Verhältnis 1:20 vermischt. Je sechs der präparierten Augen wurden für fünf Minuten in der 5 %-Jod-PBS-Lösung inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Augen in einen ausschließlich mit PBS befüllten sterilen Plastikbecher überführt. Pro Präparationsrunde wurden auf diese Weise 12 Schweineaugen vorbereitet.

2.2.2 Vorbereitung des Kulturmediums

Für die Inkubation der Hornhaut-Lamellen musste eine Nährlösung hergestellt werden. Hierfür wurden unter sterilen Bedingungen 2,0 ml FCS (fetal calf serum, fetales Kälberserum, Biochrom, Berlin) aufgetaut und mit einer Spritze (5 ml, BD, USA) und einer stumpfen Kanüle (BD, USA) aufgezogen. Über einen Spritzenfilter (MillexGV Filter Unit 0,22 µm, Merck Millipore Ltd.) wurde das FCS mit 80 ml Kulturmedium I (Culture Medium I, ohne Dextran, Biochrom, Berlin) vermischt. Die Filtration erfolgte, um das Kontaminationsrisiko durch eventuelle Bakterien im FCS zu verringern. Zur Verringerung des Risikos eines eventuellen Pilzbefalls wurden zum anfänglich verwendeten Kulturmedium zusätzlich 0,8 ml Amphotericin B (250 µg/ml, Biochrom GmbH, Berlin) auf 80 ml Medium zugegeben. Von der nun fertigen Nährlösung wurden anschließend je 3 ml in einen Napf einer 12-Well Zellkulturplatte pipettiert.

2.2.3 Exzision der porcinen Hornhautlamellen („Split Corneal Buttons“)

Für die Testung von F4H5 wurden sogenannte „split corneal buttons“ verwendet. In vorangehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch die Lamellierung der Hornhaut durch vermindertes Aufquellen des Hornhautstromas (im Vergleich zu nicht lamellierten Hornhautstanzen) ein geringerer Endothelzellverlust verzeichnet wird, wodurch der Einfluss von zu testenden Substanzen exakter beobachtet werden kann (siehe Kapitel 1.5; Kunzmann et al. 2018).

Zur Entnahme der Hornhäute wurden die Augen aus der PBS-Lösung entnommen und im sterilen Umfeld (steriles Tuch, Handschuhe, Kopf-/Mundschutz) auf einem Bulbushalter (L. Klein) platziert. Mit Hilfe eines Trepans (ø 7,5 mm) wurde unter dem Präparationsmikroskop (Carl Zeiss AG, Jena) die Hornhaut zentral oberflächlich eingestanzt (siehe Abbildung 6). Da in den Trepan ein Abstandshalter integriert wurde, konnte sichergestellt werden, dass die Hornhaut nur bis zu einer Tiefe von 300 µm eingestanzt wurde.

Anschließend wurde mittels einer Pinzette die Hornhaut oberflächlich gefasst, während mit einem Einmal-Skalpell (Aesculap, Tuttlingen) mit gerader Schneidefläche die obere, soeben trepanierte Hornhautschicht (bestehend aus cornealem Epithel, Bowman-Membran und Hornhautstroma), auf einer Tiefe von 300 µm horizontal von der übrigen unteren Hornhautschicht abgetrennt.

Um im weiteren Versuchs- und Beobachtungszeitraum Ober- und Unterseite der Hornhautlamelle unterscheiden zu können, wurde nun ein chirurgischer Faden der Stärke 10-0 (Ethilon Polyamid 6, 10-0, Ethicon Inc., USA) mit Hilfe eines Nadelhalters und einer Fadenpinzette locker im Hornhautstroma verknotet, ohne jedoch die Endothel-Seite zu durchstechen. Fadenreste wurden knotennah abgeschnitten.

Mit dem 7,5 mm-Trepan wurde nun die Hornhaut vorsichtig unter leichten Drehbewegungen aus dem verbliebenen Teil ausgestanzt und mit einer Kolibri-Pinzette entnommen. Im Falle, dass ein Präparat nach Trepanation noch an einer Seite festgehangen hatte, wurde die Gewebebrücke mit einem Hockey-Messer oder einer gebogenen Schere durchtrennt. Die Hornhautlamellen („split corneal buttons“, siehe Abbildung 7), nun bestehend aus Hornhautstroma, Descemet-Membran und Endothel, wurden in die mit Nährmedium befüllten 12-Well-Zellkulturplatten mit der

mit Faden markierten Stroma-Seite nach unten platziert. Ein Kontakt von Pinzette und Hornhautendothel wurde hier stets vermieden. Jeder Hornhautlamelle wurde eine Identifikationsnummer zur Nachverfolgung und Zuordnung der späteren Zellzählung zugeteilt. Die Nummern wurden auf der 12-Well-Zellkulturplatte vermerkt.

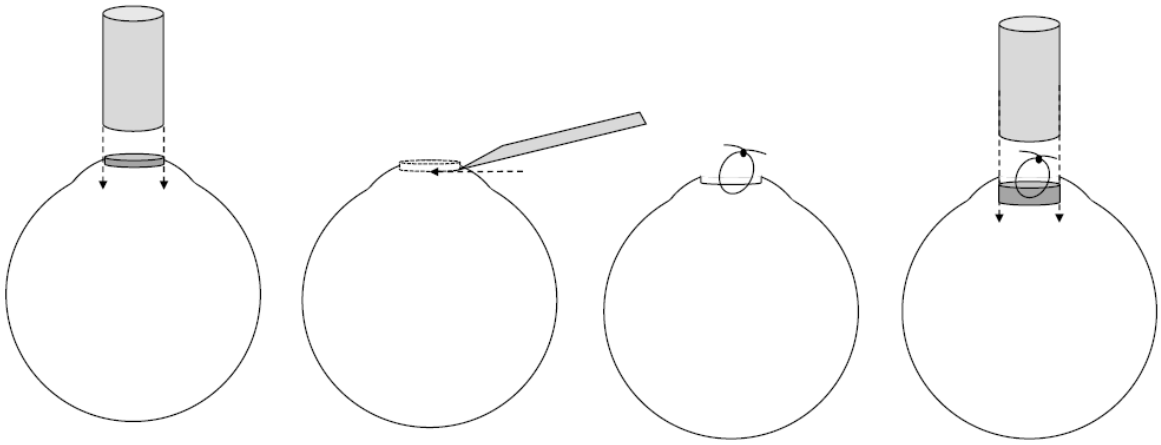

Abbildung 6 – Schematische Darstellung der Präparation der Hornhautlamelle („split corneal button“). Zunächst wird die Hornhaut mit einem Trepan (ø 7,5mm) in eine Tiefe von 300 µm eingestanzt. Nach horizontaler Abtragung der Lamelle mit flachem Skalpell und Einbringung der Faden-Markierung im Hornhautstroma wird die Hornhaut auf verbliebener Strecke vollständig trepaniert.

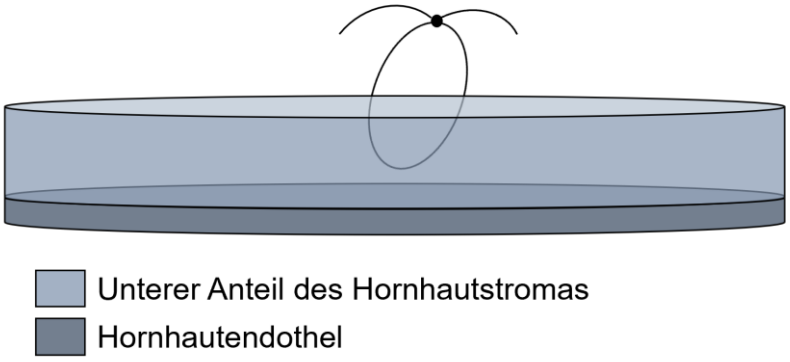

Abbildung 7 – Schematische Darstellung einer präparierten Hornhautlamelle („split corneal button“). Durch Reduktion der Stroma-Dicke um ca. 300 µm wird das spätere Aufquellen im Zellkulturmedium über den Beobachtungszeitraum von zwei Wochen deutlich reduziert. Der Faden zur Markierung der Stroma-Seite muss dabei ohne Kontakt zum Hornhautendothel eingebracht werden.

Die Kultivierung der Hornhautlamellen in Kulturmedium erfolgte im Brutschrank (Heraeus GmbH, Hanau) unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO_2, 95 % Luftfeuchtigkeit). Dies entspricht den gängigen Kulturmethoden in Hornhautbanken (Schroeter et al. 2009). Die gesamte Inkubationsdauer betrug jeweils 15 Tage.

2.2.4 Wechsel des Kulturmediums

Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der stoffwechselaktiven Endothelzellen zu gewährleisten und stabile Kultivierungsbedingungen zu gewährleisten, wurde das Kulturmedium nach einer Woche an Tag 8 erneuert. Als Kulturmedium wird wie zu Beginn das Dextran-freie Kultur-Medium 1 (Culture Medium I, w/o Dextran, Biochrom GmbH, Berlin) verwendet. 80 ml des Kulturmediums wurden mit 2 ml fetalem Kälberserum (Biochrom GmbH, Berlin) vermischt und je 3 ml des Gemisches in einen Napf der 12-Well pipettiert. Amphotericin B wurde im Gegensatz zur initialen Inkubation nicht erneut eingebracht. Beim Wechsel wurde ebenfalls, auf etwaige Veränderungen des Kulturmediums geachtet. Ein Absinken des pH durch eine anaerobe Stoffwechsellage hätte beispielsweise zu einer Gelbfärbung des violetten pH-Indikators im Medium geführt. Eine Trübung des Kulturmediums, gegebenenfalls auch mit Gelbfärbung, hätte auf einen Pilz- oder Bakterienbefall deuten können.

Das wöchentliche Wechseln des Kulturmediums entspricht dem klassischen Ablauf für Spenderhornhäute in der Hornhautbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Filev et al. 2018).

Substanz	Hersteller	Menge	Medium d0	Medium d8
Culture Medium 1 – w/o Dextran T500	Biochrom GmbH, Berlin	80 ml	✓	✓
Fetales Kälberserum	Biochrom GmbH, Berlin	2,0 ml	✓	✓
Amphotericin B	Biochrom GmbH, Berlin	0,8 ml	✓	-

Tabelle 4 – Zusammensetzung des Kulturmediums an Tag 0 und des zum Austausch verwendeten Kulturmediums an Tag 8 (ohne Amphotericin B).

2.2.5 Mikroskopie der porcinen Hornhautlamellen

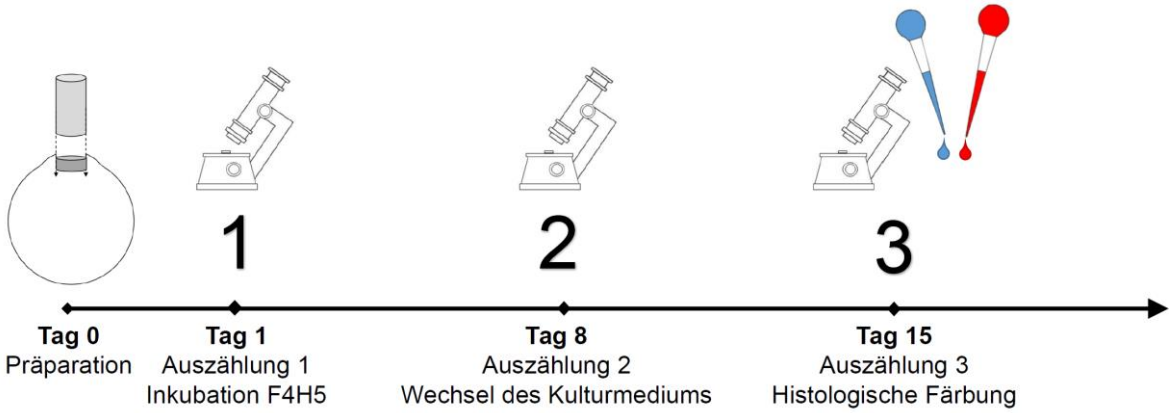

Abbildung 8 – Versuchsablauf. Nach Präparation und Einbringung in Kulturmedium an Tag 0 erfolgte je eine Auszählung an Tag 1 (d1), Tag 8 (d8) und Tag 15 (d15). Zusätzlich wurden die Präparate nach der ungefärbten Auszählung an Tag 15 mit einer 0,25 %-Trypanblau-Lösung und 0,2 %-Alizarinrot S-Lösung für die morphologische Auswertung gefärbt. Die Inkubation in F4H5 bzw. BSS erfolgte nach der ersten Auszählung an Tag 1.

Nach der Präparation an Tag 0 erfolgte an den Tagen 1, 8 und 15 die mikroskopische Begutachtung inklusive der Fotografie des Hornhautendothels (siehe Abbildung 8). Hierfür wurden je 3 ml hypotone BSS-Spüllösung (hBSS, hypotonic balanced salt solution; pro 1 Liter H_2O: NaCl 4,9 g; KCl 0,75 g; CaCl x H_2O 0,49 g; $MgCl_2$ x H_2O 0,3 g; Sodium Acetat x 3 H_2O 3,9 g; Sodium Citrat x 2 H_2O 1,7 g; bei einem pH von 7,2 beträgt die Osmolarität 0,25 osmol/kg) in einen Napf einer 12-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Dies führt innerhalb weniger Sekunden zum osmotischen Anschwellen der Endothelzellen, wodurch die Zellen bzw. -grenzen besser sichtbar sind und die Auszählung erleichtert wird (siehe Abbildung 9 & 10). Die mit hBSS befüllte Kulturplatte wurde mit den entsprechenden Hornhautlamellen besetzt. Hierbei wurde das jeweilige Präparat mit der Endothelzell-Seite nach unten platziert, da die Optik des verwendeten Phasenkontrast-Mikroskops (Olympus IX51) invertiert ist und dementsprechend von unten auf die Zellen blickt. Um ein Reiben zwischen Kulturplatte und Endothel zu verhindern, wurden Bewegungen der Zellkulturplatte möglichst vermieden. Vor der mikroskopischen Begutachtung verweilten die Lamellen je ca. 1-2 min in der hBSS-Lösung, um ein ausreichendes Aufquellen abzuwarten (Wolf et al. 2009).

Bei 400-facher Vergrößerung wurden drei Fotografien des Endothels von drei unterschiedlichen Arealen der zentralen Hornhaut aufgenommen. Um die

Kontaktzeit von Hornhautlamelle und hBSS-Lösung möglichst kurz zu halten und einen Zellschaden durch übermäßiges osmotisches Aufquellen zu verhindern, wurde immer nur eine Lamelle in die Kulturplatte überführt und nach abgeschlossener Begutachtung unter dem Mikroskop unverzüglich wieder in das Nährmedium rückgeführt (Meltendorf et al. 2007). Auf diese Weise betrug die Kontaktzeit stets weniger als vier Minuten.

Zur Auszählung der ECD wurde mit Photoshop CS2 (Adobe, USA) ein Quadrat mit einer Seitenlänge von maßstabsgetreuen 100 µm projiziert, in der Fläche also 100 µm². Die Software ImageJ (NIH, USA) mit dem CellCounter-Plugin diente zur Markierung und Auszählung der einzelnen Zellen. Pro Bild wurden zwei Quadrate (siehe Abbildung 9) ausgezählt, sodass pro Hornhaut an jedem Kontrollzeitpunkt (d1, d8, d15) die Zellen auf einer Fläche von sechsmal 100 µm² ausgezählt wurden. Aus den ermittelten Werten der sechs Auszähl-Quadrate wurde das arithmetische Mittel für jede Hornhaut zu jedem Kontrollzeitpunkt (d1, d8, d15) bestimmt. Der ermittelte Mittelwert wurde auf die ECD pro mm² (Faktor 100) extrapoliert.

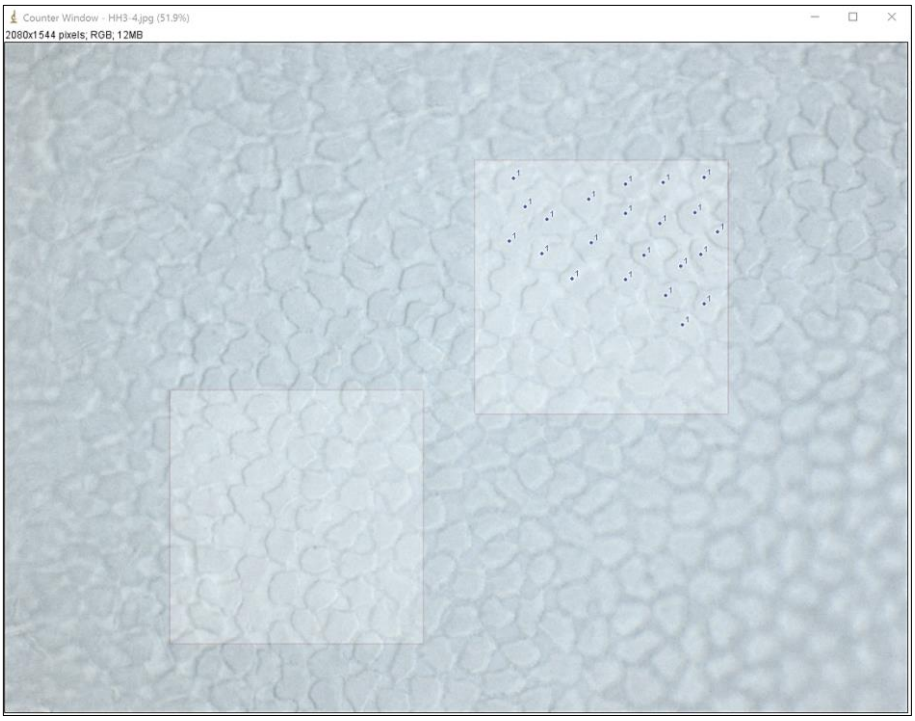

Abbildung 9 – Beispielansicht der Endothelzellen einer Hornhautlamelle während der Auszählung der Zellen. Mithilfe der Software ImageJ (NIH, USA) und dem CellCounter PlugIn (NIH/University of Sheffield, UK) wurden pro Foto die Zellen innerhalb von zwei Quadraten (je 100 µm² ≙ 582 x 582 px auf dem Foto (2080 x 1544 px)) ausgezählt.

Für die morphologische Auswertung wurden ausschließlich gefärbte Aufnahmen (siehe Kapitel 2.2.7) verwendet. Die Auszählung der Reformationsfiguren (reformation figures) erfolgte wie die Zählung der ECD in Quadraten mit einer Seitenlänge von 100 µm. Gezählt wurde jeweils, wie viele Zellgrenzen auf einen gemeinsamen Punkt treffen (normal drei Zellgrenzen ≙ hexagonaler Zellform; nach Zelluntergang zunehmend ≥ 4 Zellgrenzen). Es wurden jeweils zwei Quadrate pro Bild, also ebenfalls sechs Quadrate pro Kontrollzeitpunkt ausgewertet.

Bei der Auszählung der Rosettenformationen und der zerstörten Zellareale (Alizarin-rote Areale aufgrund denudierter Desecemet-Membran) wurde ähnlich verfahren, jedoch wurde hierfür ein Quadrat mit einer Seitenlänge von 200 µm auf die jeweiligen Bilder projiziert. Pro Bild wurde ein Quadrat ausgezählt, sodass pro Kontrollzeitpunkt hier der Mittelwert aus drei Aufnahmen ermittelt wurde.

2.2.6 Biokompatibilitätstestung von Perfluorbutylpentan

Das getestete Medikament ist F4H5 (Perfluorbutylpentan). Es handelt sich um semifluoriertes Alkan (SFA) welches in der Ophthalmochirurgie als amphiphiles Lösungsmittel unter anderem zur Auflösung von Silikonöl („sticky silicone oil“) verwendet wird. F4H5 wurde in steril verpackten Stechampullen vom Hersteller (Fluoron GmbH, Ulm) zur Verfügung gestellt.

Zur Testung wurden die Hornhautlamellen an Tag 1, nach der ersten Zellzählung, zu unterschiedlich langen Zeiten (15 min, 30 min, 60 min, 120 min) in F4H5 in einer 12-Well-Kulturplatte inkubiert. Pro Inkubationsgruppe wurden 8 Hornhautlamellen Perfluorbutylpentan ausgesetzt. Die Hornhautlamellen wurden jeweils in 1,8 ml F4H5 mit der Endothelfläche nach oben zeigend überführt, sodass die Präparate vollständig durch die Flüssigkeit bedeckt waren. Nach der jeweiligen Inkubationszeit (15 min, 30 min, 60 min, 120 min) wurde das F4H5 mit einer Pipette aus der 12-Well-Zellkulturplatte entnommen. Die Wells wurden anschließend dreimalig mit BSS-Lösung gespült. Die Kontrollgruppe unterlief einer identischen Inkubations- und Spülprozedur, anstelle von F4H5 wurde jedoch BSS verwendet. Für einen Vergleich einer eventuellen Schädigung durch die Spülprozedur wurde ebenfalls eine Gruppe ohne Inkubation oder BSS-Spülung über zwei Wochen beobachtet.

Der weitere Ablauf (Zählung, Kultivierung, etc.) erfolgte identisch zu oben erläuterten Prozedere. Die ECD (Zellen/mm²) der Gruppen (F4H5 vs. BSS vs. no BSS) wurden miteinander verglichen.

2.2.7 Färbung der Hornhautlamellen

Zusätzlich zur Auszählung der Zellen an Tag 15, wurden die Hornhautlamellen für die morphologischen Auswertung gefärbt (siehe Abbildung 10). Außerdem sollte die ungefärbt ausgewertete ECD mit der Auswertung nach Färbung verglichen werden. Da die verwendeten Färbemittel zytotoxische Effekte auf das Hornhautendothel haben, wurde eine Färbung ausschließlich am Ende des Beobachtungszeitraums durchgeführt.

Die Färbung der porcinen Hornhautlamellen wurde analog zur Methode von Taylor & Hunt (1981) mit einer 0,25 %-Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, USA) und 0,2 %-Alizarinrot S-Lösung (Sigma-Aldrich, USA) durchgeführt.

Die Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, USA) musste zunächst durch Zugabe von 0,9 %-NaCl von einer 0,4 %- auf eine 0,25 %-Lösung verdünnt werden. Alizarinrot S (Sigma-Aldrich, USA) wird nur als Pulver geliefert. Zur Herstellung einer Lösung wurde nach Abwiegen von 100 mg auf der Feinwaage das Alizarinrot S-Pulver unter Rühren mithilfe eines Rührfisches auf einem Magnetrührer mit Heizfunktion auf ca. 50 °C mit 50 ml 0,9 %-NaCl erhitzt und aufgelöst. Um eventuelle Klumpen zu entfernen, wurde die Lösung anschießend durch einen Faltenfilter in eine Laborgewindeflasche gefiltert. Da Alizarinrot S bei einem pH von 4,2 das beste Färbeverhalten zeigt (Taylor & Hunt 1981), wurde vor jeder Färbung der pH mittels pH-Meter gemessen und bei Bedarf mit 0,1 M Natronlauge-Lösung bzw. 0,1 M Salzsäure-Lösung titriert.

Die Färbung der Hornhautlamellen wurde wie folgt durchgeführt:

1. Entnahme der Hornhautlamellen aus dem Kulturmedium und Platzieren in einer Petrischale mit der Endothelseite nach oben (Fadenmarkierung unten)
2. Beträufeln des Endothels mit 0,25 % Trypanblau für 90 s mit einer Pipette
3. Vorsichtige Spülung der Hornhautlamelle in 0,9 % NaCl in einem kleinen Becherglas mit Hilfe einer Kolibri-Pinzette

4. Erneute Überführung der Hornhautlamelle in Petrischale mit der Endothelseite nach oben (Fadenmarkierung unten)
5. Beträufeln des Endothels mit 0,2 % Alizarinrot S (pH 4,2) für 90 s mit Hilfe einer Pipette
6. Vorsichtige Spülung der Hornhautlamelle in 0,9 % NaCl in einem kleinen Becherglas mit Hilfe einer Pinzette
7. Überführung der Präparate in Zellkulturplatte mit hBSS

Nach abgeschlossener Färbung wurden die Hornhautlamellen zur Begutachtung mit der Endothelseite nach unten (Fadenmarkierung oben) wieder in eine mit hBSS-Lösung befüllten Zellkulturplatte überführt. Unter dem inversen Phasenkontrastmikroskop erfolgte analog zur ungefärbten Variante die Fotografie der nun gefärbten Endothelzellen an drei Lokalisationen der zentralen Hornhautlamelle. Gleichermaßen erfolgte Auszählung der ECD an zwei 100 µm²-großen Quadraten pro Bild. Die Mittelwerte der sechs Quadrate wurden erneut auf die Endothelzelldichte (Zellen/mm²) (Faktor 100) extrapoliert.

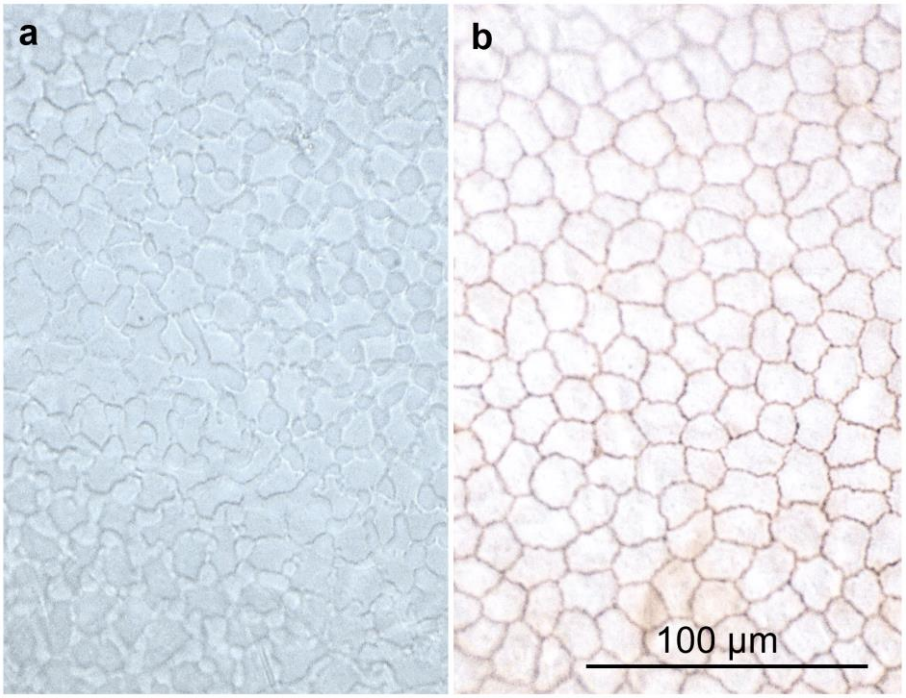

Abbildung 10 – Hornhautendothel bei 400-facher Vergrößerung. (a) ohne Färbung nach Anschwellen der Endothelzellen in hypotoner BSS-Lösung. (b) Nach Färbung mit Trypanblau und Alizarinrot S.

Für die morphologische Auswertung der Endothelzellen wurden die identischen Bilder wie zur Analyse der ECD verwendet. Es erfolgte die Quantifizierung dreier morphologischer Parameter zur indirekten Quantifizierung von Zelluntergang und -reorganisation (siehe Abbildung 11):

- **Reformationsfiguren** („reformation figures“, Aufeinandertreffen von ≥ 4 Zellen in einem Punkt, d.h. Abweichungen der physiologischen hexagonalen Zellform junger bzw. gesunder Hornhäute);
- **Rosettenformationen** („rosette formations“, charakteristische Rosetten-förmige Ausrichtung von mindestens 5 Zellen, die unmittelbar an eine untergehende Zelle angrenzen und den freiwerdenden Platz auffüllen);
- **Alizarin-rote Areale** („alizarin red areas“, zerstörte und damit nicht mehr vorhandene Zellen führen zu einer Denudierung der Descemet-Membran, die sich durch Anfärbung mit Alizarinrot S als rote Areale darstellt („alizarin red areas).

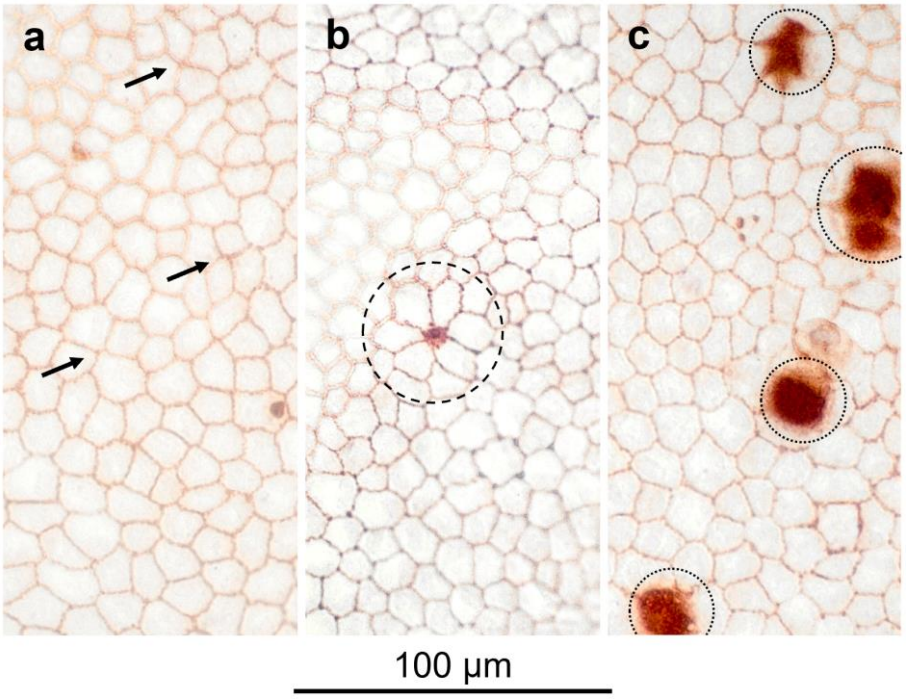

Abbildung 11 – Verwendete morphologische Parameter zur indirekten Quantifizierung von Zelluntergang und -reorganisation. (a) Reformationsfiguren (Aufeinandertreffen von ≥4 Zellen anstatt 3; Pfeile), (b) Rosettenformationen (zentrale untergehende Zelle mit charakteristischer Rosetten-artige Formation von 5 oder mehr umgebenden Zellen; gestrichelter Kreis) und (c) Alizarin-rote Areale (denudierte Descemet-Membran aufgrund zerstörter Zellen; gepunktete Kreise).

2.2.8 Statistische Analyse

Die ECD wurde in maßstabsgetreuen Quadraten mit einer Seitenlänge von 100 µm ausgezählt. Der Mittelwert der ECD aus sechs Quadraten (je 100 µm²) pro Kontrollzeitpunkt (d1, d8, d15, d15 + Färbung) wurde jeweils mit dem Faktor 100 multipliziert, um die ECD pro mm² zu erhalten. Um eine Vergleichbarkeit der Inkubationsgruppen mit unterschiedlichen Ausgangszahlen der ECD zu gewährleisten, wurde zu Beginn in Bezug zur Kontrollgruppe eine Normalisierung an d1 aller Gruppen durchgeführt. Die deskriptive Statistik des ECD-Verlaufs beinhaltete zudem die Berechnung des Medians, der Minima und Maxima, des 25 %- und 75 %-Quartils sowie des 95 %-Konfidenzintervalls. Neben der Auswertung der ECD wurde eine morphologische Auswertung (Reformationsfiguren, Rosettenformationen, Alizarin-rote Areale) im Rahmen einer Vergleichs-Analyse zwischen der Kontrollgruppe und den F4H5-Inkubationsgruppen an d15 durchgeführt.

Für die statistische Auswertung der ECD-Abnahme sowie der morphologischen Veränderungen der verschiedenen Gruppen in Bezug zur Kontrollgruppe wurden nicht-parametrische Tests verwendet. Für die Analyse des ECD-Abfalls wurde ein Kruskal-Wallis- sowie Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für den Vergleich der Variablen der morphologischen Auswertung (Reformationsfiguren, Rosettenformationen, Alizarin-rote Areale) zwischen den Gruppen wurde ebenfalls ein Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Die Vergleichsanalyse der Zählung der ECD vor und nach Färbung erfolgte als gepaarte Analyse mithilfe des Wilcoxon-Signed-Rank-Tests. Die unterschiedliche Anzahl (n) an Präparaten in den Vergleichs-Gruppen wurde mittels Bonferroni-Korrektur begegnet. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software „R“ (2017).

Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet, sofern sie ein p-Wert von $p < 0,05$ erzielten. Die p-Werte wurden an den entsprechenden Stichprobenumfang angepasst. Box-Whisker-Plots (Minimum, Q25%, Median, Q75%, Maximum) wurden zur Veranschaulichung der Daten erstellt.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 60 Hornhautpräparate („split corneal buttons“) in dieser Arbeit untersucht und statistisch ausgewertet. Die Kontrollgruppe (control, BSS-Inkubation) bestand aus 16 Präparaten, die Gruppe ohne Inkubation/Spülung (no BSS) aus 12 Präparaten. Für die jeweiligen F4H5-Testgruppen (15, 30, 60, 120 min) wurden jeweils acht Präparate verwendet. Ein Präparat der Kontrollgruppe (control (BSS)) konnte an Tag 8 nicht in ausreichender Qualität fotografiert werden, hingegen war an Tag 15 eine Auswertung wieder möglich, sodass das Präparat nicht verworfen wurde. Ein weiteres Präparat dieser Gruppe konnte nicht in ausreichender Qualität gefärbt werden, sodass es nicht in der morphologischen Auswertung berücksichtigt werden konnte. Ebenfalls konnte ein Präparat der Gruppe „no BSS“ an Tag 15 nicht ausgewertet werden. In der statistischen Auswertung wurde die unterschiedliche Anzahl an Präparaten an den einzelnen Kontrollpunkten berücksichtigt (Bonferroni-Korrektur).

	d1 (n)	d8 (n)	d15 (n)	$d15_{stained}$ (n)
control (BSS)	16	15	16	15
no BSS	12	12	11	-
F4H5 15 min	8	8	8	8
F4H5 30 min	8	8	8	8
F4H5 60 min	8	8	8	8
F4H5 120 min	8	8	8	8

Tabelle 5 – Anzahl der ausgewerteten Hornhaut-Präparate („split corneal buttons“) an den jeweiligen Kontrollpunkten. Die Auswertung jeweils einer Hornhaut konnte für Tag 8 in der Kontrollgruppe (control (BSS)) und an Tag 15 in der Gruppe „no BSS“ nicht durchgeführt werden. Die Färbung eines Präparats in der Kontrollgruppe ($d15_{stained}$) erzielte keine ausreichende Färbequalität. Unterschiede in der Präparate-Anzahl wurde mittels Bonferroni-Korrektur begegnet.

3.1 Auswirkungen von Perfluorbutylpentan auf die Endothelzelldichte

Durch die an Tag 1 durchgeführte Normalisierung ist der Mittelwert der ECD in den verschiedenen Gruppen als Ausgangswert an Tag 1 identisch (siehe Tabelle 6). Der Normalisierungs-Faktor wurde auch an den darauffolgenden Kontrollpunkten auf die ECD-Ergebnisse angewandt. Hierdurch wird die Vergleichbarkeit der ECD im

weiteren Verlauf erleichtert. Die Ergebnisse werden als Median ± 25%/75%-Quartil dargestellt.

An Tag 1 zeigten die Präparate aller Gruppen eine durchgehende Endothelzellschicht ohne sichtbaren großflächigen Schaden. Nach der an Tag 1 durchgeführten Normalisierung der Werte bestanden keine signifikanten Unterschiede der ECD (p = 1,000; control (n = 16) 4042 ± 71/150 Zellen/mm² (Median ± 25%/75%-Quartil); no BSS (n = 12) 4087 ± 111/77 Zellen/mm²; F4H5 15min (n = 8) 4082 ± 66/96 Zellen/mm²; F4H5 30 min (n = 8) 4090 ± 110/81 Zellen/mm²; F4H5 60 min (n = 8) 4072 ± 43/68 Zellen/mm²; F4H5 120min (n = 8) 4108 ± 111/17 Zellen/mm²).

			95% Bootstrap CIs						
Groups	**Day (d)**	**n**	**Mean**	**SD**	**Lower**	**Upper**	**Median**	**Q25**	**Q75**
control	1	16	4067	182	3980	4150	4042	3971	4192
no BSS	1	12	4067	161	3980	4150	4087	3976	4164
F4H5 15 min	1	8	4067	120	3990	4140	4082	4016	4151
F4H5 30 min	1	8	4067	145	3970	4160	4090	3980	4171
F4H5 60 min	1	8	4067	122	3980	4140	4072	4029	4140
F4H5 120 min	1	8	4067	104	4000	4130	4108	3997	4125
control	8	15	3893	260	3770	4010	3967	3725	4058
no BSS	8	12	3914	305	3740	4070	3950	3852	4079
F4H5 15 min	8	8	3928	217	3790	4070	3876	3823	4094
F4H5 30 min	8	8	3859	152	3760	3960	3853	3772	3914
F4H5 60 min	8	8	3763	282	3550	3920	3843	3695	3890
F4H5 120 min	8	8	3571	270	3380	3730	3596	3473	3784
control	15	16	3714	315	3560	3860	3658	3529	3954
no BSS	15	11	3660	378	3450	3860	3684	3509	3897
F4H5 15 min	15	8	3778	153	3690	3880	3737	3708	3856
F4H5 30 min	15	8	3786	273	3610	3960	3837	3511	3976
F4H5 60 min	15	8	3536	286	3330	3690	3606	3487	3724
F4H5 120 min	15	8	3366	159	3270	3480	3281	3238	3503

Tabelle 6 – Deskriptive Statistik der Abnahme der Endothelzelldichte. ECD-Mittelwerte (Mean) wurden an Tag 1 an die Kontrollgruppe (control) angepasst bzw. normalisiert, um im Verlauf eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Der hierbei errechnete Faktor wurde gleichermaßen auf die folgenden Kontrollzeitpunkte (d8, d15) angewandt. Die ECD wird als Zellen/mm² angegeben.

Im zeitlichen Verlauf konnte in allen Gruppen ein stetiger Verlust der ECD beobachtet werden. Der angewandte Kruskal-Wallis-Test (siehe Tabelle 7) fand dabei ausschließlich an Tag 15 signifikante Unterschiede zwischen den

unterschiedlichen Gruppen (DF = 5, d1: χ^2 = 0,05; p = 1.000; d8: χ^2 = 10.90; p = 0.053; d15: χ^2 = 12.79; p = 0.025).

An Tag 8, also der ersten Kontrolle nach Inkubation in BSS/F4H5 bzw. ohne Inkubation (no BSS) zeigte keine der Gruppen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe (control) signifikant abweichende Abnahme der ECD. Lediglich die Gruppe F4H5 120 min zeigte eine Tendenz in Richtung eines signifikant höheren Zellverlustes (p = 0,092) im Vergleich zur Kontrollgruppe (control (n = 15): 3967 ± 242/91 Zellen/mm² vs. F4H5 120 min (n = 8): 3596 ± 123/188 Zellen/mm²).

An Tag 15 zeigte einzig die Gruppe F4H5 120 min im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere ECD-Abnahme (siehe Abbildung 12 & Tabelle 8; d15: control (n = 16) 3658 ± 129/296 Zellen/mm² vs. F4H5 120 min (n = 8) 3281 ± 43/222 Zellen/mm²; p = 0,046).

Die übrigen Vergleichsgruppen zeigten weder an Tag 8 (no BSS (n = 12) 3950 ± 98/129 Zellen/mm²; F4H5 15 min (n = 8) 3876 ± 53/218 Zellen/mm²; F4H5 30 min (n = 8) 3853 ± 81/61 Zellen/mm²; F4H5 60 min (n = 8) 3843 ± 148/47 Zellen/mm²) noch an Tag 15 (no BSS (n = 11) 3684 ± 175/213 Zellen/mm²; F4H5 15 min (n = 8) 3737 ± 29/148 Zellen/mm²; F4H5 30 min (n = 8) 3837 ± 326/139 Zellen/mm²; F4H5 60 min (n = 8) 3606 ± 119/118 Zellen/mm²) signifikante Unterschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = 1,000; siehe Tabelle 7 & 8).

Groups	Chi-Square	DF	P-Value
d1	0,05	5	1,000
d8	10,90	5	0,053
d15	12,79	5	**0,025**

Tabelle 7 – Kruskal-Wallis-Test. Ausschließlich an d15 (p = 0,025) fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. An d1 und d8 sind die Unterschiede nicht (d1: p = 1,000) bzw. knapp nicht (d8: p = 0,053) signifikant. DF = dimensions of freedom (Freiheitsgrade).

Groups	d1	d8	d15
no BSS	1,000	1,000	1,000
F4H5 15 min	1,000	1,000	1,000
F4H5 30 min	1,000	1,000	1,000
F4H5 60 min	1,000	1,000	1,000
F4H5 120 min	1,000	0,092	**0,046**

Tabelle 8 – Mann-Whitney-U-Test (ECD). Vergleich der Inkubationsgruppen mit der BSS-Kontrollgruppe an Tag 1, 8 und 15 (gepaarter Vergleich). Allein die Gruppe F4H5 120 min zeigte signifikant niedrigere ECD-Werte an Tag 15 (p = 0,046).

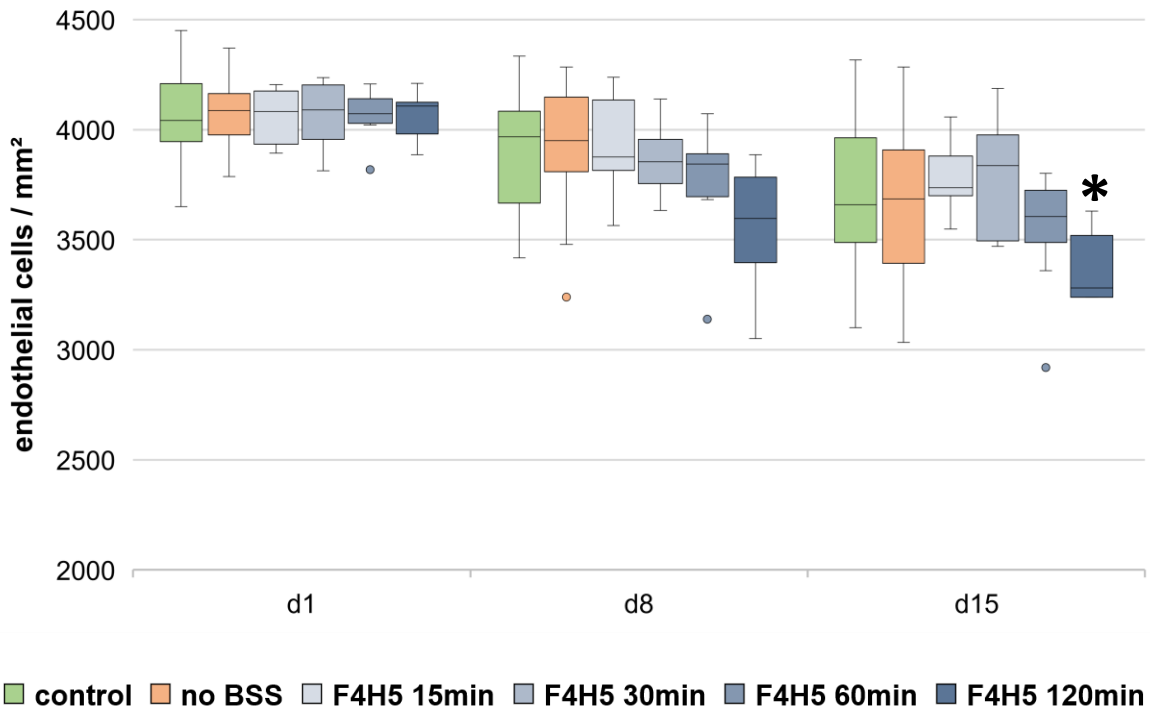

Abbildung 12 – Abnahme der Endothelzelldichte (ECD) Ausschließlich in der Gruppe F4H5 120 min (dunkelstes blau; 3281 ± 43/222 Zellen/mm²; p = 0.046) zeigte sich an Tag 15 eine signifikant niedrigere ECD im Vergleich zur Kontrollgruppe (control, grün; 3658 ± 129/296 Zellen/mm²). Box-Plots mit Whisker repräsentieren Minimum, Q25%, Median, Q75% und Maximum. Werte außerhalb des Interquartilsabstands (IQR) sind als Punkte dargestellt. * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p < 0,05).

Die absoluten und prozentualen Endothelzellverluste zwischen Tag 1 und Tag 8, zwischen Tag 8 und Tag 15 sowie auf den gesamten Zeitraum zwischen Tag 1 und Tag 15 gesehen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Ein auffällig hoher Verlust konnte in der Gruppe F4H5 120 min festgestellt werden (prozentualer Verlust als Median ± 25%/75%-Quartil; d1 bis d8: control: -4,74 % ± 2,4/1,95% vs. F4H5 120 min: -9,95 ± 4,34/1,1 %; d8 bis d15: control: -1,36 ± 4,78/0,96%) vs. F4H5 120 min: -8,59 ± 2,8/5,49 %; siehe Abbildung 13). Der mediane Gesamtverlust über zwei Wochen gesehen war in der Kontrollgruppe (-9,48 ± 1,48/3,55 %) nur etwa halb so hoch, wie in der Gruppe F4H5 120 min (-20,12 ± 0,73/6,27 %), was sich schließlich signifikant auf die ECD auswirkte (p = 0,046; siehe Tabelle 8). Bei einer Inkubationszeit von 60min in F4H5 zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine leicht erhöhte Abnahme von 11,46 ± 4,02/1,92 %, die jedoch nicht signifikant war (siehe oben).

Alle anderen Gruppen zeigten einen nahezu linearen und in etwa vergleichbaren Endothelzellverlust wie die Kontrollgruppe (siehe Tabelle 9; d1 bis d15: no BSS: -9,85 ± 2,63/4,65%; F4H5 15min: -8,45 ± 3,28/5,82 %; F4H5 30min: -6,18 ± 4,63/3,80 %).

Groups	ECD loss d1 to d8	ECD loss d8 to d15	ECD loss d1 to d15
control	-200,00 ± 108,33/83,33	-50,00 ± 191,67/33,33	-316,67 ± 125,00/70,84
	-4,74 ± 2,40/1,95 %	-1,36 ± 4,78/0,96 %	-9,48 ± 1,48/3,55 %
no BSS	-102,82 ± 141,38/55,69	-188,51 ± 218,49/94/26	-428,43 ± 72,83/221,07
	-2,45 ± 3,47/1,22 %	-5,82 ± 4,78/0,96 %	-9,85 ± 2,63/4,65%
F4H5 15 min	-16,42 ± 353,14/24,63	-106,76 ± 123,19/36,95	-320,28 ± 172,46/217,63
	-0,42 ± 8,39/0,82 %	-2,78 ± 7,61/1,11%	-8,45 ± 3,28/5,82 %
F4H5 30 min	-236,25 ± 85,54/73,32	-130,35 ± 48,88/134,42	-285,13 ± 158,86/187,37
	-5,68 ± 2,15/1,67%	-3,45 ± 1,10/3,57%	-6,18 ± 4,63/3,80 %
F4H5 60 min	-263,00 ± 144,23/114,14	-271,49 ± 55,14/152,72	-488,67 ± 156,11/102,65
	-6,41 ± 5,88/2,67 %	7,03 ± 2,90/3,96%	-11,46 ± 4,02/1,92 %
F4H5 120 min	-409,06 ± 178,97/72,44	-315,32 ± 102,26/204,53	-681,77 ± 174,70/123,57
	-9,95 ± 4,34/1,10 %	-8,59 ± 2,80/5,49 %	-20,12 ± 0,73/6,27 %

Tabelle 9 – Absoluter und prozentualer Endothelzellverlust in Woche 1 (d1 bis d8), Woche 2 (d8 bis d15) und über den gesamten Zeitraum (d1 bis d15). Angaben als Median ± 25%/75%-Quartil (in Zellen/mm² bzw. Prozent).

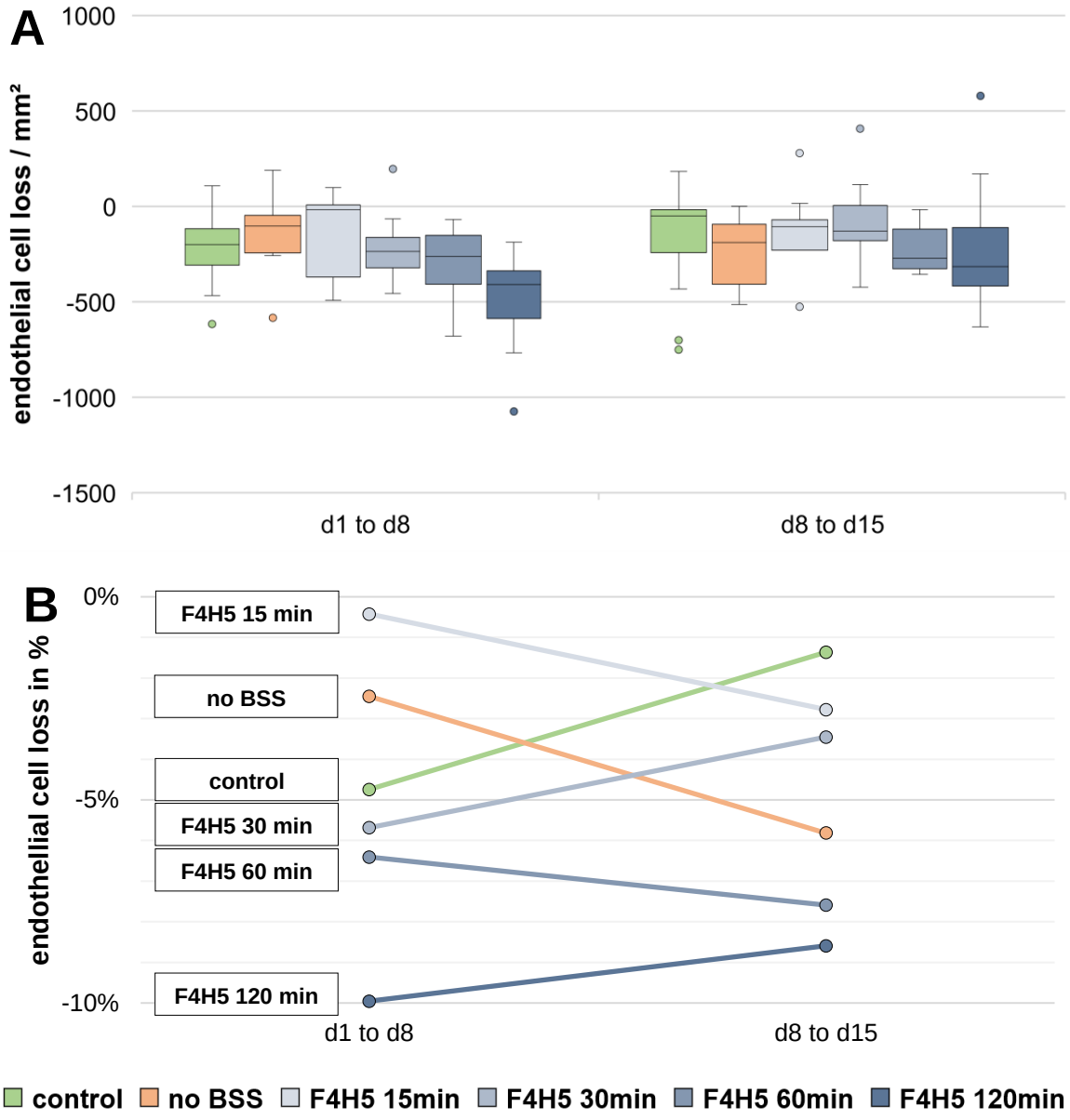

Abbildung 13 – Absoluter (A, Median ± 25%/75%-Quartil) **und prozentualer** (B) **Endothelzellverlust** (Median) in Woche 1 (d1 to d8) und Woche 2 (d8 to d15). Box-Whisker-Plot mit Minimum, Q25%, Median, Q75% und Maximum; Werte außerhalb des Interquartilsabstands (IQR) sind als Punkte dargestellt.

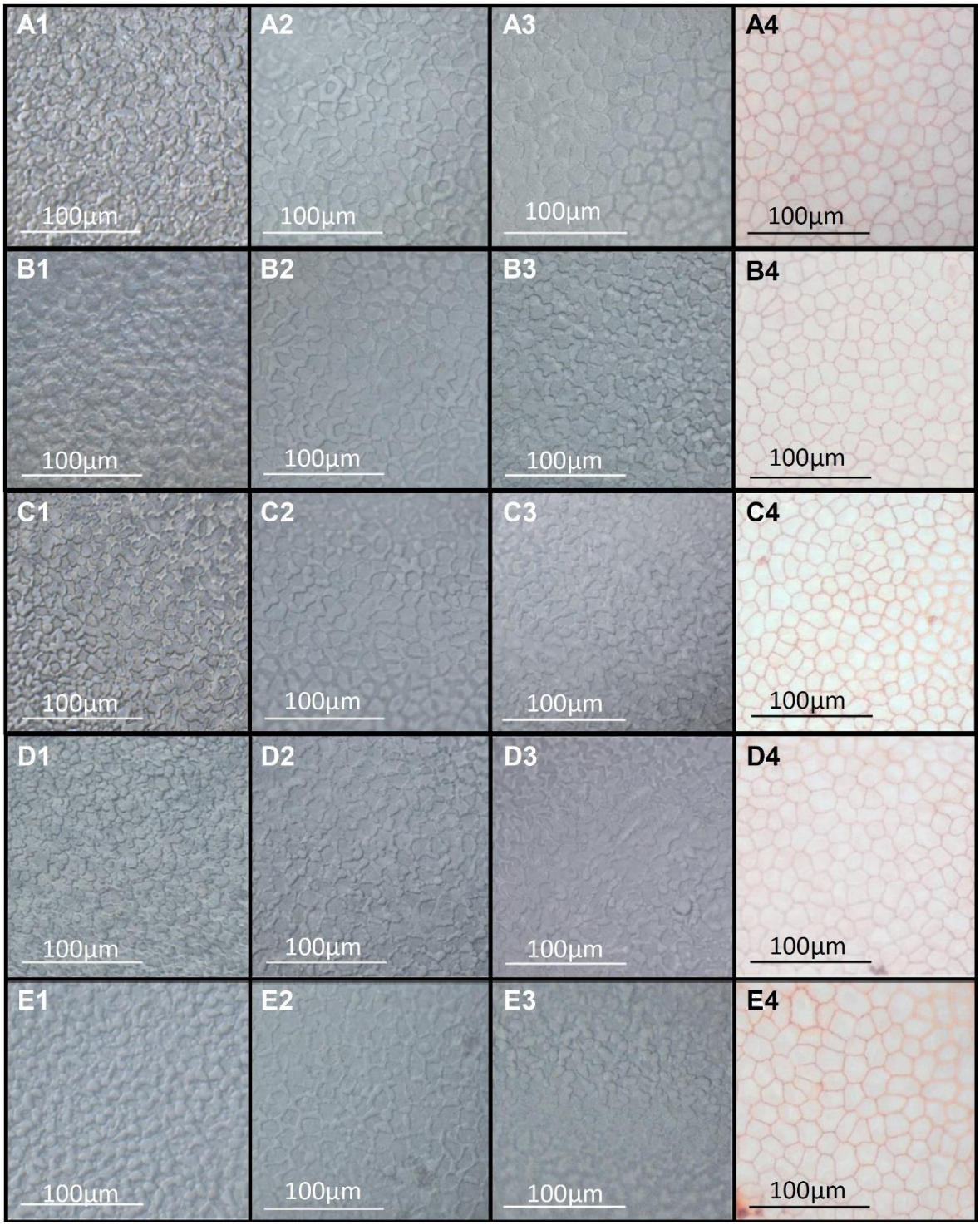

Abbildung 14 – Repräsentative Ausschnitte der „split corneal buttons“ an Tag 1 (d1; A1-E1, erste Spalte), Tag 8 (d8; A2-E2, zweite Spalte), Tag 15 (d15; A3-E3, dritte Spalte) und d15 nach Färbung ($d15_{stained}$; A4-E4, vierte Spalte) bei 400-facher Vergrößerung. Die Präparate wurden an d15 mit Trypanblau und Alizarinrot S gefärbt. Die Inkubation erfolgte an Tag 1 in BSS (A) bzw. F4H5 (Perfluorbutylpentan) für (B) 15 min, (C) 30 min, (D) 60min, (E) 120 min.

3.2 Morphologische Veränderungen durch Perfluorbutylpentan

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in allen anderen Inkubationsgruppen zeigte sich ein in der Fläche gut erhaltenes Endothel an Tag 15 (siehe Abbildung 14). Die morphologische Auswertung (Reformationsfiguren, Rosettenformationen, Alizarin-rote Areale) der gefärbten „split corneal buttons“ ergab ausschließlich für die Gruppen F4H5 60 min sowie F4H50 120 min statistisch signifikante Ergebnisse.

3.2.1 Reformationsfiguren

				95% Bootstrap CIs					
Groups	**n**	**Mean**	**SD**	**Lower**	**Upper**	**Median**	**Q25**	**Q75**	**p ***
control	15	0.055	0.028	0.042	0.069	0.052	0.028	0.072	-
F4H5 15 min	8	0.050	0.020	0.063	0.063	0.049	0.032	0.066	1.000
F4H5 30 min	8	0.062	0.025	0.046	0.078	0.058	0.042	0.085	1.000
F4H5 60 min	8	0.080	0.055	0.051	0.119	0.070	0.048	0.086	0.953
F4H5 120 min	8	0.112	0.040	0.086	0.138	0.105	0.093	0.139	**0.010**

* Mann-Whitney-U-Test adjusted for multiple comparisons with Bonferroni method

Tabelle 10 – Anteil der Reformationsfiguren (≥4 aufeinandertreffende Zellen anstatt drei Zellen (≙ hexagonales Zellbild). Die Inkubationsgruppe F4H5 120min (10,5 ± 1,2/3,4 % (Median ± 25%/75%-Quartil)) wies signifikant mehr (p = 0,010) Reformationsfiguren auf als die Kontrollgruppe (5,2 ± 2,8/2,0 %).

In den „split corneal buttons“ der Inkubationsgruppe F4H5 120min wurden signifikant mehr Reformationsfiguren (reformation figures; Aufeinandertreffen von ≥4 anstelle von drei Zellen (≙ hexagonales Zellbild); siehe Tabelle 10) gefunden. Während in der Gruppe F4H5 120min in 10,5 ± 1,2/3,4 % der Fälle ≥4 Zellen aufeinandertrafen, war dies in der Kontrollgruppe nur in 5,2 ± 2,8/2,0 % (Median ± 25%/75%-Quartil) der Fall (p = 0,010; siehe Tabelle 10 & Abbildung 15).

Alle weiteren Gruppen zeigten verglichen mit der Kontrollgruppe keine signifikant höhere Prävalenz an Reformationsfiguren auf (F4H5 15min: 4,9 ± 1,7/1,7 % - p = 1,000; F4H5 30min: 5,8 ± 1,6/2,7 % – p = 1,000; F4H5 60min: 7,0 ± 2,2/1,6 % - p = 0,953).

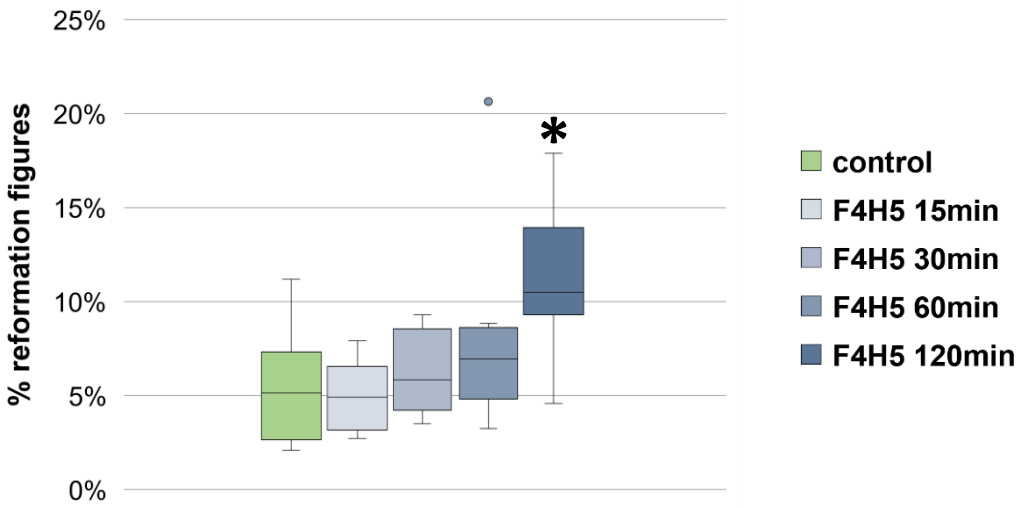

Abbildung 15 – Anteil der Reformationsfiguren (reformation figures) in Prozent in den verschiedenen Inkubationsgruppen. Reformationsfiguren entstehen bei Zellverlust, wenn anstelle von drei Zellgrenzen (≙ hexagonales Zellbild), ≥ 4 Zellgrenzen auf einem Punkt aufeinandertreffen. Die Inkubationsgruppe F4H5 120 min (dunkelstes blau) zeigte diesbezüglich signifikant (p = 0,010) mehr Reformationsfiguren/mm² als die Kontrollgruppe (grün). Box-Plots mit Whisker repräsentieren Minimum, Q25%, Median, Q75%, Maximum; Werte außerhalb des Interquartilsabstands (IQR) sind als Punkte dargestellt. * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p < 0,05).

3.2.2 Rosettenformationen

	95% Bootstrap CIs								
Groups	**n**	**Mean**	**SD**	**Lower**	**Upper**	**Median**	**Q25**	**Q75**	**p ***
control	15	10.556	9.165	6.25	14.60	8.333	0.000	16.667	-
F4H5 15min	8	10.265	5.807	6.16	14.40	8.212	8.212	16.425	1.000
F4H5 30min	8	20.366	9.737	14.30	26.50	20.366	14.257	26.476	0.640
F4H5 60min	8	27.573	14.160	19.10	37.10	25.452	16.968	36.057	0.006
F4H5 120min	8	29.827	15.108	21.30	40.50	25.566	17.044	36.219	0.002

* Mann-Whitney-U-Test adjusted for multiple comparisons with Bonferroni method

Tabelle 11 – Rosettenformationen. entspricht einer Ansammlung von Zellen, die radiär um eine zugrunde gehende Zelle angeordnet sind und so eine charakteristische Rosettenform annehmen. Die Inkubationsgruppen F4H5 60 min (25,452 ± 8,484/10,605 Rosetten/mm² - p = 0,006) und F4H5 120 min (25,566 ± 8,522/10,653 Rosetten/mm² - p = 0,002) wiesen signifikant mehr Rosettenformationen / mm² auf als die Kontrollgruppe (8,333 ± 0/8,334 Rosetten/mm²).

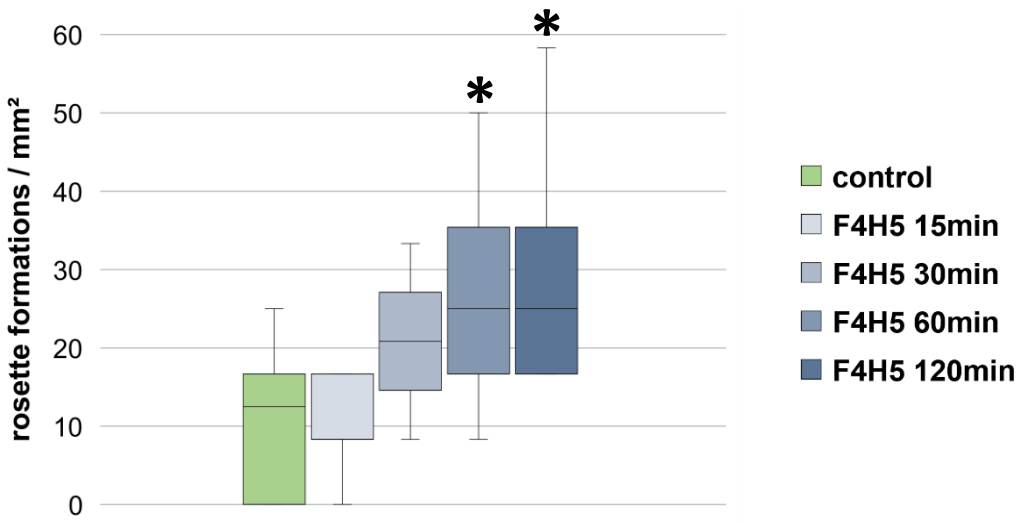

Abbildung 16 – Rosettenformationen. In den Gruppen F4H5 60 min (p = 0,006) und F4H5 120 min (p = 0,002) zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr Rosettenformationen (charakteristisches konzentrisches Aufeinandertreffen mehrerer Zellen auf einen Punkt in Form einer Rosette). Box-Plots mit Whisker repräsentieren Minimum, Q25%, Median, Q75%, Maximum. * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p < 0,05).

Die Inkubation von „split corneal buttons“ in F4H5 über eine Zeitspanne von 60 min (25,452 ± 8,484/10,605 Rosetten/mm² (Median ± 25%/75%-Quartil) - p = 0,006; siehe Tabelle 11 & Abbildung 16) oder 120min (25,566 ± 8,522/10,653 Rosetten/mm² - p = 0,002) führte verglichen mit der Kontrollgruppe (8,333 ± 0/8,334 Rosetten/mm²) zu signifikant vermehrtem Auftreten von Rosettenformationen (charakteristisches konzentrisches Aufeinandertreffen mehrerer Zellen auf einen Punkt in Form einer Rosette; siehe Abbildung 11). Die anderen Gruppen zeigten keine höhere Prävalenz an Rosettenformationen (F4H5 15 min: 8,212 ± 0/8,213 Rosetten/mm² - p = 1,000; F4H5 30 min: 20,366 ± 6,109/6,110 Rosetten/mm² - p = 0,640).

3.2.3 Alizarin-rote Areale

95% Bootstrap CIs									
Groups	**n**	**Mean**	**SD**	**Lower**	**Upper**	**Median**	**Q25**	**Q75**	**p ***
control	15	20.238	11.655	14.60	25.50	20.833	10.417	25.000	-
F4H5 15min	8	9.239	9.247	3.08	15.40	8.212	0.000	16.425	**0.043**
F4H5 30min	8	35.641	18.443	24.40	47.90	32.586	30.550	40.733	0.369
F4H5 60min	8	43.480	15.337	32.90	52.00	46.662	42.420	50.903	**0.007**
F4H5 120min	8	45.806	33.143	26.60	70.30	38.350	29.827	51.333	**0.049**

* Mann-Whitney-U-Test adjusted for multiple comparisons with Bonferroni method

Tabelle 12 – Alizarin-rote Areale als Zeichen von Zelltod. Bei zerstörten Endothelzellen wird durch Alizarinrot S die darunterliegende Descemet-Membran angefärbt. Die Gruppen F4H5 60 min (46,662 ± 4,242/4,241 Alizarin-rote Areale/mm² (Median ± 25%/75%-Quartil); p = 0,007) und 120 min (38,350 ± 8,523/12,983 Alizarin-rote Areale/mm²; p = 0,049) hatten mehr Alizarin-rote Areale/mm² an Tag 15 als die Kontrollgruppe (20,833 ± 10,416/4,167 Alizarin-rote Areale/mm²), die Gruppe F4H5 15min sogar weniger (8,212 ± 0/8,213 Alizarin-rote Areale/mm²; p = 0,043).

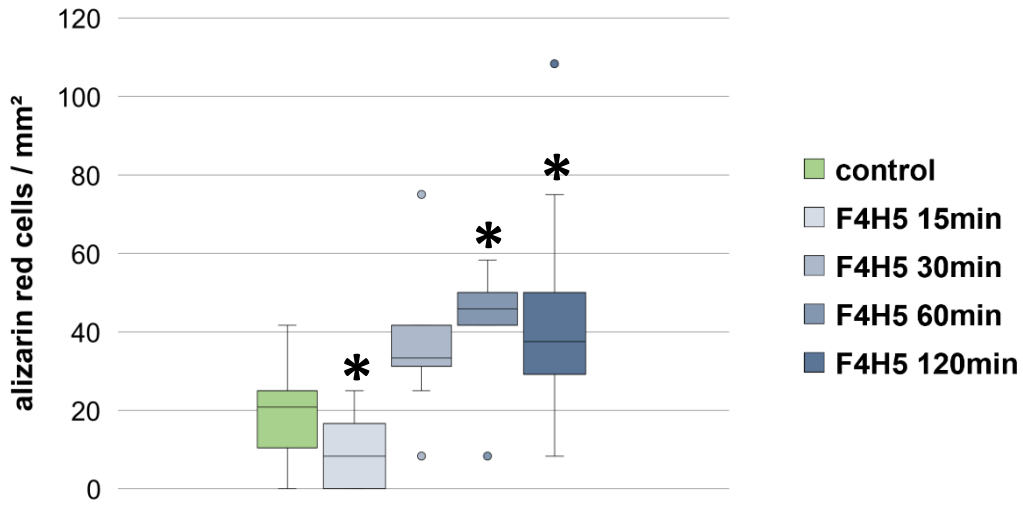

Abbildung 17 – Alizarin-rote Areale. Entspricht Zellen, die zum Kontrollzeitpunkt zerstört sind. Die Gruppen F4H5 60min (46,662 ± 4,242/4,241 Alizarin-rote Areale/mm² (Median ± 25%/75%-Quartil); p = 0,007) und F4H5 120 min (38,350 ± 8,523/12,983 Alizarin-rote Areale/mm²; p = 0,049) hatten signifikant mehr Alizarin-rote Areale/mm² als die Kontrollgruppe 20,833 ± 10,416/4,167 Alizarin-rote Areale/mm². Die Gruppe F4H5 15 min (8,212 ± 0/8,213 Alizarin-rote Areale/mm²; p = 0,043) wies hingegen weniger auf. Box-Plots mit Whisker repräsentieren Minimum, Q25%, Median, Q75%, Maximum; Werte außerhalb des Interquartilsabstands (IQR) sind als Punkte dargestellt. * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p < 0,05).

Nach der Inkubation der „split corneal buttons“ in F4H5 für 60 min (46,662 ± 4,242/4,241 Alizarin-rote Areale/mm² (Median ± 25%/75%-Quartil); p = 0,007; siehe Tabelle 12 & Abbildung 17) sowie 120 min (38,350 ± 8,523/12,983 Alizarin-rote Areale/mm²; p = 0,049) zeigten die Präparate im Vergleich zur Kontrollgruppe (20,833 ± 10,416/4,167 Alizarin-rote Areale/mm²) signifikant mehr Alizarin-rote (zerstörte) Zellen.

In der Gruppe F4H5 15 min wurden signifikant weniger Alizarin-rote Areale/mm² gefunden (8,212 ± 0/8,213 Alizarin-rote Areale/mm²; p = 0,043). Die Präparate, die für 30 min in Kontakt mit F4H5 waren, unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

3.3 Einfluss der Färbung auf das Ergebnis der Endothelzelldichte

Zur Auszählung der gefärbten Zellen wurden die identischen Hornhaut-Präparate verwendet, die auch zur Testung von F4H5 dienten. Die Auszählung erfolgte somit an Tag 15 post-mortem bzw. nach Präparation. Verglichen wurden die Zellzählung der ECD der „split corneal buttons“ vor Färbung in hBSS mit den identischen Präparaten nach Färbung mit Trypanblau und Alizarinrot S. Ein Vergleich wurde ausschließlich innerhalb der Gruppen (z.B. Vergleich der Kontrollgruppe: ECD in hBSS (unstained) vs. nach Färbung mit Trypanblau und Alizarinrot S (stained)).

			95% Bootstrap CIs							
Groups	**Staining**	**n**	**Mean**	**SD**	**Lower**	**Upper**	**Median**	**Q25**	**Q75**	**p ***
control	Unstained	15	3724	323	3570	3880	3700	3533	3958	1,000
	Stained	15	3720	416	3520	3920	3733	3542	4050	
F4H5 15min	Unstained	8	3833	155	3740	3940	3792	3763	3912	1,000
	Stained	8	3746	358	3520	3990	3650	3538	3979	
F4H5 30min	Unstained	8	3873	279	3690	4050	3925	3592	4067	0,112
	Stained	8	4023	251	3860	4190	4050	3813	4167	
F4H5 60min	Unstained	8	3473	281	3270	3630	3542	3425	3658	1,000
	Stained	8	3494	440	3170	3730	3600	3463	3642	
F4H5 120min	Unstained	8	3292	156	3200	3400	3208	3167	3425	0,977
	Stained	8	3119	298	2900	3300	3200	2967	3342	

* Wilcoxon-Signed-Rank-Test adjusted for multiple comparisons with Bonferroni method

Tabelle 13 – Vergleich der Zählmethoden (ungefärbt vs. gefärbt). Die Auszählung nach Färbung ergab keine signifikant variierenden Ergebnisse.

Der quantitative Vergleich der ungefärbten mit der gefärbten (Trypanblau und Alizarinrot S) Zählmethode ergab in keiner der Gruppen signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 12; $control_{unstained}$ (n = 15) 3700 ± 168/258 Zellen/mm² vs. $control_{stained}$ 3733 ± 191/317 Zellen/mm² - p = 1.000 (Median ± 25%/75%-Quartil); F4H5 $15min_{unstained}$ 3792 ± 29/120 Zellen/mm² vs. F4H5 $15min_{stained}$ 3650 ± 112/329 Zellen/mm² - p = 1.000; F4H5 $30min_{unstained}$ ± 333/142 Zellen/mm² vs. F4H5 $30min_{stained}$ 4050 ± 237/117 Zellen/mm² - p = 0.112; F4H5 $60min_{unstained}$ 3542 ± 117/116 Zellen/mm² vs. F4H5 $60min_{stained}$ 3600 ± 137/42 Zellen/mm² - p = 1.000; F4H5 $120min_{unstained}$ 3208 ± 41/217 Zellen/mm² vs. F4H5 $120min_{stained}$ 3200 ± 233/142 Zellen/mm² - p = 0.977). Eine Färbung hatte in den durchgeführten Experimenten dementsprechend keinen signifikanten Einfluss auf das Resultat der ECD-Bestimmung (siehe Tabelle 13 und Abbildung 18).

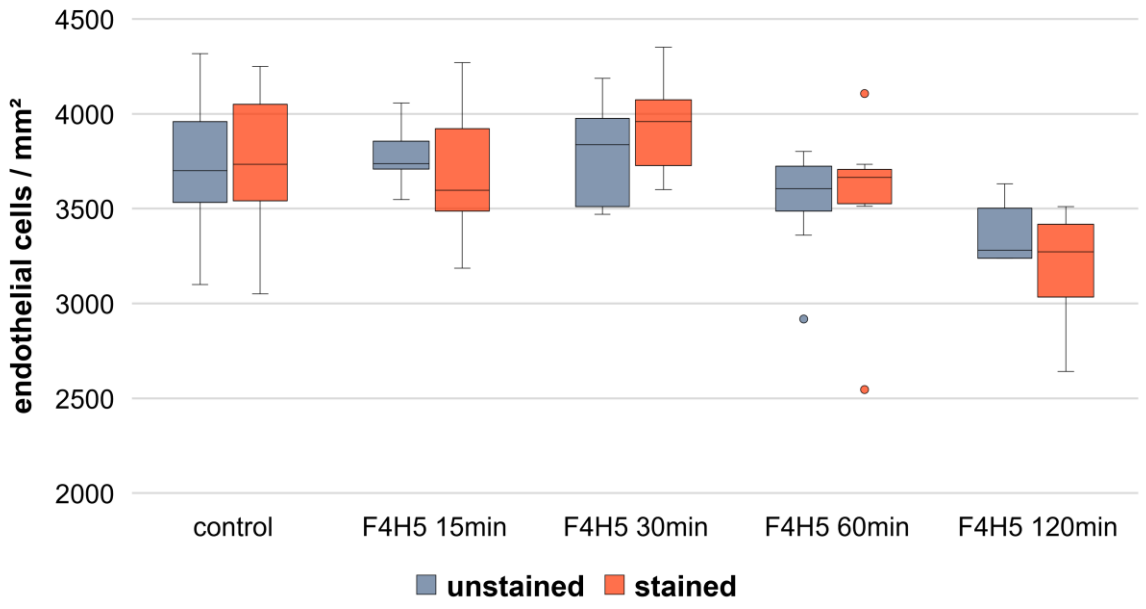

Abbildung 18 – Quantitativer Vergleich der Auszählung der Endothelzelldichte ungefärbter (blau) und gefärbter (rot) „split corneal buttons“ in den jeweiligen Inkubationsgruppen. Die Färbung erfolgte mit Trypanblau und Alizarinrot S. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der ECD-Zählung innerhalb der Inkubationsgruppen ohne (unstained) bzw. mit (stained) Färbung. Box-Plots mit Whisker repräsentieren Minimum, Q25%, Median, Q75%, Maximum; Werte außerhalb des Interquartilsabstands (IQR) sind als Punkte dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Anwendung von Perfluorbutylpentan zur Silikonöl-Entfernung

Perfluorbutylpentan (F4H5) wird als chemisch und physikalisch inerte Substanz aus der Klasse der semifluorierten Alkane (SFAs) angesehen und erfährt durch seine amphiphilen Eigenschaften große Aufmerksamkeit bezüglich der Entfernung von „sticky silicone oil“ und emulsifiziertem Silikonöl aus dem Auge (Meinert & Roy 2000; Liang et al. 2008; Stappler et al. 2010; Coppola et al. 2017; Chan et al. 2018).

„Sticky silicone oil“, das bei Kontakt von Silikonöl mit PFCLs entsteht, kann sich an Netzhaut oder IOLs festsetzen und folglich Sehbeeinträchtigungen verursachen (Batterbury et al. 1994; Bartz-Schmidt et al. 1995; Kusaka et al. 1996; Apple et al. 1996; Arthur et al. 2001; McLoone et al. 2001; Yaman et al. 2007; Dresp & Menz 2007; Veckeneer et al. 2008; Romano et al. 2012; H. H. Ghoraba et al. 2017). Die mechanische Entfernung ist meist erfolglos und kann weitere Komplikationen hervorrufen, sodass lange Zeit oft nur der Austausch der IOL zielführend war (Bartz-Schmidt et al. 1995; Kusaka et al. 1996; H. H. Ghoraba et al. 2017).

Perfluorhexyloctan (F6H8) schien hier zunächst eine vielversprechende Lösung zu liefern, jedoch erwies sich F6H8 im Vergleich zu F4H5 nicht nur als ineffektiv, sondern zeigte auch klare Toxizitätszeichen (Langefeld et al. 1999; Dick & Augustin 2000; Mackiewicz, Mühling, et al. 2007). Insgesamt weisen SFAs mit einer im Verhältnis längeren Hydrocarbon-Kette eine höhere Toxizität auf, dennoch wurde auch nach Anwendung von F6H8 signifikanter Schaden an in vitro Zellkulturen (ARPE-19, rMC-1, HCEC), als auch eine deutliche Entzündungsreaktion in vivo berichtet (Mertens et al. 2002; Vote et al. 2003; Mackiewicz, Mühling, et al. 2007; Martinez-Reina et al. 2009; Chan et al. 2018).

F4H5 hingegen zeigte bisher nicht nur eine höhere Effektivität in der Entfernung von Silikonöl, sondern scheint auch eine weitaus bessere Biokompatibilität zu besitzen, da bisher keinerlei Anzeichen einer Toxizität beobachtet wurden (Mackiewicz, Mühling, et al. 2007; Liang et al. 2008; Stappler et al. 2010; Rizzo et al. 2011; Stalmans et al. 2015; Coppola et al. 2017; Chan et al. 2018). Die höhere Effektivität in der Lösung von Silikonöl durch F4H5 im Vergleich zu F6H8 lässt sich gegebenenfalls durch die geringe Lipophilie von F4H5 und folglich amphiphileren

Eigenschaften erklären, was zu einer verbesserten Vermittlung zwischen Silikonöl und F4H5 bzw. lipophobem Wasser führt und folglich eine leichtere Entfernung erlaubt (Liang et al. 2008).

Nichtdestodrotz wurden die Auswirkungen von F4H5 auf corneale Endothelzellen bisher nicht untersucht. Da F4H5 aber durchaus in die Augenvorderkammer gelangen kann, sei es unbeabsichtigt im Rahmen von Eingriffen im hinteren Augenabschnitt oder im Rahmen einer Spülung der Augenvorderkammer zur Entfernung von emulsifiziertem Silikonöl bzw. „sticky silicone oil“, ist es durchaus relevant die Effekte auf das Hornhautendothel zu kennen. Da die Effekte auf das Hornhautendothel bisher nicht untersucht wurden, kann eine Spülung des vorderen Segments nur im Rahmen eines off-label-use stattfinden. Diese Arbeit hat anhand von „split corneal buttons“ die Auswirkungen der Anwendung von F4H5 auf corneale Endothelzellen untersucht.

4.2 Auswirkungen von Perfluorbutylpentan auf das corneale Endothel

Sechzig „split corneal buttons“ wurden aus Schweineaugen präpariert und in BSS (Kontrolle) bzw. unterschiedlich lang in F4H5 (15, 30, 60, 120 min) inkubiert. Nach 15-tägiger Kultivierung wurde die ECD sowie morphologische Veränderungen (Reformationsfiguren, Rosettenformationen, Alizarin-rote Areale) quantitativ ausgewertet. Die erhobenen ECD- und morphologischen Analysen wurden als indirekter Marker für eine eventuelle Toxizität von F4H5 verwendet.

4.2.1 Auswirkungen von Perfluorbutylpentan auf die Endothelzelldichte

Alle Inkubationsgruppen zeigten zu jedem Zeitpunkt der Auswertung eine durchgehende Endothelzellschicht ohne flächenartige Endothelschäden (repräsentative Ausschnitte siehe Abbildung 14, A1-E4). Die ECD-Abnahmerate in den „split corneal buttons“ der Kontrollgruppe (control) war annähernd linear (-4,7 %/Woche) und damit vergleichbar mit der Abnahmerate früherer Publikationen mit „split corneal buttons“ bzw. kultivierten menschlichen Hornhäuten (siehe Tabelle 14

(Pels & Schuchard 1983; Borderie et al. 1995; Linke et al. 2013; Kunzmann et al. 2018)). Ein Abfall von ca. 10% in zwei Wochen kann damit als „physiologischer“ Zellverlust unter den angewandten Kulturbedingungen angesehen werden. Der lineare Abfall spricht für ein stabiles Kulturmodell und ist essenziell für eine verlässliche Aussage bezüglich der Verträglichkeit von F4H5. Zum Vergleich nimmt die ECD in vivo im Erwachsenenalter durchschnittlich mit einer Rate zwischen 0,3 %/Jahr (Moller-Pederson 1997; Hollingsworth et al. 2001; Filev et al. 2018) und 0,6 %/Jahr ab (Murphy et al. 1984; Bourne & Nelson 1997).

Studie	Mensch/Schwein	Zellverlust/Woche*
Pels & Schuchard (1983)	Mensch	-5,0%
Borderie et al. (1995)	Mensch	-4,7%
Linke et al. (2013)	Mensch	-5,7%
Kunzmann et al. (2018)	Schwein („split corneal buttons“)	-5,1%
diese Arbeit	Schwein („split corneal buttons”), control (BSS) bzw. “no BSS”	-4,7% bzw. -4,9%

Tabelle 14 – Prozentualer Endothelzellverlust. Verglichen werden Studien mit kultivierten menschlichen Hornhäuten und kultivierten Schweinehornhäuten.

*****Wo kein Verlust/Woche angeben war, wurde der Zellverlust auf eine Woche extrapoliert. Anderenfalls wurde die Verlustrate/Woche verwendet. Dabei wurde von einem linearen Verlust der Endothelzellen in dieser Zeit ausgegangen (Angaben als Mittelwert)

Die Inkubation der Hornhautpräparate in F4H5 für 15min, 30min und 60min verursachte weder an Tag 8 noch an Tag 15 eine signifikant von der Kontrollgruppe abweichende ECD (p = 1,000). In der Gruppe F4H5 120min hingegen zeigte sich ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höherer Verlust an Endothelzellen an Tag 15 (p = 0,046). Bereits an Tag 8 konnte in dieser Gruppe eine nicht-signifikante Tendenz in diese Richtung beobachtet werden (p = 0,092). Dieses Ergebnis spiegelt sich ebenfalls im absoluten und prozentualen Endothelzellverlust wider, der für die Inkubationsgruppe F4H5 120min im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 15 Tagen mehr als doppelt so hoch ausfiel (control: -316,67 ± 125,00/70,84 Zellen/mm² (-9,48 ± 1,48/3,55 %) vs. F4H5 120min: -681,77 ± 174,70/123,57 Zellen/mm² (-20,12 ± 0,73/6,27 %). Zwar wies die Gruppe F4H5 60min keine signifikant abweichenden Endothelzellverluste in Bezug zur Kontrollgruppe, jedoch zeigten sich einige Auffälligkeiten in der morphologischen Analyse, sodass ein negativer Einfluss von F4H5 auf das Endothel nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann (siehe unten).

Aus den erzielten Ergebnissen lässt sich dementsprechend eine zeitabhängige Komponente bezogen auf die Inkubationszeit erkennen. Je länger die Inkubation in F4H5, desto höher der Endothelzellverlust. Auffällig ist zudem, insbesondere in der Gruppe F4H5 120min der absolute Endothelzellverlust in der ersten Woche höher ist (-409,06 ± 178,97/72,44 Zellen/mm²), als in der zweiten Woche (-315,32 ± 102,26/204,53 Zellen/mm²), was gegebenenfalls für eine direkte toxische Wirkung am Inkubationstag spricht. Apoptose und Reorganisationsmechanismen der Endothelzellen in der darauffolgenden Zeit (d8 bis d15), um etwaige entstandene Lücken aufzufüllen, könnten für die anhaltend-erhöhte ECD-Abnahmerate verantwortlich sein. Eine genaue Ursachenklärung lässt sich anhand des verwendeten Hornhautmodells leider nicht eindeutig betreiben. Bei kürzerer Inkubation ist der oben beschriebener Verlauf der ECD hingegen jedoch nicht in gleicherweise zu beobachten, sodass die genaue Ursache der Ergebnisse unklar bleibt. Andere indirekte Auswirkungen von F4H5 können nicht ausgeschlossen werden und müssen ebenfalls in Betracht gezogen werden (siehe Diskussion unten).

4.2.2 Auswirkungen von Perfluorbutylpentan auf die Zell-Morphologie

Die Ergebnisse der morphologischen Auswertung unterstützen die Ergebnisse der ECD. Hier zeigten sich zudem auch in der Inkubationsgruppe F4H5 60min im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl signifikant mehr Rosettenformationen (control; 8,333 ± 0/8,334 Rosetten/mm² vs. F4H5 60min (25,452 ± 8,484/10,605 Rosetten/mm², p = 0,006) als auch Alizarin-rote Areale (control: 20,833 ± 10,416/4,167 Alizarin-rote Areale/mm²; F4H5 60min 46,662 ± 4,242/4,241 Alizarin-rote Areale/mm², p = 0,007). Die Gruppe F4H5 120min zeigte für alle drei angewandten morphologischen Parameter ein signifikant höheres Auftreten (10,5 ± 1,2/3,4 % Reformationsfiguren, p = 0,010; 25,566 ± 8,522/10,653 Rosetten/mm², p = 0,002; 38,350 ± 8,523/12,983 Alizarin-rote Areale/mm², p = 0,049). Da Alizarin-rote Areale als Zeichen für direkten Zelluntergang und Rosetten- und Reformationszeichen für Reorganisationsvorgänge sprechen, sind diese Resultate mit den oben beschriebenen ECD-Verlusten vereinbar. Insbesondere in der Gruppe F4H5 120min zeigten sich die Reorganisationsvorgänge nicht nur in

Reformationsfiguren und Rosettenformationen auch in einer sichtbaren Vergrößerung der verbliebenen Endothelzellen (siehe Abbildung 14, E4).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf einen zeitabhängigen Einfluss von F4H5 mit fraglichem Schaden nach 60 min Inkubation in F4H5 (nur signifikante morphologische Veränderungen) und signifikantem Schaden nach 120 min Inkubation in F4H5 (signifikanter ECD-Verlust und morphologische Veränderungen). Die Anwendungszeit von F4H5 liegt in der klinischen Praxis deutlich unterhalb der Inkubationszeit von 60 Minuten. F4H5 wird zur Entfernung von „sticky silicone oil“ oder emulsifiziertem Silikonöl genutzt. Nach ein- oder mehrfacher Injektion von F4H5 wird das Auge mit anderen Spüllösungen gespült, sodass F4H5 in der Regel vollständig entfernt wird. Dementsprechend liegt die tatsächliche Expositionszeit des Endothels gegenüber F4H5 in der Regel bei einigen Minuten und nur unter seltenen Umständen bei einer Zeit von über 30 Minuten. Innerhalb dieser Zeitspanne konnten keinerlei schädigende Effekte bei den follow-up-Untersuchungen nach einer bzw. zwei Wochen nachgewiesen werden.

4.2.3 Interpretation der Ergebnisse

Bisher gibt es keine veröffentlichten Untersuchungen der Auswirkungen von Perfluorbutylpentan auf Hornhautendothelzellen. Im Folgenden sollen mögliche Ursachen der erzielten Ergebnisse, auch basierend auf bisherigen Beobachtungen anderer Substanzen, diskutiert werden.

Spezifisches Gewicht

Perfluorbutylpentan (F4H5) hat ein spezifisches Gewicht von 1,284 g/cm³ (bei 25 °C) (Mackiewicz, Mühling, et al. 2007), womit es nahezu 30 % über dem spezifischen Gewicht von Wasser (1,0 g/cm³) liegt. Da der Hauptbestandteil von Endothelzellen Wasser ist, scheint eine rein mechanische Schädigung durch Kompression der Zellen aufgrund des höheren spezifischen Gewichts von F4H5 durchaus möglich zu sein. Der Zusammenhang zwischen eines höheren spezifischen Gewichts einer Substanz, die eine Schädigung von Zellen hervorruft,

wurde bereits für PFCLs diskutiert (Mertens et al. 2002). Die im Rahmen der Therapie von Netzhautablösungen häufig eingesetzte PPV impliziert meist auch die Verwendung von PFCLs zum Wiederanlegen der Retina, wobei insbesondere die beiden Substanzen PFO (spez. Gewicht: 1,78 g/cm³) und PFD (1,92 g/cm³) verwendet werden (Mathis et al. 1992; Brazitikos et al. 2003). Beide Substanzen haben ein deutlich höheres spezifisches Gewicht als SFAs (Hoerauf et al. 2002) und damit insbesondere auch als F6H8 und F4H5 (siehe Abbildung 19). Verschiedene Studien zeigten, dass PFCLs in vitro und in vivo neben einer Schädigung der Retina auch zu signifikanten Verlusten der ECD führen (Moreira et al. 1992; Wilbanks et al. 1996; Stolba et al. 1997; Mertens et al. 2000; Mertens et al. 2002; Stolba et al. 2004). Ebenso spricht die Tatsache, dass vorwiegend inferiore retinale Abschnitte von PFCLs geschädigt werden, für einen negativen Einfluss des höheren spezifischen Gewichts, der auch für eine Schädigung des Endothels in Frage kommt (Orzalesi et al. 1998; Mertens et al. 2000; Stolba et al. 2004).

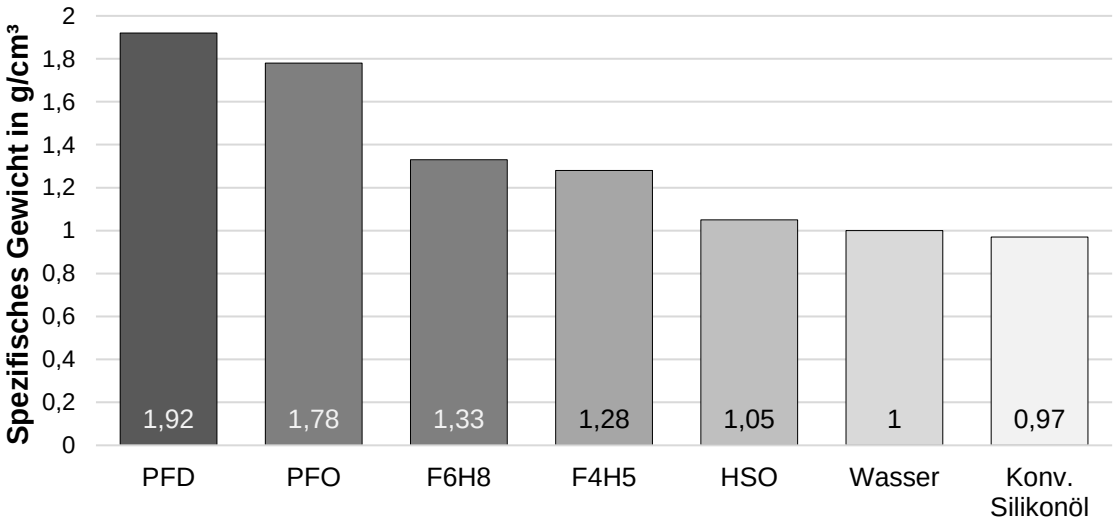

Abbildung 19 - Übersicht über das spezifische Gewicht erwähnter Substanzen (Meinert & Roy 2000; Cazabon et al. 2011; Vaziri et al. 2016)**.**

Konklusiv scheint dieser Schädigungsmechanismus also auch durch das im Vergleich zu Wasser höhere Gewicht von F4H5 zu sein. F4H5 hat zwar ein geringeres spezifisches Gewicht als PFCLs, sodass die mechanische Schädigung in der Theorie zwar geringer ausfallen sollte, jedoch nicht auszuschließen ist. Weitere Untersuchungen dieses Aspektes könnten hier weitere Erkenntnisse liefern.

Strukturchemisch unterscheiden sich F4H5 und F6H8 ausschließlich durch die Länge der jeweiligen Seitenketten. F6H8 ist mit einem spezifischen Gewicht von 1,35 g/cm³ etwas schwerer als F4H5 (1,284 g/cm³). Schatz et al. (2004) beobachten nach Verwendung einer F6H8-Tampoande neben einem Hornhautödem auch degenerative Veränderungen des Hornhautendothels. Andere Studien hingegen fanden keine Hinweise auf Veränderungen des Endothels oder der Hornhauttransparenz nach direktem Kontakt zwischen F6H8 und dem Hornhautendothel im Tierexperiment (Kaninchen) bzw. am Patienten (Zeana et al. 1999; Kirchhof et al. 2002). Allerdings wurde in der Studie von Zeana et al. (1999) von einer vorübergehenden postoperativen Verdickung der Hornhaut berichtet, sodass eine leichte Schädigung des cornealen Endothels nicht ausgeschlossen werden konnte. Eine chinesische Studie berichtete zudem vier Wochen nach Injektion von 0,15 ml F6H8 in die Augenvorderkammer von Kaninchen vermehrten Endothelzell-Polymorphismus und -Polymegathismus festgestellt zu haben (Ding et al. 2001). Dies ist deutlich länger, als die 120 Minuten, die in der vorliegenden Arbeit Schäden verursachten. Jedoch sollte hier berücksichtigt werden, dass das Hornhautendothel von Kaninchen regenerative Kapazitäten besitzt (Horn et al. 1977). Aufgrund teils widersprüchlicher Ergebnisse lassen sich für diesen Aspekt insgesamt nur bedingt Rückschlüsse auf die Auswirkungen des spezifischen Gewichts von F4H5 auf das Hornhautendothel ziehen.

Chemische Eigenschaften von F4H5 und Interaktion mit zellulären Strukturen

Gegen die alleinige Ursache eines schädigenden Einflusses aufgrund eines höheren spezifischen Gewichts der oben erwähnten Substanzen sprechen die Beobachtungen von Mertens et al. (2002). Die Autoren beobachteten höhere Zellverluste in Zellkulturen (HCEC, RPE) nach Inkubation im leichteren F6H8 (1,33 g/cm³) als nach Inkubation im schweren PFD (1,92 g/cm³). Folglich scheinen auch andere Faktoren, die beispielsweise auf einer chemischen Interaktion der F4H5-Moleküle mit zellulären bzw. membranösen Bestandteilen (zum Beispiel Lipoproteine), als schädigender Einfluss in Frage zu kommen.

Schon seit längerer Zeit ist zudem unumstritten, dass Silikonöl nach Kontakt mit dem Hornhautendothel Schäden hervorruft und es zur endothelialen Dekompensation kommen kann (Sternberg et al. 1985; Federman & Schubert 1988;

Szaflik & Kmera-Muszyńska 2007). Die genauen Mechanismen dieser Beobachtung sind jedoch noch immer ungeklärt. Da konventionelles Silikonöl leichter als Wasser ist, spielt auch hier eine mechanisch-vermittelter Schaden in Abhängigkeit zum spezifischen Gewichts sicherlich keine Rolle (Barca et al. 2014). Möglicherweise treffen die beim Silikonöl vorliegenden Mechanismen aber ebenfalls auf SFAs zu.

Die physikochemischen Eigenschaften von SFAs beruhen insbesondere auf der Länge der beiden Seitenketten. Je länger die Fluorcarbon-Kette, desto hydrophiler bzw. je länger die Kohlenwasserstoff-Kette desto hydrophober die Substanz. Entscheidend ist zudem das Verhältnis der beiden Ketten zueinander. Möglicherweise ist die geringere Lipophilie (im Verhältnis kürzere H-Kette) ein Grund dafür, warum F4H5 eine höhere Biokompatibilität als andere SFAs besitzt. SFAs mit einem Verhältnis der beiden Seitenketten zugunsten der H-Kette (z.B. F4H6, Ratio 1:1,5; F4H8, Ratio 1:2), induzierten eine sehr starke Entzündungsreaktion in Form einer massiven Leukozyten-Infiltration ins Auge und verursachten messbare retinale Schäden. SFAs mit einem ausgeglichenerem Verhältnis zugunsten der F-Kette hingegen verursachten nur eine geringe (F6H8; Ratio 1:1,33) bis keine (F4H5 (Ratio 1:1,25)) Inflammation (Mackiewicz, Mühling, et al. 2007).

Schließlich sind die Mechanismen, die eine Immunantwort induzieren, nicht bekannt. Die vermehrte Inflammation scheint aber mit den lipophilen Eigenschaften einiger SFAs zusammenzuhänge. Eine derartige Inflammation erfordert entweder eine Reizung intraokularer Strukturen oder gar eine direkte Aktivierung des Immunsystems durch die körperfremde Molekülstruktur. Da in in-vitro-Systemen, also ohne die Anwesenheit eines Immunsystems, ebenfalls eine Schädigung von Zellkulturen (ARPE-19, rMC-1, HCECs) beobachtet wurde, ist primär von einer direkten Zellschädigung auszugehen, die darauffolgend wahrscheinlich erst sekundär zu einer Inflammationsreaktion führt (Mertens et al. 2002; Chan et al. 2018).

Neben der Möglichkeit einer Reizung von intraokularen Strukturen durch SFAs sollte auch an eventuelle Interaktionen mit zellulären Strukturen der Lipiddoppelschicht, Glykoproteinen oder anderen Oberflächenmolekülen (Na^+-K^+-ATPase, Membrantransporter) der endothelialen Zellmembran gedacht werden. Für

diverse Substanzen (Insulin, Dexamethason etc.) ist beispielsweise eine Interaktion mit der endothelialen Na^+-K^+-ATPase bekannt (Hatou et al. 2009; Hatou et al. 2010). Eine Interaktion mit zellulären Membranbestandteilen durch die eher lipophilen/hydrophoben Eigenschaften von F4H5/F6H8 scheinen daher prinzipiell möglich (Mertens et al. 2002). Da F4H5 einen weniger lipophilen Charakter als F6H8 aufweist, wären ähnliche Effekte zwar möglich, allerdings sicherlich auch hier weniger stark ausgeprägt. Weitere experimentelle Studien sind notwendig, um diesbezüglich weitere Erkenntnisse über eventuelle Interaktionen mit zellulären Oberflächenstrukturen von Endothelzellen zu liefern.

Adhärenz von F4H5 an den „Split Corneal Buttons“

Da die „split corneal buttons“ in direktem Kontakt zu F4H5 waren, wäre es prinzipiell denkbar, dass F4H5-Moleküle über eine längere Zeit an den „split corneal buttons“ anhafteten und so gegebenenfalls einen prolongierten negativen Einfluss auf das Endothel ausübte. Wie jedoch beschrieben (siehe Materialien und Methoden), wurden die Präparate nach Inkubation in F4H5 bzw. BSS (control) dreifach mit BSS gespült. Während nach der ersten Runde makroskopisch noch einige F4H5-Tröpfchen in der Spülflüssigkeit sichtbar waren, waren bereits nach der zweiten Spülung keine sichtbaren Tröpfchen mehr vorhanden.

Sicherlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch einzelne Moleküle an den Präparaten hafteten. Dabei würde sich allerdings eher in allen Inkubationsgruppen ein in ähnlicher Weise stattfindender ECD-Verlust zeigen, insbesondere auch in der zweiten Woche. Vor allem in der Gruppe F4H5 120 min, die als einzige signifikante ECD-Verluste erlitt, zeigt sich aber der hauptsächliche ECD-Verlust in der ersten Woche und sinkt dann in der zweiten Woche. In den anderen Gruppen ist kein klar erkennbares Muster vorhanden, welches den überwiegenden ECD-Verlust eher der ersten oder zweiten Woche zuordnen ließe. Zweifellos ist die dreifache Spülung von F4H5 am nächsten an der klinischen Anwendung von F4H5. Anders als in der klinischen Praxis war in den durchgeführten Experimenten allerdings auch das Stroma in direktem Kontakt mit F4H5. Da die Präparate sich zwischen Präparation und Inkubation in F4H5 für 24 h in Kulturmedium befanden, beobachteten wir eine leichte Schwellung (Hydration) des Stromas vor der Inkubation in F4H5. Aufgrund von hydrophilen Molekülen, schwillt das Stroma in wässrigen Lösungen stark an.

Da F4H5 jedoch auch hydrophobe Anteile hat, scheint es insgesamt unwahrscheinlich, dass einzelne Moleküle in tiefere Schichten oder gar bis zur Descemet-Membran vorgedrungen sind, diese dort geschädigt haben und so einen negativen Einfluss auf die ECD hatten. Wäre F4H5 bis ins Stroma vorgedrungen, wäre ein kontinuierlicher Effekt in allen Gruppen wahrscheinlicher als der beobachtete eher von der Inkubationszeit abhängige Effekt. Ebenfalls wären eventuelle F4H5-Tröpfchen innerhalb des Stromas bei der Begutachtung der verschiedenen Schichten der „split corneal buttons“ unter dem Mikroskop aufgefallen. Das Gegenteil war der Fall, da sich die Keratozyten und das Stroma in unveränderter Morphologie ohne die Anwesenheit von Vakuolen oder anderen Auffälligkeiten zeigten.

Versiegelung des Endothels durch F4H5

Eine weitere Überlegung ist die Möglichkeit einer Versiegelung des Endothels durch F4H5. Das sonst an das Endothel angrenzende Kammerwasser unterscheidet sich grundlegend von F4H5. Kammerwasser nimmt zelluläre Moleküle und Substanzen auf, transportiert Zellabfälle ab und liefert dem Endothel Nährstoffe, puffert Elektrolyte ab und dient zudem der Aufrechterhaltung der Homöostase von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid. Liegt nun F4H5 direkt dem Endothel auf, so sind unter Umständen alle genannten Prozesse gestört, was zur Beeinträchtigung des Nährstoffaustauschs, zur Akkumulation von Zellabfällen und zu einer fehlenden Pufferung von Elektrolyten führen würde. Folglich würde dies zu zellulärem Stress und ab einem gewissen Punkt zur Apoptose oder Zelltod der Endothelzellen führen.

Bei einer durch F4H5 hervorgerufenen Versiegelung des Endothels käme es zu einem Disäquilibrium der intra- und extrazellulären Elektrolytkonzentrationen. Insbesondere ein Anstieg von Kalium zwischen Retina und PFCL- und F6H8-Glaskörpertamponaden wurde in diesem Zusammenhang bereits diskutiert (Meinert & Roy 2000; Winter et al. 2000; Mackiewicz, Maaijwee, et al. 2007). Die Tamponaden können aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften die Ionen nicht abpuffern, was unter Umständen zu Schäden retinaler Zellen führt. Bekanntermaßen werden physiologisch insbesondere Kalium-Ionen von retinalen Zellen in den Glaskörper abgegeben (Newman 1987; Winter et al. 2000).

Obwohl Silikonöl ebenfalls als Barriere agiert, bildet sich aufgrund der astartigen Struktur von Silikonöl (Si-O-Si-Segmenten) ein dünner Flüssigkeitsfilm zwischen Retina und Tamponade, welcher ausreicht, um einen Anstieg der Kalium-Konzentration zu verhindern (Mackiewicz, Maaijwee, et al. 2007; Scheerlinck et al. 2016; H. H. . Ghoraba et al. 2017) Im Gegensatz dazu haben PFCLs und SFAs eine eher lineare Struktur, was sie zu einer kompakteren Substanz macht. Zwischen Retina und Tamponade kann sich daher kein Flüssigkeitsfilm bilden, wodurch eine Elektrolytpufferung behindert wird und zu einem potenziell schädigenden Ungleichgewicht führt. Steigt die Kaliumkonzentration zu sehr an, kommt es zu einer erhöhten Aktivität der Na^+-K^+-ATPase, was wiederum in metabolischem Stress und gegebenenfalls zum konsekutiven Zelltod führen könnte (Reichenbach et al. 1986). Zwar wurde dieser Mechanismus bisher nur für PFCLs und F6H8 diskutiert, jedoch scheint er auch für F4H5 möglich zu sein (Mackiewicz, Maaijwee, et al. 2007). Während retinale Zellen und Hornhautendothelzellen zwar sehr unterschiedliche Zellarten sind, kann ein Ungleichgewicht von Elektrolyten als Ursache des beobachteten Zelluntergangs nicht ausgeschlossen werden. Bekanntermaßen ist die Regulation von Ionen und der damit verbunden Dehydratation der Hornhaut eine der Hauptaufgaben des Endothels. Die hohe Anzahl von Na^+-K^+-Pumpen (ca. drei Mio. pro Endothelzelle) und zahlreichen anderen Ionentransportern stellt unter physiologischen Bedingungen die Elektrolythomöostase sicher (Geroski & Edelhauser 1984; Bonanno 2003). Möglicherweise ist dieser Mechanismus durch die Versiegelung des Endothels durch F4H5 unterbunden, da geladene Ionen sich zwar gut in wässrigen Lösungen lösen, nicht jedoch in SFAs (Meinert & Roy 2000). Die gestörte Funktion der Na^+-K^+-ATPase und weiterer Transportmoleküle führt gegebenenfalls zu einer Störung der Elektrolythomöostase.

Zusammenfassend ist die Hypothese einer Versiegelung des Endothels durch F4H5 ohne Einschränkung mit dem in dieser Arbeit beobachteten zeitabhängigen Abfall der ECD vereinbar. Je länger die Inkubation in F4H5, desto länger wäre das Endothel versiegelt, wodurch oben genannte Mechanismen verstärkt zu Tragen kämen. In ähnlicher Weise wurde dieser Mechanismus bereits für Silikonöl diskutiert (Yang et al. 2008). Zu beachten ist auch hier, dass ein solcher indirekter Einfluss zwar plausibel wäre, um die Resultate der hier durchgeführten Experimente zu erklären, jedoch bleibt F4H5 in der Regel nur einige Minuten im Auge, bevor es gründlich ausgespült wird. Ein Mangel an Nährstoffen, hervorgerufen durch eine

kurzzeitige Versiegelung durch F4H5, wäre in der klinischen Praxis daher nicht anzunehmen und spielt dementsprechend in der klinischen Anwendung von F4H5 keine wichtige Rolle.

4.2.4 Konsequenzen für die klinische Anwendung

Signifikanter Zellschaden konnte in dieser Arbeit erst ab einem Inkubationszeitraum von 120 min beobachtet werden, fraglicher Schaden (nur vermehrt Rosettenformation und Alizarin-rote Areale) wurde nach 60 min festgestellt. Da F4H5 als Spüllösung und Silikonöllösungsmittel zur Entfernung von „sticky silicone oil“ und emulsifiziertem Silikonöl auf den Markt gebracht wurde, liegt die klinisch-relevante intraokulare Anwendungszeit von in der Regel weniger als 10 min deutlich unterhalb einer Inkubationszeit von 60 oder mehr Minuten. Im Hinblick auf die klinische Verwendung von F4H5 als Spüllösung in der Augenvorderkammer gelten die erzielten Ergebnisse somit also als weitestgehend unbedenklich. Es zeigten sich keinerlei Hinweise, die gegen die Verwendung F4H5 für die vorgesehenen Indikationen als Spüllösung in der Augenvorderkammer sprechen. Da diese Arbeit allerdings nur in der Lage ist die Kurzzeitauswirkungen nach zwei Wochen zu beurteilen, sind für die Evaluation langfristiger Auswirkungen beispielsweise klinisch-prospektive Studien notwendig. Etwaige Reste von F4H5 sollten trotz allem durch mehrfache gründliche BSS-Spülung möglichst vollständig aus dem Auge entfernt werden (Coppola et al. 2017). Sollte F4H5 zukünftig für weitere Indikationen mit längerer intraokularer Verweilzeit zum Einsatz kommen, sollte aufgrund der Tatsache von teils ausgeprägter Toxizität einiger SFAs die Langzeittestung in weiteren präklinischen Studien näher untersucht werden (Mackiewicz, Mühling, et al. 2007).

4.3 „Split Corneal Buttons“ – Bewertung des Hornhautmodells

Diese Arbeit nutzte ein porcines Hornhautmodell, um die Auswirkungen von F4H5 auf das Hornhautendothel zu untersuchen. Die Verträglichkeit gegenüber dem cornealen Endothel ist für die klinische Anwendung im vorderen Augenabschnitt von

hoher Relevanz. Studien, die F4H5 im Zusammenhang mit cornealen Endothelzellen untersuchen, sind jedoch bisher nicht publiziert worden. Die ECD und morphologische Parameter (Reformationsfiguren, Rosettenformationen, Alizarin-rote Areale (zerstörte Zellen) wurden in der in dieser Arbeit als indirekte Toxizitätsparameter genutzt. Die Einflüsse von F4H5 konnten im Sinne einer Biokompatibilitätstestung unter Ausschaltung möglichst vieler negativer externer Einflüsse (siehe unten) an diesem Hornhautmodell gut untersucht werden.

Split corneal buttons

Menschliche Spenderhornhäute sind für experimentelle Forschungszwecke meist nicht verfügbar, da gesunde Hornhäute im Rahmen von Transplantationen zur Behandlung von Hornhauterkrankungen benötigt werden. Aufgrund des weltweit bestehenden Mangels an Spenderhornhäuten müssen für experimentelle Untersuchungen daher andere Methoden genutzt werden (Gain et al. 2016). Da Schweineaugen ohnehin in Schlachtbetrieben anfallen, sind sie ein einfach zugängliches und kostengünstiges Forschungsobjekt in der Biokompatibilitäts-testung neuer Substanzen. Gleichzeitig wird die Durchführung von Tierexperimenten im Sinne der „Principles of the 3Rs – Replacement, Reduction, Refinement“ und dem damit verbundenen Aufwand für Organisation und Tierhaltung vermieden (Olsson et al. 2012).

Schweinehornhäute und auch speziell das corneale Endothel zeichnen sich durch ähnliche Eigenschaften aus wie beim Menschen (Elsheikh et al. 2008; Sanchez et al. 2011; Fujita et al. 2013; Lee et al. 2014). Das hier verwendete porcine Hornhautmodell wurde 2018 vorgestellt (Kunzmann et al. 2018; siehe auch Einleitung & Methodik). Hierbei wird das Hornhautepithel und ein Teil des Hornhautstromas vor Kultivierung der Präparate entfernt, wodurch ein Aufquellen des Stromas und die dabei auf das Endothel einwirkende mechanische Kräfte (Scher- und Quetschkräfte) reduziert werden (Kunzmann et al. 2018). Der tatsächliche Einfluss von einer weiteren Einflussgröße, hier beispielsweise F4H5, kann anhand der „split corneal buttons“ daher exakter beurteilt werden als an vollständigen Schweinehornhäuten und entspricht daher auch eher der Wirkung auf menschliches Endothel in vivo. Eine Kultivierung von Schweinhornhäuten für 15 Tage war vorher in dieser Art nicht möglich.

Die Abnahme der ECD der Kontrollgruppe verlief nahezu linear. Zudem entsprach sie menschlichen, kultivierten Spenderhornhäuten (diese Arbeit: -4.95 ± 4.97% (Mittelwert ± SD (Woche 1), -4.08 ± 6.85 % (Woche 2); -5.55 %/Woche (Kunzmann et al. 2018); menschliche Spenderhornhäute: -4.7 – 5.7 %/Woche (Pels & Schuchard 1983; Borderie et al. 1995; Linke et al. 2013)). Dieses Modell stellt daher eine Kultivierungsmethode dar, die optimale Bedingungen liefert, um valide Ergebnisse bei Biokompatibilitätsuntersuchungen zu liefern.

Kulturmedium

Die Kultivierungsmethode der Präparate wurde so gewählt, dass möglichst viele externe Störfaktoren ausgeschaltet werden, um möglichst genau den Einfluss von zu testenden Faktoren (hier F4H5) zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich Dextran-freies Kulturmedium (Culture Medium 1 + FCS (Biochrom GmbH, Berlin) verwendet. Dextran T500 wird häufig in Hornhautbanken genutzt, um Spenderhornhäute präoperativ osmotisch zu entquellen, jedoch hat Dextran T500 gleichzeitig einen toxischen Effekt auf das Hornhautendothel (Borderie et al. 1997; Thuret et al. 2005; Zhao et al. 2012; Filev et al. 2017). Der genaue Pathomechanismus ist unbekannt, Dextran wird aber von den Endothelzellen aufgenommen und akkumuliert mit zunehmender Zeit in Form von Vakuolen in den Endothelzellen (van der Want et al. 1983; Pels & Schuchard 1985; Redbrake et al. 1997). Die Zugabe von Dextran T500 zum Kulturmedium erhöht den täglichen Endothelzellverlust während der Kultivierung von 0,7% /d (Dextran-freies Kulturmedium) auf ca. 2,0 %/d. Da bei der Verwendung von „split corneal buttons“ durch das Entfernen eines Stromanteils das osmotische Aufquellen und damit auch die Scher- und Quetschkräfte reduziert werden, kann auf Dextran T500 verzichtet werden (Kunzmann et al. 2018).

Dem verwendeten Kulturmedium wurde ausschließlich an Tag 0 neben 2 ml fetalem Kälberserum (FCS) auch 0,8 ml (≙ 2,5 µg Amphotericin B/ml Medium) in 80 ml Kulturmedium zugegeben. Die Konzentration von Amphotericin B wurde analog zur Vorgehensweise der Hornhautbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gewählt (Filev et al. 2018). Negative Effekte auf die ECD werden erst ab einer Konzentration von 4 µg/ml berichtet (Layer et al. 2014; Duncan 2016). Beim

Wechsel des Kulturmediums an Tag 8 wurde zudem auf die Zugabe von Amphotericin B verzichtet.

Auszählung

Die Auszählung der Endothelzellen in dieser Arbeit erfolgte manuell und verblindet mittels ImageJ. Da die Auszählung des gesamten Endothels nicht praktikabel ist, wurden einzelne Quadrate (100 µm²) ausgezählt und auf die ECD (Zellen/mm²) extrapoliert. Dieses Verfahren birgt die Gefahr, durch die Auswahl eines nicht repräsentativen Ausschnitts eine inadäquate ECD zu berechnen. Um diese Gefahr zu minimieren wurden sechs Quadrate á 100 µm² ausgezählt und gemittelt. Da bei der manuellen Zählmethode zusätzlich die Subjektivität des Auswerters eine Rolle spielt und dabei möglicherweise eine hohe Variabilität verursachen kann, ist es wichtig mit einem kalibrierten Mikroskop zu arbeiten (Thuret et al. 2003).

Bekanntermaßen nimmt die ECD der Hornhaut stark von peripher nach zentral ab (Schimmelpfennig 1984; Amann et al. 2003). Diesem Störfaktor wurde mit der Verwendung von ausschließlich zentral ausgestanzten „split corneal buttons“ begegnet, sodass die ECD jederzeit nur in zentralen Arealen ausgewertet wurde. Campolmi et al. (2013) empfehlen zum manuellen Auszählen der ECD eine Mindestgröße des Auszähl-Quadrates eine Seitenlänge von mindestens 200 µm x 200 µm, da insbesondere eine niedrige ECD in kleineren Auszähl-Quadraten zu hoch eingeordnet werden kann. Da in unseren Untersuchungen im Vergleich zur Auszählung von menschlichen Spender-Hornhäuten jedoch nahezu immer eine relativ hohe ECD vorlag (niedrigste ECD: 2918 Zellen/mm²) und eine Auszählung von sechs Quadraten mit einer Seitenlänge von 100 µm x 100 µm an unterschiedlichen Stellen des Präparats erfolgte, um einzelne regionale Ausreißer der ECD auszugleichen, sollte die angewandte Zählmethode einen repräsentativen Gesamteindruck darstellen.

Zur Auswertung der ECD wurden die „split corneal buttons“ in hBSS-Lösung eingebracht. Der Zeitraum wurde stets unter vier Minuten gehalten, sodass hierdurch kein negativer Einfluss auf die ECD an darauf folgenden Kontrollzeitpunkten entstanden sein sollte (Meltendorf et al. 2007). Da bisher keine Studien existieren, bei denen der kumulative Einfluss einer wöchentlichen

Mikroskopie in hBSS-Lösung (hier insgesamt dreimal max. 4 min) untersucht wurde, kann ein hierdurch entstandener negativer Einfluss leider nicht ausgeschlossen werden. Dennoch wäre dieser Effekt für alle Präparate identisch, sodass dies keinen Einfluss auf die Aussagekraft der erzielten Ergebnisse hätte. Durch die zwischenzeitliche Inkubation für eine Woche in Kulturmedium kann zumindest angenommen werden, dass es zu einer Wiedereinstellung eines Gleichgewichts der intra- und extrazellulären Elektrolytkonzentrationen gekommen ist.

4.4 Einfluss der Färbung auf die Quantifizierung der Endothelzelldichte

Für die Transparenz der Hornhaut ist eine ausreichende ECD von herausragender Bedeutung; insbesondere bei möglichen Spenderhornhäuten ist eine suffiziente ECD essentiell für eine optimale Transplantatfunktion (Armitage et al. 2003). Vor der Hornhauttransplantation wird deshalb die ECD der Spenderhornhäute bestimmt. Viele Studien thematisieren diesbezüglich den Vergleich verschiedener Zählmethoden in Hornhautbanken. Seit langem werden manuelle Verfahren mit semiautomatischen oder gar vollautomatischen Methoden verglichen, wobei auch Einflüsse wie die korrekte Kalibrierung des Mikroskops und die Erfahrung der auswertenden Person eine wichtige Rolle in der validen Quantifizierung der ECD spielen (Thuret et al. 2003; Kohlhof & Ruprecht 2004; Hirneiss et al. 2007).

Ein bisher überraschenderweise nicht untersuchter Aspekt ist die Validität der Auszählung ungefärbter Endothelzellen im Vergleich zur Zählung gefärbter Zellen. In der Regel wird die ECD von Hornhauttransplantaten vor der Transplantation ungefärbt in hBSS-Lösung bestimmt ohne signifikante Endothelzellverluste zu verursachen (Meltendorf et al. 2007; Schroeter 2009). Obwohl die Zellen und Zellmembran durch hBSS besser sichtbar werden, ist es nicht immer einfach die Zellen voneinander zu unterscheiden, was bei der Auszählung potenziell in einer nicht-repräsentativen ECD resultieren könnte. Durch Färbung wird die Sichtbarkeit der Zellgrenzen deutlich verbessert. Eine Färbung wird oft zu Forschungszwecken und zur Analyse von Form und Größe der Zellen verwendet, um den Zustand des Endothels besser evaluieren zu können. Bei Spenderhornhäuten kommt in der Regel keine Färbung in Frage, da viele Färbesubstanzen zytotoxische

Eigenschaften besitzen. Somit sind auch zu eventuelle Mehrfachbetrachtungen an verschiedenen Zeitpunkten nach einer Färbung in Experimenten nicht praktikabel. Insbesondere für Forschungszwecke wäre eine Validierung der ungefärbten nicht-toxischen Auszählung von Bedeutung, damit die ECD an verschiedenen Zeitpunkten für eine Verlaufsbeurteilung, wie in dieser Arbeit (d1, d8, d15), für verlässliche Aussagen verwendet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit war eine manuelle Auszählung von ungefärbten Hornhäuten nach kurzer Inkubation in hBSS gut möglich. Da es sich um identische Präparate handelte, sollten in der gepaarten Analyse idealerweise möglichst identische ECD-Werte festgestellt werden. Tatsächlich war die ECD aus der ungefärbten Auszählung in hBSS in allen Inkubationsgruppen nicht signifikant von der Auszählung in Trypanblau und Alizarinrot S gefärbter Zellen zu unterscheiden (siehe Abbildung 18; control group - p = 1,000; F4H5 15min - p = 1,000; F4H5 30min – p = 0,112; F4H5 60min – p = 1,000; F4H5 120min 0,977).

Somit bietet die Auszählung ungefärbter Zellen keinen Nachteil gegenüber der Auszählung gefärbter Zellen bezüglich einer validen Beurteilung der ECD. Vielmehr bietet sie den Vorteil einer einfachen Durchführbarkeit und die Möglichkeit das Endothel im Laufe der Experimente mehrfach zu quantifizieren. Multiple Auszählungen erlauben eine Verlaufsbeurteilung der ECD. Für die Bewertung morphologischer Kriterien, wie zum Beispiel Kompensationsmechanismen bei endothelialen Zellverlusten im Sinne von Pleomorphismen und Polymegathismus, Reformationsfiguren und dem Auftreten von Rosettenformationen und Alizarin-roten Arealen sind ohne eine Färbung selbstverständlich nicht möglich, sodass diese weiterhin für eine vollständige Evaluation des Endothels einen klaren Stellenwert hat.

5 Zusammenfassung

Silikonöl wird im Rahmen der Pars-Plana-Vitrektomie (PPV) zur Glaskörpertamponade verwendet. Im Verlauf kann es hierbei zur Emulsifikation des Silikonöls zu kleinen Silikonöltröpfchen oder zur Entstehung von „sticky silicone oil“ kommen. Emulsifiziertes Silikonöl kann Ursache eines Sekundärglaukoms sein. „Sticky silicone oil“ tendiert aufgrund seiner Konsistenz und chemischen Eigenschaften dazu, an Intraokularlinsen oder der Netzhaut zu haften, was zu Sehbeeinträchtigungen führen oder gar während operativen Eingriffen die Einsicht von vitreoretinalen Chirurgen erschweren kann. Mechanische Verfahren zur Entfernung von „sticky silicone oil“ erwiesen sich als unzureichend, sodass oft nur der Austausch der betroffenen Intraokularlinse als Lösung verblieb. Auch emulsifiziertes Silikonöl kann zu Visusbeeinträchtigungen führen und unter Umständen gleichermaßen nicht einfach zu entfernen sein.

Als amphiphile Substanz zeigte Perfluorbutylpentan (F4H5) - ein semifluoriertes Alkan (SFA) - in mehreren Studien vielversprechende Ergebnisse bei der Entfernung von „sticky silicone oil“ und emulsifiziertem Silikonöl aus dem Auge. Anderen SFAs wurde jedoch in verschiedenen Studien eine teils erhebliche Toxizität nachgewiesen. Da eine Biokompatibilitätstestung von F4H5 bezüglich der Verträglichkeit mit dem Hornhautendothel bisher ausstehend ist, kann F4H5 im vorderen Augenabschnitt bisher nur im Rahmen eines off-label-use verwendet werden. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Auswirkungen von Perfluorbutylpentan (F4H5) auf corneale Endothelzellen in einem organo-typisch kultivierten porcinen Hornhautmodell („split corneal buttons“).

Nach Resektion eines Teils des Hornhaut-Epithels und des -Stromas erfolgte die Inkubation in F4H5 (15, 30, 60, 120 min) bzw. in balanced salt solution (BSS, Kontrollen). An Tag 1, 8 und 15 wurde die Endothelzelldichte (ECD) quantifiziert. Zusätzlich erfolgte eine Analyse morphologischer Veränderungen der Endothelzellen (Reformationsfiguren, Rosettenformationen, Alizarin-rote Areale).

Nur nach Inkubation der „split corneal buttons“ in F4H5 für 120 min zeigte sich erst an Tag 15 eine signifikant höhere Abnahme der ECD im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median ± 25%/75%-Quartil; control 3658 ± 129/296 Zellen/mm²;

F4H5 120min 3281 ± 43/222 Zellen/mm²; p = 0.046). Kürzere Inkubationszeiten (15, 30, 60 min) hatten keinen signifikanten Einfluss auf die ECD. Die erhobenen morphologischen Parameter unterstützen diese Beobachtung mit einer im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten Prävalenz von Reformationsfiguren (F4H5 120min: 10.5 ± 9.3/13.9 % vs. control: 5.2 ± 2.8/7.2 %; p = 0.010), Rosettenformationen (F4H5 120min 25.566 ± 17.044/36.219/mm² vs. control: 8.333 ± 0.000/15.667/mm²; p = 0.002) und Alizarin-roter Areale (F4H5 120min: 38.350 ± 29.827/51.333/mm² vs. control: 20.833 ± 10.417/25.000/mm²; p = 0.049) nach 120-minütiger Inkubation in F4H5. In der Gruppe F4H5 60min zeigten sich ebenfalls vermehrt Rosettenformationen (25.452 ± 16.968/36.057/mm²; p = 0.006) und Alizarin-rote Areale (46.662 ± 42.420/50.903/mm²; p = 0.007), jedoch kein signifikant höherer Anteil an Reformationsfiguren (7.0 ± 2.2/1.6 %; p = 0.953). Keinerlei signifikante Auffälligkeiten zeigten sich an Tag 8.

Demnach geben die Ergebnisse keine Hinweise auf negative Effekte von F4H5 nach einer Inkubation für 15 und 30 min. Nach 60 min besteht allerdings ein fraglicher Schaden. Allein die Inkubation für 120 min zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe klare Hinweise auf einen schädigenden Einfluss von F4H5. Ob F4H5 direkte oder indirekte Einflüsse auf das Hornhautendothel besitzt kann mit dem verwendeten Versuchsmodell nicht beantwortet werden. Um die zugrundeliegenden Mechanismen genauer zu evaluieren sind weitere Untersuchungen notwendig. Die kurzzeitige Verwendung von F4H5 zur Entfernung von „sticky silicone oil“ oder emulsifizertem Silikonöl, wie sie in der Praxis üblich ist, scheint keine negativen Effekte auf das Hornhautendothel zu haben. Dennoch sollte eine ausreichende Entfernung von F4H5 aus dem Auge durch mehrfache Spülung, beispielsweise mit BSS, erfolgen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden in einem direkten Vergleich der Auszählungsmethoden quantitative Unterschiede zwischen der Auswertung der ECD ohne Färbung in hypotoner BSS-Lösung mit der Analyse nach Färbung in Trypanblau und Alizarinrot S evaluiert. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der ECD, sodass eine Verlaufsbeurteilung in hypotoner BSS-Lösung als valide Beurteilungsmethode angesehen werden kann.

Summary

Silicone oil is commonly used in pars-plana-vitrectomy (PPV) as vitreous tamponade. A complication of the use of silicone oil is the formation of “sticky silicone oil” and the emulsification of silicone oil to small silicon oil bubbles. “Sticky silicone oil” may adhere to intraocular lenses or the retina and consequently cause visual impairments or the disturb the intraoperative view of vitreoretinal surgeons. As mechanical procedures usually do not allow sufficient removal of “sticky silicone” oil” and additional damage may be caused, often the exchange of the intraocular lens is the only possible treatment. Also, emulsified silicone oil can have a negative impact on visual acuity or possibly cause secondary glaucoma.

The amphiphilic substance perfluorobutylpentane (F4H5), a semifluorinated alkane (SFA), showed promising features as a solving agent removing emulsified silicone oil or “sticky silicone oil” from intraocular lenses or the retina in a feasible and fast wash out procedure, which makes other more invasive or ineffective interventions increasingly obsolete. Several studies provided clear evidence for the toxicity of various SFAs. However, as biocompatibility tests of F4H5 have yet to be conducted, F4H5 may only be used off-label within the anterior eye chamber. This study used an organo-typically cultivated porcine corneal organ culture model (“split corneal buttons”) to investigate the effects of F4H5 on the corneal endothelium.

After removal of the epithelium and parts of the corneal stroma, “split corneal buttons” were incubated in F4H5 for 15, 30, 60 and 120 min or balanced salt solution (BSS, controls). Endothelial cell density (ECD) was assessed on day 1, 8 and 15. Additionally, morphological characteristics (reformation figures, rosette formations, alizarin red areas) were assessed on day 15 as indirect markers of cell destruction and rearrangement processes.

Only the incubation in F4H5 for 120 min caused significant higher endothelial cell losses until day 15 compared to the control group (median ± 25%/75%-quartiles; control 3658 ± 129/296 cells/mm²; F4H5 120min 3281 ± 43/222 cells/mm²; p = 0.046). Shorter incubation times (15, 30, 60 min) did not have a significant influence on ECD. Morphological parameters support these findings as there was a significantly higher prevalence of reformation figures (F4H5 120min: 10.5 ± 9.3/13.9 % vs. controls: 5.2 ± 2.8/7.2 %; p = 0.010), rosette formations (F4H5 120min 25.566 ± 17.044/36.219/mm² vs. controls: 8.333 ± 0.000/15.667/mm²; p = 0.002) and

alizarin red cells (F4H5 120min: 38.350 ± 29.827/51.333/mm² vs. controls: 20.833 ± 10.417/25.000/mm²; p = 0.049) after incubation in F4H5 for 120 min. Also, the group F4H5 60 min showed significantly more rosette formations (25.452 ± 16.968/36.057/mm²; p = 0.006) and alizarin red cells (46.662 ± 42.420/50.903/mm²; p = 0.007), but not reformation figures (7.0 ± 2.2/1.6 %; p = 0.953). On day 1 and 8 none of the groups showed significant differences compared to the control group.

The conducted experiments showed no adverse effects of F4H5 on the corneal endothelial cell density after shorter incubation times in F4H5 (15, 30 minutes). Questionable damage may be found after 60 minutes. Solely, the incubation time of 120min in F4H5 resulted in significantly higher endothelial cell losses and a higher prevalence of the assessed morphological parameters when compared to controls. For this reason, complete removal of F4H5 from the eye, for example using BSS, at the end of the wash-out-procedure is recommended. It remains unclear whether F4H5 has direct or indirect impact on the corneal endothelium. The used research model gives no answers regarding underlying mechanisms of the observed damaging effects after longer incubation times in F4H5. However, short exposure to F4H5 seems to be safe

Furthermore, a direct comparison between the unstained analysis of endothelial cell density (hypotonic balanced salt solution, hBSS) and stained ECD analysis with trypan blue and alizarin red S was performed. proved the accuracy and validity of unstained ECD counting results. No significant differences in ECD were detected within both groups. Thus, ECD analysis using hBSS is a valid method to perform cell counts multiple times throughout the course of experiments.

6 Literaturverzeichnis

Abrams, G.W. et al., 1995. The Incidence of Corneal Abnormalities in the Silicone Study - Silicone Study Report 7. *Arch Ophthalmol*, 113(6), pp.764–9.

Amann, J. et al., 2003. Increased Endothelial Cell Density in Paracentral and Peripheral Regions of the Human Corne. *Am J Ophthalmol*, 135(5), pp.584–90.

Apple, D.J. et al., 1996. Irreversible Silicone Oil Adhesion to Silicone Intraocular Lenses. A clinicopathologic analysis. *Ophthalmology*, 103(10), pp.1555–62.

Apple, D.J. et al., 1997. Silicone oil adhesion to intraocular lenses: an experimental study comparing various biomaterials. *J Cataract Refract Surg*, 23(4), pp.536–44.

Armitage, W.J., Dick, A.D. & Bourne, W.M., 2003. Predicting Endothelial Cell Loss and Long-Term Corneal Graft Survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(8), pp.3326–31.

Arthur, S.N. et al., 2001. Silicone oil adherence to silicone intraocular lenses. *Int Ophthalmol Clin*, 41(3), pp.33–45.

Barca, F., Caporossi, T. & Rizzo, S., 2014. Silicone oil: Different physical proprieties and clinical applications. *Biomed Res Int*, 2014:50214.

Barr, C.C. et al., 1993. Postoperative Intraocular Pressure Abnormalities in the Silicone Study. *Ophthalmology*, 100(11), pp.1629–35.

Bartz-Schmidt, K.U. et al., 1995. Intraokulare Silikonlinsen und Silikonöl. *Klin Monbl Augenheilkd*, 207(3), pp.162–6.

Batterbury, M.. et al., 1994. The Adherence of Silicone Oil to Standard And Heparin-Coated PMMA Intraocular Lenses. *Eye*, 8(5), pp.547–9.

Bonanno, J.A., 2003. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res*, 22(1), pp.69–94.

Borderie, V. et al., 1997. Evaluation of the Deswelling Period in Dextran-Containing Medium After Corneal Organ Culture. *Cornea*, 16(2), pp.215–23.

Borderie, V.M. et al., 1995. Morphology, Histology and Ultrastructure of Human C31 Organ-Cultured Corneas. *Cornea*, 14(3), pp.300–10.

Bourne, W.M. & Nelson, L., 1997. Central Corneal Endothelial Cell Changes Over a Ten-Year Period. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(3), pp.779–782.

Brazitikos, P.D. et al., 2003. Perfluorocarbon liquid utilization in primary vitrectomy repair of retinal detachment with multiple breaks. *Retina*, 23(5), pp.615–21.

Campolmi, N. et al., 2013. Inherent errors of the fixed-frame counting method for corneal endothelial cell density in eye banks. *Cell Tissue Bank*, 15(3), pp.451–9.

Casswell, A.G. & Gregor, Z.J., 1987. Silicone oil removal. I. The effect on the complications of silicone oil. *Br J Ophthalmol*, 71(12), pp.893–97.

Cazabon, S., Hillier, R.J. & Wong, D., 2011. Heavy silicone oil: A “novel” intraocular

tamponade agent. *Optom Vis Sci*, 88(6), pp.772–5.

Chan, Y.K. et al., 2018. A perfluorobutylpentane (F4H5)-based solution for the removal of residual emulsified silicone oil. *Acta Ophthalmol*, 96(1), pp.e38–e45.

Cibis, P.A., Becker, B. & Okun, E., 1962. The Use of Liquid Silicone in Retinal Detachment. *Arch Ophthalmol*, 68, pp.590–9.

Coppola, M. et al., 2017. Perfluorobutylpentan (F4H5) Solvent-Assisted Silicon Oil Removal Technique. *Retina*, 37(4), pp.793–95.

Delmonte, D.W. & Kim, T., 2010. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*, 37(3), pp.588–98.

Dick, H.B. & Augustin, A.J., 2000. Solvent for removing silicone oil from intraocular lenses: Experimental study comparing various biomaterials. *J Cataract Refract Surg*, 26(11), pp.1667–72.

Ding, X. et al., 2001. Experiment study of effect of perfluorohexyloctane on corneal endothelial cells. *Yan ke xue bao = Eye science*, 17(1), pp.21–6.

Doughty, M.J. & Zaman, M.L., 2000. Human Corneal Thickness and Its Impact on Intraocular Pressure Measures: A Review and Meta-analysis Approach. *Surv Ophthalmol*, 44(5), pp.367–408.

Dresp, J.H.. & Menz, D.-H., 2007. The phenomenon of “sticky” silicone oil. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245(6), pp.863–68.

Dua, H.S. et al., 2013. Human Corneal Anatomy Rede fi ned A Novel Pre-Descemet’s Layer (Dua’s Layer). *Ophthalmology*, 120(9), pp.1778–85.

Duan, A., She, H. & Qui;, Y., 2011. Complications After Heavy Silicone Oil Tamponade in Complicated Retinal Detachment. *Retina*, 31(3), pp.547–52.

Duncan, 2016. The Effect of Light Exposure on the Efficacy and Safety of Amphotericin B in Corneal Storage Media. *JAMA Ophthalmol*, 134(4), pp.432–6.

Dutescu, R.M.. et al., 2014. Semifluorinated alkanes as a liquid drug carrier system for topical ocular drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 88(1), pp.123–8.

Eckhardt, C., 2005. Transconcunctival sutureless 23-gauge vitrectomy. *Retina*, 25(2), pp.208–11.

Edelhauser, H.F., 2006. The Balance between Corneal Transparency and Edema The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(5), pp.1755–67.

Elsheikh, A., Alhasso, D. & Rama, P., 2008. Biomechanical properties of human and porcine corneas. *Exp Eye Res*, 86(5), pp.783–90.

Faber, C., Scherfig, E. & Prause, J.U., 2008. Corneal Thickness in Pigs Measured by Ultrasound Pachymetry In Vivo. *Scand J Lab Anim Sci*, 35(1), pp.39–43.

Federman, J.L. & Schubert, H.D., 1988. Complications Associated with the Use of Silicone Oil in 150 Eyes after Retina-vitreous Surgery. *Ophthalmology*, 95(7), pp.870–6.

Filev, F. et al., 2018. Endothelial Cell Count in Eye Bank Corneal Grafts: Impact of Death Cause and Donor Diseases. *Semin Ophthalmol*, 33(3), pp.338–44.

Filev, F. et al., 2017. Semi-quantitative assessments of dextran toxicity on corneal endothelium: conceptual design of a predictive algorithm. *Cell Tissue Bank*, 18(1), pp.91–8.

Filloy, A., Rubio, M.J. & Comas, C., 2013. Inverted Hypopyon in the Posterior Pole. *Retina*, 33(5), pp.1088–9.

Fischbarg, J. & Maurice, D.M., 2004. An update on corneal hydration control. *Exp Eye Res*, 78(3), pp.537–41.

Fujii, G.Y. et al., 2002. A New 25-Gauge Instrument System for Transconjunctival Sutureless Vitrectomy. *Ophthalmology*, 109(10), p.1807–12; discussion 1813.

Fujita, M. et al., 2013. Comparison of Proliferative Capacity of Genetically-Engineered Pig and Human. *Ophthalmic Res*, 49(3), pp.127–38.

Fukumoto, M. et al., 2018. A case of silicone oil adhered to the retinal surface via perfluorocarbon liquid. *BMC Ophthalmol*, 18(1), p.82.

Gain, P. et al., 2016. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol*, 134(2), pp.167–73.

Gehlsen, U. et al., 2017. A semifluorinated alkane (F4H5) as novel carrier for cyclosporine A: a promising therapeutic and prophylactic option for topical treatment of dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 255(4), pp.767–75.

Geroski, D.H. & Edelhauser, H.F., 1984. Quantitation of Na/K ATPase Pump Sites in the Rabbit Corneal Endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25(9), pp.1056–60.

Ghoraba, H.H. et al., 2017. Sticky silicone oil. *Retina*, 37(8), pp.1599–606.

Ghoraba, H.H.. et al., 2017. Silicone Oil-Related Visual Loss. *Ophthalmologica*, 238(1–2), pp.59–67.

Gosse, E. & Lochhead, J., 2013. Delayed Presentation of Emulsified Subretinal Silicone Oil Appearing as an Inverse Macular Pseudohypopyon. *JAMA Ophthalmol*, 131(5), pp.684–85.

Hatou, S. et al., 2010. Role of Insulin in Regulation of Na+-/K+-Dependent ATPase Activity and Pump Function in Corneal. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(8), pp.3935–42.

Hatou, S. et al., 2009. The Effects of Dexamethasone on the Na, K-ATPase Activity and Pump Function of Corneal Endothelial The Effects of Dexamethasone on the Na , K-ATPase Activity and Pump Function of Corneal Endothelial Cells. *Curr Eye Res*, 34(5), pp.347–54.

He, Z. et al., 2016. 3D map of the human corneal endothelial cell. *Sci Rep*, 6(6), pp.1–14.

Hirneiss, C., Schumann, R.G. & Gru, M., 2007. Endothelial Cell Density in Donor Corneas A Comparison of Automatic Software Programs With Manual Counting. *Cornea*, 26(1), pp.80–3.

Hoerauf, H. et al., 2002. Determination of the solubility of perfluorocarbon liquids in silicone oil in vitro and in vivo. *Retina*, 22(2), pp.163–8.

Hollingsworth, J. et al., 2001. A Population Study of the Normal Cornea using. *Optom Vis Sci*, 78(10), pp.706–11.

Honavar, S.G. et al., 1996. Glaucoma after Pars Plana Vitrectomy and Silicone Oil Injection for Complicated. *Ophthalmology*, 106(1), pp.169–77.

Horn, D.L. Van et al., 1977. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16(7), pp.597–613.

Hutton, W.L. et al., 1994. Effects of Silicone Oil Removal - Silicone Study Report 6. *Arch Ophthalmol*, 112(6), pp.778–85.

Ichhpujani, P., Jindal, A. & Jay Katz, L., 2009. Silicone oil induced glaucoma: A review. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 247(12), pp.1585–93.

Jay, L. et al., 2008. Determination of porcine corneal layers with high spatial resolution by simultaneous second and third harmonic generation microscopy. *Opt Express*, 16(21), pp.16284–93.

Jonas, J.B. et al., 2001. Intraocular pressure and silicone oil endotamponade. *J Glaucoma*, 10(2), pp.102–8.

Joyce, N.C. et al., 1999. Expression of Cell Cycle-Associated Proteins in Human and Rabbit Corneal Endothelium In Situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(8), pp.1566–75.

Joyce, N.C., 2003. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res*, 22, pp.359–89.

Kanski, J. et al., 2012. *Klinische Ophthalmologie* 7. Auflage., Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.

Kim, M.K. & Hara, H., 2015. Current status of corneal xenotransplantation. *Int J Surg*, 23(Pt B), pp.255–60.

Kirchhof, B. et al., 2002. Use of Perfluorohexyloctane as a Long-term Internal Tamponade Agent in Complicated Retinal Detachment Surgery. *Am J Ophthalmol*, 133(1), pp.95–101.

Kohlhof, J.K. & Ruprecht, K.W., 2004. Manuelle Endothelzellauszählung zu transplantierender Hornhäute im Vergleich zur softwaregesteuerten, automatisierten Auszählung [Manual endothelial cell enumeration for transplanted corneas in comparison to software controlled, automatic enumeration]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 221(6), pp.473–8.

Krohn, J. & Høvding, G., 2005. The influence of donor age and cause of death on corneal endothelial cell density. *Acta Ophthalmol Scand*, 83(6), pp.746–50.

Kunzmann, B.C. et al., 2018. Establishment Of A Porcine Corneal Endothelial Organ Culture Model For Research Purposes. *Cell Tissue Bank*, 19(3), pp.269–76.

Kusaka, S., Kodama, T. & Ohashi, Y., 1996. Condensation of Silicone Oil on the Posterior Surface of a Silicone Intraocular Lens During Vitrectomy. *Am J Ophthalmol*, 121(5), pp.574–5.

Laing, R.A. et al., 1976. Changes in the Corneal Endothelium as a Function of Age. *Exp Eye Res*, 22(6), pp.587–94.

Langefeld, S. et al., 1999. A new way of removing silicone oil from the surface of silicone intraocular lenses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 237(3), pp.201–6.

Layer, N. et al., 2014. Efficacy and safety of antifungal additives in Optisol-GS corneal storage medium. *JAMA Ophthalmol*, 132(7), pp.832–37.

Lee, S.E. et al., 2014. Characterization of Porcine Corneal Endothelium for Xenotransplantation. *Semin Ophthalmol*, 29(3), pp.127–35.

Liang, Y. et al., 2008. A cleaning solution for silicone intraocular lenses: "'sticky silicone oil.'" *Br J Ophthalmol*, 92(11), pp.1522–7.

Linke, S.J. et al., 2013. Thirty years of cornea cultivation: long-term experience in a single eye bank. *Acta Opthalmologica*, 91(6), pp.571–8.

Machemer, R., Parel, J. & Norton, E., 1972. Vitrectomy: a pars plana approach. Technical improvements and further results. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 76(2), pp.462–6.

Mackiewicz, J., Maaijwee, K., et al., 2007. Effect of gravity in long-term vitreous tamponade: in vivo investigation using perfluorocarbon liquids and semi-fluorinated alkanes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245(5), pp.665–75.

Mackiewicz, J., Mühling, B., et al., 2007. In Vivo Retinal Tolerance of Various Heavy Silicone Oils. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(4), pp.1873–83.

Martinez-Reina, M.J. et al., 2009. Histopathology and Ultrastructure of Rabbit Retina After Intravitreous Injection of Perfluorohexyloctane (F6H8). *Curr Eye Res*, 30(9), pp.773–9.

Mathis, A. et al., 1992. Giant Retinal Tears - Surgical Techniques and Results Using Perfluorodecalin and Silicone Oil Tamponade. *Retina*, 12(3 Suppl), pp.7–10.

McCuen, B.W. et al., 1985. Silicone Oil in Vitreoretinal Surgery Part 2 - Results and complications. *Retina*, 5(4), pp.198–205.

McLoone, E. et al., 2001. Silicone oil-intraocular lens interaction: which lens to use? *Br J Ophthalmol*, 85(5), pp.543–5.

Meinert, H. & Roy, T., 2000. Semifluorinated alkanes – A new class of compounds with outstanding properties for use in ophthalmology. *Eur J Ophthalmol*, 10(3), pp.189–97.

Meltendorf, C. et al., 2007. Endothelial cell density in porcine corneas after exposure to hypotonic solutions. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245(1), pp.143–7.

Menduni, F. et al., 2018. Contact Lens and Anterior Eye Characterisation of the porcine eyeball as an in-vitro model for dry eye. *Cont Lens Anterior Eye*, 41(1), pp.13–7.

Mergler, S. & Pleyer, U., 2007. The human corneal endothelium: new insights into electrophysiology and ion channels. *Prog Retin Eye Res*, 26(4), pp.359–78.

Merindano, M.D. et al., 2002. A comparative study of Bowman's layer in some mammals: Relationships with other constituent corneal structures. *Eur J Anat*, 6(3), pp.133–9.

Mertens, S., Bednarz, J. & Engelmann, K., 2002. Evidence of toxic side effects of perfluorohexyloctane after vitreoretinal surgery as well as in previously established in vitro models with ocular cell types. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 240(12), pp.989–95.

Mertens, S., Richard, G. & Eppendorf, U., 2000. Effect of perfluorodecalin on human retinal pigment epithelium and human corneal endothelium in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 238(2), pp.181–5.

Miller, J.B. et al., 2014. Complications of Emulsified Silicone Oil after Retinal Detachment Repair. *Semin Ophthalmol*, 29(5–6), pp.312–8.

Mitry, D. et al., 2010. The epidemiology of rhegmatogenous retinal detachment: geographical variation and clinical associations. *Br J Ophthalmol*, 94(6), pp.678–84.

Mohamed, S. & Lai, T.Y.Y., 2010. Intraocular gas in vitreoretinal surgery. *Hong Kong J Ophthalmol*, 14(1), pp.8–13.

Moller-Pederson, T., 1997. A comparative Study of Human Corneal Keratocyte and Endothelial Cell Density During Aging. *Cornea*, 16(3), pp.333–8.

Moreira, H. et al., 1992. Corneal Toxicity Study of Two Perfluorocarbon Liquids in Rabbit Eyes. *Cornea*, 11(5), pp.376–9.

Müller, A. & Doughty, M.J., 2002. Assessments of Corneal Endothelial Cell Density in Growing Children and Its Relationship to to Horizontal Corneal Diameter. *Optom Vis Sci*, 79(12), pp.762–70.

Murphy, C. et al., 1984. Prenatal and Postnatal Cellularity of the Human Corneal Endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25(3), pp.312–22.

Newman, E.A., 1987. Regulation of potassium levels by Müller cells in the vertebrate retina. *Can J Physiol Pharmacol*, 65(5), pp.1028–32.

Ni, C. et al., 1983. Intravitreous Silicone Injection - Histopathologic Findings in Human Eye After 12 Years. *Arch Ophthalmol*, 101(9), pp.1399–401.

Olsson, I.A.S. et al., 2012. The 3Rs principle – mind the ethical gap. *ALTEX Proceedings*, (Proceedings of the 8 th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal 2011), pp.333–6.

Öner, F.H., Saatci, A. & Sariog, S., 2003. Interaction of Intraocular Lenses with Various Concentrations of Silicone Oil: An Experimental Study. *Ophthalmologica*, 217(2), pp.124–8.

Orzalesi, N. et al., 1998. Experimental short-term tolerance to perfluorodecalin in the rabbit eye: a histopathological study. *Curr Eye Res*, 17(8), pp.828–35.

Pels, E. & Schuchard, Y., 1983. Organ-culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol*, 56(1–2), pp.147–53.

Pels, E. & Schuchard, Y., 1985. The Effects of High Molecular Weight Dextran on the Presevation of Human Corneas. *Cornea*, 3(3), pp.219–27.

Ramulu, P.Y. et al., 2010. Use of Retinal Procedures in Medicare Beneficiaries From 1997 to 2007. *Arch Ophthalmol*, 128(10), pp.1335–40.

Redbrake, C. et al., 1997. A histochemical study of the distribution of dextran 500 in human corneas during organ culture. *Curr Eye Res*, 16(5), pp.405–11.

Reichenbach, A., Nilius, B. & Eberhardt, W., 1986. Potassium accumulation by the glial membrane pump as revealed by membrane potential recording from isolated rabbit retinal muller cells. *Neurosci Lett*, 63(3), pp.280–4.

Rizzo, S. et al., 2012. Colored perfluorocarbon liquids as novel intraoperative tools. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 250(5), pp.653–9.

Rizzo, S. et al., 2011. Surgical results of heavy silicone oil HWS-45 3000 as internal tamponade for inferior retinal detachment with PVR : a pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 249(3), pp.361–7.

Rodrigues, E.B. et al., 2014. Development and initial experience with a colored perfluorocarbon liquid for intraocular tamponade in vitreoretinal surgery. *Retina*, 34(6), pp.1103–11.

Romano, M.R. et al., 2012. Interaction Between Perfluorcarbon Liquid and Heavy Silicone Oil: Risk Factor for “Sticky Oil” Formation. *Curr Eye Res*, 37(7), pp.563–6.

Romano, M.R.. et al., 2008. Primary vitrectomy with Densiron-68 for rhegmatogenous retinal detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246(11), pp.1541–6.

Sanchez, I. et al., 2011. The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 249(4), pp.475–82.

Schatz, B. et al., 2004. Adverse Side Effects With Perfluorohexyloctane as a long-term tamponade agent in complicated vitreoretinal surgery. *Retina*, 24(4), pp.567–73.

Scheerlinck, L.M.E. et al., 2016. Electrolyte composition of retro-oil fluid and silicone oil-related visual loss. *Acta Ophthalmol*, 94(5), pp.449–53.

Schimmelpfennig, B.H., 1984. Direct and Indirect Determination of Nonuniform Cell Density Distribution in Humon Corneal Endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 592(2), pp.223–9.

Schroeter, J., 2009. Endothelial Evaluation in the Cornea Bank. *Dev Ophthalmol*, 43, pp.47–62.

Schroeter, J.. et al., 2009. Arbeitsrichtlinien - Gute Fachliche Praxis für Hornhautbanken [Procedural guidelines. Good tissue practice for cornea banks]. *Ophthalmologe*, 106(3), pp.265–74, 276.

Sperling, S., 1978. Early Morphological Changes in Organ Cultured Human Corneal Endothelium. *Acta Ophthalmol*, 56(4), pp.573–80.

Stalmans, P., Pinxten, A.-M. & Wong, D.S.., 2015. Cohort Safety and Efficacy Study of Siluron2000 Emulsification-Resistant Silicon Oil and F4H5 in the Treatment of Full-Thickness Macular Hole. *Retina*, 35(12), pp.13–5.

Stappler, T. et al., 2008. A guide to the removal of heavy silicone oil. *Br J Ophthalmol*, 92(6), pp.844–7.

Stappler, T., Williams, R. & Wong, D., 2010. F4H5: a novel substance for the

removal of silicone oil from intraocular lenses. *Br J Ophthalmol*, 94(3), pp.364–8.

Sternberg, P. et al., 1985. Effect of silicone oil on the cornea. *Arch Ophthalmol*, 103(1), pp.90–4.

Stolba, U. et al., 1997. Experimental vitreous and aqueous replacement with perfluorophenanthrene. Clinical, histologic, and electrophysiologic results. *Retina*, 17(2), pp.146–153.

Stolba, U. et al., 2004. The effect of specific gravity of perfluorocarbon liquid on the retina after experimental vitreous substitution. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 242(11), pp.931–6.

Szaflik, J.P. & Kmera-Muszyńska, M., 2007. Confocal microscopy imaging of the cornea in patients with silicone oil in the anterior chamber after vitreoretinal surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245(2), pp.210–4.

Taylor, M.J. & Hunt, C.J., 1981. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S : importance of pH for the dye-lake reaction. *Br J Ophthalmol*, 65(12), pp.815–9.

Thuret, G. et al., 2005. Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and Deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(3), pp.816–22.

Thuret, G. et al., 2003. Is manual counting of corneal endothelial cell density in eye still acceptable? The French experience. *Br J Ophthalmol*, 87(12), pp.1481–6.

Toklu, Y., Cakmak, H.B. & Yorgun, M.A., 2012. Time Course of Silicone Oil Emulsification. *Retina*, 32(10), pp.2039–44.

Tripathy, K. & Sharma, Y.R., 2016. Inverted hypopyon in the eye. *BMJ Case Rep*, 2016, p.bcr2016214638.

Tsagogiorgas, C.. et al., 2012. Aerosolized semifluorinated alkanes as excipients are suitable for inhalative drug delivery - a pilot study. *Int J Pharm*, 422(1–2), pp.194–201.

Valone, J. & McCarthy, M., 1994. Emulsified Anterior Chamber Silicone Oil and Glaucoma. *Ophthalmology*, 101(12), pp.1908–12.

Vaziri, K. et al., 2016. Tamponade in the surgical management of retinal detachment. *Clin Ophthalmol*, 10, pp.471–6.

Veckeneer, M.A. et al., 2008. An epidemic of sticky silicone oil at the Rotterdam Eye Hospital . Patient review and chemical analyses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246(6), pp.917–22.

Vote, B. et al., 2003. Further evidence for proinflammatory nature of perfluorohexyloctane in the eye. *Clin Exp Ophthalmol*, 31(5), pp.408–14.

van der Want, H.J.L.. et al., 1983. Electron Microscopy of Cultured Human Corneas Osmotic Hydration and the Use of Dextran Fraction (Dextran T 500) in Organ Culture. *Arch Ophthalmol*, 101(12), pp.1920–6.

Waring, G.O. et al., 1982. The Corneal Endothelium Normal and Pathologic Structure and Function. *Ophthalmology*, 89(6), pp.531–90.

Wilbanks, G.A. et al., 1996. Perfluorodecalin corneal toxicity: five case reports. *Cornea*, 15(3), pp.329–34.

Williams, K.K. et al., 1992. Correlation of Histologic Corneal Endothelial Cell Counts With Specular Microscopic Cell Density. *Arch Ophthalmol*, 110(8), pp.1146–9.

Winter, M. et al., 2000. Failure of Potassium Siphoning By Müller Cells: A New Hypothesis of Perfluorocarbon Liquid-Induced Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(1), pp.256–61.

Winter, M., Winter, C. & Wiechens, B., 1999. Quantification of intraocular retained perfluorodecalin after macroscopic complete removal. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 237(2), pp.153–6.

Wolf, A.H. et al., 2009. Optimizing the Deswelling Process of Organ-Cultured Corneas. *Cornea*, 28(5), pp.524–9.

Yaman, A. et al., 2007. Interaction with intraocular lens materials: Does heavy silicone oil act like silicone oil? *J Cataract Refract Surg*, 33(1), pp.127–9.

Yang, C.S. et al., 2008. Cytotoxicity of silicone oil on cultivated human corneal endothelium. *Eye*, 22(2), pp.282–8.

Yee, R.W. et al., 1985. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res*, 4(6), pp.671–8.

Zeana, D. et al., 1999. Perfluorohexyloctane as a long-term vitreous tamponade in the experimental animal. Experimental perfluorohexyloctane substitution. *Int Ophthalmol*, 23(1), pp.17–24.

Zhao, M. et al., 2012. Poloxamines for Deswelling of Organ-Cultured Corneas. *Ophthalmic Res*, 48(3), pp.124–33.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
ARPE-19	adulte retinale Pigmentepithel-Zelllinie
BSS	balanced salt solution
cSt	centistoke
ECD	endothelial cell density / Endothelzelldichte
F4H5	Perfluorbutylpentan
F4H6	Perfluorbutylhexan
F4H8	Perfluorbutyloctan
F6H8	Perfluorhexyloctan
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
hBSS	hypotonic balanced salt solution
HCEC	humane corneale Endothelzellen
HSO	heavy silicone oil
IOL	intraocular lens
PBS	phosphate-buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PFCL	Perfluorocarbon liquid / flüssige Perfluorcarbone
PFD	Perfluordecalin
PFO	Perfluoroctan
PFPE	Perfluorierte Polyethere
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPV	Pars-Plana-Vitrektomie
RPE	retinale Pigmentepithelzellen
rMC-1	retinale Müller-Zelllinie
SFA	semifluorierte Alkane

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Verwendete Substanzen_____ 21

Tabelle 2 – Verwendete Instrumente und Verbrauchsmaterial_____ 22

Tabelle 3 – Verwendete Geräte und Software _____ 22

Tabelle 4 – Zusammensetzung des Kulturmediums an Tag 0 und des zum Austausch verwendeten Kulturmediums an Tag 8 (ohne Amphotericin B). ____ 26

Tabelle 5 – Anzahl der ausgewerteten Hornhaut-Präparate („split corneal buttons“) an den jeweiligen Kontrollpunkten. Die Auswertung jeweils einer Hornhaut konnte für Tag 8 in der Kontrollgruppe (control (BSS)) und an Tag 15 in der Gruppe „no BSS“ nicht durchgeführt werden. Die Färbung eines Präparats in der Kontrollgruppe ($d15_{stained}$) erzielte keine ausreichende Färbequalität. Unterschiede in der Präparate-Anzahl wurde mittels Bonferroni-Korrektur begegnet. _____ 34

Tabelle 6 – Deskriptive Statistik der Abnahme der Endothelzelldichte. ECD-Mittelwerte (Mean) wurden an Tag 1 an die Kontrollgruppe (control) angepasst bzw. normalisiert, um im Verlauf eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Der hierbei errechnete Faktor wurde gleichermaßen auf die folgenden Kontrollzeitpunkte (d8, d15) angewandt. Die ECD wird als Zellen/mm² angegeben. _____ 35

Tabelle 7 – Kruskal-Wallis-Test. Ausschließlich an d15 (p = 0,025) fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. An d1 und d8 sind die Unterschiede nicht (d1: p = 1,000) bzw. knapp nicht (d8: p = 0,053) signifikant. DF = dimensions of freedom (Freiheitsgrade)._____ 36

Tabelle 8 – Mann-Whitney-U-Test (ECD). Vergleich der Inkubationsgruppen mit der BSS-Kontrollgruppe an Tag 1, 8 und 15 (gepaarter Vergleich). Allein die Gruppe F4H5 120 min zeigte signifikant niedrigere ECD-Werte an Tag 15 (p = 0,046)._ 36

Tabelle 9 – Absoluter und prozentualer Endothelzellverlust in Woche 1 (d1 bis d8), Woche 2 (d8 bis d15) und über den gesamten Zeitraum (d1 bis d15). Angaben als Median ± 25%/75%-Quartil (in Zellen/mm² bzw. Prozent). _____ 38

Tabelle 10 – Anteil der Reformationsfiguren (≥4 aufeinandertreffende Zellen anstatt drei Zellen (≙ hexagonales Zellbild). Die Inkubationsgruppe F4H5 120min

(10,5 ± 1,2/3,4 % (Median ± 25%/75%-Quartil)) wies signifikant mehr (p = 0,010) Reformationsfiguren auf als die Kontrollgruppe (5,2 ± 2,8/2,0 %). _____ 41

Tabelle 11 – Rosettenformationen. entspricht einer Ansammlung von Zellen, die radiär um eine zugrunde gehende Zelle angeordnet sind und so eine charakteristische Rosettenform annehmen. Die Inkubationsgruppen F4H5 60 min (25,452 ± 8,484/10,605 Rosetten/mm² - p = 0,006) und F4H5 120 min (25,566 ± 8,522/10,653 Rosetten/mm² - p = 0,002) wiesen signifikant mehr Rosettenformationen / mm² auf als die Kontrollgruppe (8,333 ± 0/8,334 Rosetten/mm²)._____ 42

Tabelle 12 – Alizarin-rote Areale als Zeichen von Zelltod. Bei zerstörten Endothelzellen wird durch Alizarinrot S die darunterliegende Descemet-Membran angefärbt. Die Gruppen F4H5 60 min (46,662 ± 4,242/4,241 Alizarin-rote Areale/mm² (Median ± 25%/75%-Quartil); p = 0,007) und 120 min (38,350 ± 8,523/12,983 Alizarin-rote Areale/mm²; p = 0,049) hatten mehr Alizarin-rote Areale/mm² an Tag 15 als die Kontrollgruppe (20,833 ± 10,416/4,167 Alizarin-rote Areale/mm²), die Gruppe F4H5 15min sogar weniger (8,212 ± 0/8,213 Alizarin-rote Areale/mm²; p = 0,043). _____ 44

Tabelle 13 – Vergleich der Zählmethoden (ungefärbt vs. gefärbt). Die Auszählung nach Färbung ergab keine signifikant variierenden Ergebnisse. __ 45

Tabelle 14 – Prozentualer Endothelzellverlust. Verglichen werden Studien mit kultivierten menschlichen Hornhäuten und kultivierten Schweinehornhäuten. __ 49

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Perfluorbutylpentan (F4H5): Generelle Strukturformel semifluorierter Alkane (oben; $F(CF_2)_m(CH_2)_nH$) und Strukturformel von Perfluorbutylpentan (F4H5) (unten). Semifluorierte Alkane bestehen aus einer lipophoben fluorierten Kohlenstoffkette und einer lipophilen Kohlenwasserstoffkette. _____ 7

Abbildung 2 – Präparationsmethoden der Hornhautpräparate. Ganzes Auge (a, whole eye), corneosclerale Exzidate (b, corneo-scleral buttons), corneale Stanzen (c, non-split corneal buttons), lamellierte corneale Stanzen (d, split corneal buttons). _____ 14

Abbildung 3 – Entwicklung der ECD. (a) ECD an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 von „corneal buttons“ (hellgrau) und „split corneal buttons“ (dunkelgrau). (b) Absoluter Endothelzellverlust nach 15 Tagen Inkubation. Der Zellverlust in „split corneal buttons“ fällt signifikant geringer aus als in „corneal buttons“. _____ 15

Abbildung 4 – Morphologische Veränderungen der Endothelzellen. Durch das Präparieren von „split corneal buttons“ kommt es zu vermindertem Zellschaden (a, Endothel von „corneal buttons“; b, Endothel von „split corneal buttons“), was sich in einem geringeren Anteil an Reformationsfiguren (c), weniger Rosettenformationen (d) sowie weniger zerstörten Zellen (e, „alizarin red areas“) zeigt. _____ 16

Abbildung 5 – Einfluss der Präparationsmethode auf die Endothelzellen über einen Zeitraum von 15 Tagen. Corneosclerale Exzidate (a-c2), corneale Stanzen (d-f2), lamellierte corneale Stanzen (g-i2). Aufnahmen an Tag 1 (erste Reihe), Tag 8 (zweite Reihe), Tag 15 (dritte Reihe) und Übersichtsaufnahmen an Tag 15 (vierte Reihe). _____ 17

Abbildung 6 – Schematische Darstellung der Präparation der Hornhautlamelle („split corneal button“). Zunächst wird die Hornhaut mit einem Trepan (ø 7,5mm) in eine Tiefe von 300 µm eingestanzt. Nach horizontaler Abtragung der Lamelle mit flachem Skalpell und Einbringung der Faden-Markierung im Hornhautstroma wird die Hornhaut auf verbliebener Strecke vollständig trepaniert. _____ 25

Abbildung 7 – Schematische Darstellung einer präparierten Hornhautlamelle („split corneal button“). Durch Reduktion der Stroma-Dicke um ca. 300 µm wird das spätere Aufquellen im Zellkulturmedium über den Beobachtungszeitraum von

zwei Wochen deutlich reduziert. Der Faden zur Markierung der Stroma-Seite muss dabei ohne Kontakt zum Hornhautendothel eingebracht werden. _____ 25

Abbildung 8 – Versuchsablauf. Nach Präparation und Einbringung in Kulturmedium an Tag 0 erfolgte je eine Auszählung an Tag 1 (d1), Tag 8 (d8) und Tag 15 (d15). Zusätzlich wurden die Präparate nach der ungefärbten Auszählung an Tag 15 mit einer 0,25 %-Trypanblau-Lösung und 0,2 %-Alizarinrot S-Lösung für die morphologische Auswertung gefärbt. Die Inkubation in F4H5 bzw. BSS erfolgte nach der ersten Auszählung an Tag 1._____ 27

Abbildung 9 – Beispielansicht der Endothelzellen einer Hornhautlamelle während der Auszählung der Zellen. Mithilfe der Software ImageJ (NIH, USA) und dem CellCounter PlugIn (NIH/University of Sheffield, UK) wurden pro Foto die Zellen innerhalb von zwei Quadraten (je 100 µm² ≙ 582 x 582 px auf dem Foto (2080 x 1544 px)) ausgezählt. _____ 28

Abbildung 10 – Hornhautendothel bei 400-facher Vergrößerung. (a) ohne Färbung nach Anschwellen der Endothelzellen in hypotoner BSS-Lösung. (b) Nach Färbung mit Trypanblau und Alizarinrot S. _____ 31

Abbildung 11 – Verwendete morphologische Parameter zur indirekten Quantifizierung von Zelluntergang und -reorganisation. (a) Reformationsfiguren (Aufeinandertreffen von ≥4 Zellen anstatt 3; Pfeile), (b) Rosettenformationen (zentrale untergehende Zelle mit charakteristischer Rosetten-artige Formation von 5 oder mehr umgebenden Zellen; gestrichelter Kreis) und (c) Alizarin-rote Areale (denudierte Descemet-Membran aufgrund zerstörter Zellen; gepunktete Kreise). 32

Abbildung 12 – Abnahme der Endothelzelldichte (ECD) Ausschließlich in der Gruppe F4H5 120 min (dunkelstes blau; 3281 ± 43/222 Zellen/mm²; p = 0.046) zeigte sich an Tag 15 eine signifikant niedrigere ECD im Vergleich zur Kontrollgruppe (control, grün; 3658 ± 129/296 Zellen/mm²). Box-Plots mit Whisker repräsentieren Minimum, Q25%, Median, Q75% und Maximum. Werte außerhalb des Interquartilsabstands (IQR) sind als Punkte dargestellt. * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p < 0,05)._____ 37

Abbildung 13 – Absoluter (A, Median ± 25%/75%-Quartil) **und prozentualer** (B) **Endothelzellverlust** (Median) in Woche 1 (d1 to d8) und Woche 2 (d8 to d15). Box-Whisker-Plot mit Minimum, Q25%, Median, Q75% und Maximum; Werte außerhalb des Interquartilsabstands (IQR) sind als Punkte dargestellt. _____ 39

Abbildung 14 – Repräsentative Ausschnitte der „split corneal buttons“ an Tag 1 (d1; A1-E1, erste Spalte), Tag 8 (d8; A2-E2, zweite Spalte), Tag 15 (d15; A3-E3, dritte Spalte) und d15 nach Färbung ($d15_{stained}$; A4-E4, vierte Spalte) bei 400-facher Vergrößerung. Die Präparate wurden an d15 mit Trypanblau und Alizarinrot S gefärbt. Die Inkubation erfolgte an Tag 1 in BSS (A) bzw. F4H5 (Perfluorbutylpentan) für (B) 15 min, (C) 30 min, (D) 60min, (E) 120 min. _____ 40

Abbildung 15 – Anteil der Reformationsfiguren (reformation figures) in Prozent in den verschiedenen Inkubationsgruppen. Reformationsfiguren entstehen bei Zellverlust, wenn anstelle von drei Zellgrenzen (≙ hexagonales Zellbild), ≥ 4 Zellgrenzen auf einem Punkt aufeinandertreffen. Die Inkubationsgruppe F4H5 120 min (dunkelstes blau) zeigte diesbezüglich signifikant (p = 0,010) mehr Reformationsfiguren/mm² als die Kontrollgruppe (grün). Box-Plots mit Whisker repräsentieren Minimum, Q25%, Median, Q75%, Maximum; Werte außerhalb des Interquartilsabstands (IQR) sind als Punkte dargestellt. * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p < 0,05)._____ 42

Abbildung 16 – Rosettenformationen. In den Gruppen F4H5 60 min (p = 0,006) und F4H5 120 min (p = 0,002) zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr Rosettenformationen (charakteristisches konzentrisches Aufeinandertreffen mehrerer Zellen auf einen Punkt in Form einer Rosette). Box-Plots mit Whisker repräsentieren Minimum, Q25%, Median, Q75%, Maximum. * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p < 0,05)._____ 43

Abbildung 17 – Alizarin-rote Areale. Entspricht Zellen, die zum Kontrollzeitpunkt zerstört sind. Die Gruppen F4H5 60min (46,662 ± 4,242/4,241 Alizarin-rote Areale/mm² (Median ± 25%/75%-Quartil); p = 0,007) und F4H5 120 min (38,350 ± 8,523/12,983 Alizarin-rote Areale/mm²; p = 0,049) hatten signifikant mehr Alizarin-rote Areale/mm² als die Kontrollgruppe 20,833 ± 10,416/4,167 Alizarin-rote Areale/mm². Die Gruppe F4H5 15 min (8,212 ± 0/8,213 Alizarin-rote Areale/mm²; p = 0,043) wies hingegen weniger auf. Box-Plots mit Whisker repräsentieren Minimum, Q25%, Median, Q75%, Maximum; Werte außerhalb des Interquartilsabstands (IQR) sind als Punkte dargestellt. * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p < 0,05)._____ 44

Abbildung 18 – Quantitativer Vergleich der Auszählung der Endothelzelldichte ungefärbter (blau) und gefärbter (rot) „split corneal buttons“ in den jeweiligen

Inkubationsgruppen. Die Färbung erfolgte mit Trypanblau und Alizarinrot S. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der ECD-Zählung innerhalb der Inkubationsgruppen ohne (unstained) bzw. mit (stained) Färbung. Box-Plots mit Whisker repräsentieren Minimum, Q25%, Median, Q75%, Maximum; Werte außerhalb des Interquartilsabstands (IQR) sind als Punkte dargestellt._____ 46

Abbildung 19 - Übersicht über das spezifische Gewicht erwähnter Substanzen (Meinert & Roy 2000; Cazabon et al. 2011; Vaziri et al. 2016)**.** _____ 52

7.4 Veröffentlichungen

Aus dieser Dissertation hervorgegangene Veröffentlichungen:

- **Effects of perfluorobutylpentane (F4H5) on corneal endothelial cells.**
  Wenzel DA, Kunzmann BC, Druchkiv V, Hellwinkel O, Spitzer MS, Schultheiss M.
  Curr Eye Res. 2019 Aug;44(8):823-831. doi: 10.1080/02713683.2019.1597891. Epub 2019 Apr 24.
- **Staining of endothelial cells does not change the result of cell density.**
  Wenzel DA, Kunzmann BC, Spitzer MS, Schultheiss M.
  Cell Tissue Bank. 2019 Jun;20(2):327-328. doi: 10.1007/s10561-019-09759-6.
  Epub 2019 Feb 27.

8 Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. S. Spitzer, Ärztlicher Direktor der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE), für die Überlassung dieser Arbeit und die stets unkomplizierte Betreuung als Doktorvater.

Außerordentlich bedanken möchte ich mich für die sehr gute Betreuung bei Herrn PD Dr. med. M. Schultheiß, Leitender Oberarzt der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE), der durch viel Engagement eine supportive und konstruktive Zusammenarbeit ermöglichte.

Herrn PD Dr. rer. nat. O. Hellwinkel und Frau S. Altenähr von der Lions-Hornhautbank des Instituts für Rechtsmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) danke ich für die stete Hilfsbereitschaft sowie für konstruktives Feedback bei Rückfragen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. med. B. Kunzmann von der Universitäts-Augenklinik Tübingen für die gewissenhafte Einarbeitung in die verwendete Methodik im Labor der Augenklinik Tübingen bedanken, was mir den Beginn der Laborarbeit in Hamburg sehr erleichtert hat.

Schließlich gilt ganz besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg uneingeschränkt unterstützt und mir den zukünftigen Werdegang ermöglicht haben.

Vielen Dank.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Daniel Alexander Wenzel
Geburtsdatum:	17.01.1993
Geburtsort:	Tübingen
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Ausbildung

10/13 – 11/19	**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)** Studium der Humanmedizin (Modellstudiengang iMED)
09/12 – 09/13	**Deutsches Rotes Kreuz Tübingen e.V.** Bundesfreiwilligendienst (BFD), Rettungssanitäter
09/03 – 06/12	**Uhland-Gymnasium, Tübingen** Abitur
08/09 – 08/10	**Cazenovia High School, Cazenovia, NY, USA** Einjähriger Auslandsaufenthalt

Berufspraktische Erfahrungen

Praktisches Jahr

07/19 – 10/19	**Augenheilkunde** Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg
05/19 – 06/19	**Allgemein-/Viszeralchirurgie** New Somerset Hospital, Cape Town, SA
03/19 – 05/19	**Unfallchirurgie/Notaufnahme** Universitätsspital Zürich, Zürich, CH
11/18 – 03/19	**Innere Medizin** Zuger Kantonsspital, Baar, CH

Famulaturen

04/18	**Hämatologie** - National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA
09/17	**Interdisziplinäre Notaufnahme** - Albertinen-Krankenhaus, Hamburg
09/16	**Augenheilkunde** - Universitäts-Augenklinik Tübingen, Tübingen
03/16	**Innere Medizin/Allgemeinmedizin** - Internisten Eppendorf, Hamburg
09/15	**Unfallchirurgie/Orthopädie** - Oberschwabenklinik, Ravensburg

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

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

Ort, Datum Unterschrift: Daniel Wenzel