

Für meine Eltern

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Kommissarische Direktorin: Dr. med. U. Stuhlträger**

**Die Beschaffenheit von Schnittflächen nach Präparation von lamellären
Hornhauttransplantaten bei Verwendung verschiedener Schneidsysteme – analysiert anhand
von rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen an humanen und porcinen Hornhäuten**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

erstellt in der Augenklinik der HELIOS Kliniken Schwerin

von Sümeyra Ayik

geboren am 17.02.1981 in Hamburg

Betreuer: Prof. Dr. med. F. Wilhelm

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Wilhelm

2. Prof. Dr. med. T. Hollemann

3. Prof. Dr. med. P. Szurman

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 06.11.2012

Datum der Verteidigung: 19.11.2013

Referat

Fragestellung: Die DSAEK (Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty) hat sich zur Therapie endothelialer Hornhauterkrankungen etabliert. Verschiedene Schneidgeräte werden zur Gewinnung posteriorer Lamellen eingesetzt. Die Darstellung des Einflusses der Schnittfläche an humanen und porcinen Hornhäuten nach Einsatz verschiedener Schneidgeräte war Gegenstand dieser Untersuchung.

Methode: Die lamellären Keratotomien wurden an humanen und porcinen Hornhäuten durchgeführt. Es kamen drei Mikrokeratome und zwei Femtosekundenlaser (FSL) zum Einsatz. Folgende Geräte wurden untersucht: Gebauer SL Mikrokeratom (Medizintechnik GmbH, Neuhausen), Moria CBm Mikrokeratom (Moria S. A., Antony/Frankreich), Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom (T.MED, Schweiz), VisuMaxTM FSL (Carl Zeiss Meditec AG, Jena) und TissueSurgeon FSL (ROWIAK GmbH, Hannover). In der Serie der Mikrokeratome wurden jeweils acht Schnitte an humanen und porcinen Hornhäuten durchgeführt. In der Schnittserie der Femtosekundenlaser wurden mit dem VisuMaxTM FSL ausschließlich acht humane Hornhäute und mit dem TissueSurgeon Lasermikrotom acht porcine Hornhäute geschnitten. Zur Beurteilung der Präparate wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Anhand eines semiquantitativen Score-Systems erfolgte die Bewertung der Schnittflächen.

Ergebnisse: Die erzielten Punktzahlen lagen in der gesamten Schnittserie zwischen 36 und 55 % von möglichen 88 Punkten. Bei den Mikrokeratomen erreichte das Gebauer SL Mikrokeratom mit 50 % die höchste Bewertung bei den porcinen Präparaten. In der Serie der humanen Hornhäute wurde für das Moria CBm Mikrokeratom mit 42 % die Höchstpunktzahl vergeben. In der Serie der porcinen Hornhäute erzielte der TissueSurgeon FSL 55 % von der Maximalpunktzahl und damit die höchste Bewertung bei den untersuchten Schneidgeräten. 36 % erzielte der VisuMaxTM FSL in der Serie der humanen Hornhäute.

Zusammenfassung: Bei der Schnittflächenbewertung der Mikrokeratome wurden in der Serie der porcinen Hornhäute homogenere Resultate als bei den humanen Hornhäuten beobachtet, ausgenommen das Moria CBm Mikrokeratom. Auch bei den Femtosekundenlasern war in der Serie der humanen Hornhäute im Vergleich zu den Schweinehornhäuten eine unebene und raue Oberfläche sichtbar. Mit dem VisuMaxTM FSL wurden vergleichbare Ergebnisse wie bei den Mikrokeratomen erreicht.

Ayik, Sümeyra: Experimentelle Untersuchungen zur Beurteilung der Beschaffenheit von Schnittflächen nach Präparation von lamellären Hornhauttransplantaten bei Verwendung verschiedener Schneidgeräte – analysiert anhand von rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen an humanen und porcinen Hornhäuten. Halle/Saale, Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie und Physiologie der Hornhaut	1
1.2 Die Keratoplastik	4
1.3 Problemstellung	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Untersuchungsmaterial	13
2.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	15
2.3 Vorstellung der verwendeten Schneidgeräte	17
2.4 Score zur Bewertung der REM-Bilder	24
2.5 Statistische Methoden	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Untersuchungen an Schweinehornhäuten	27
3.2 Untersuchungen an humanen Hornhäuten	31
3.3 Vergleich der verschiedenen Schneidsysteme	35
3.4 Vergleich der Schnittflächen an humanen und porcinen Hornhäuten	38
4 Diskussion	43
4.1 Methodenkritik	43
4.2 Kritische Bewertung der verschiedenen Schneidsysteme	44
4.3 Gegenüberstellung der Schnittflächen an humanen und porcinen Hornhäuten	46
4.4 Vergleich der Resultate mit anderen Studien	47
4.5 Schlussfolgerungen und Ausblicke	48
4.6 Zusammenfassung	49

4.7 Literaturverzeichnis	51
Anlagen	60
Thesen	77
Eidesstattliche Erklärung	
Erklärung für frühere Promotionsversuche	
Lebenslauf	
Danksagung	

Abkürzungen

ALK	Anteriore lamelläre Keratoplastik
dpt	Dioptrien
DALK	Deep Anterior Lamellar Keratoplasty
DLEK	Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty
DM	Descemet'sche Membran
DMEK	Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty
DSAEK	Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty
FLEx	Femtosekunden-Lentikel-Extraktion
FSL	Femtosekundenlaser
HE	Hämatoxcilin-Eosin
IOD	intraokularer Druck
LKP	Lamelläre Keratoplastik
LASIK	Laser-in-situ-keratomileusis
MK	Mikrokeratom
PKP	Perforierende Keratoplastik
PLK	Posteriore lamelläre Keratoplastik
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	rounds per minute (Klingenbewegungen pro Minute)
RST	Residual stromal thickness
SD	Standardabweichung
SF	Schnittfläche
WP	Waschpuffer

1 Einleitung

Die Hornhaut ist ein transparentes und avaskuläres Gewebe, das als primäre Barriere gegen Infektionen dient. Durch den darüber liegenden Tränenfilm bietet sie eine glatte refraktive Oberfläche am Auge. Die Transparenz der Hornhaut resultiert aus vielen Faktoren und ist das Ergebnis der Anatomie und Physiologie der einzelnen Zellbestandteile der Hornhaut [1]. Diese Transparenz wird durch die minimale Streuung des einfallenden Lichtes in der normalen Hornhaut infolge der parallelen Lage der Kollagenfibrillen im Stroma gewährleistet. Das Endothel mit seinem aktiven Stoffwechsel bewirkt die Erhaltung der Transparenz und des physiologischen Wasserhaushaltes. Bei einer getrübbten Hornhaut ist die parallele Anordnung des Kollagengitters aufgehoben und es entstehen somit Unordnungen, welche zu Kollagenverdichtungen bzw. kollagenfreien Arealen führen [2]. In vielen Fällen ist die Keratoplastik mit dem Ersatz des pathologisch veränderten Gewebes mittels einer Spenderhornhaut die einzige Möglichkeit, solche Trübungen, Verformungen, Narbenbildungen nach schweren Verletzungen oder Entzündungen der Hornhaut zum Erhalt des Auges und zur Verbesserung des Sehvermögens zu behandeln.

1.1 Anatomie und Physiologie der Hornhaut

Die Hornhautform- und -krümmung wird vom intrinsischen und extrinsischen biomechanischen Umfeld beeinflusst [1]. Ihre Brechkraft macht mit ca. +43 Dioptrien (dpt) mehr als zwei Drittel der Gesamtrefraktion des Auges aus [2]. Die Hornhaut besitzt eine meniskusartige Form, deren Krümmungsradius zentral im Mittel ca. 7 mm beträgt und nach peripher zunimmt, was zur Reduzierung der Brechkraft und damit auch zur Verringerung der sphärischen Ablenkung führt. Der horizontale Durchmesser der Hornhaut ist um ca. 1 mm größer als der vertikale und liegt im Durchschnitt horizontal bei 11,7 mm und vertikal bei 10,6 mm [2]. Als „Limbus corneae“ bezeichnet man die etwa 1,5 mm breite korneosklerale Übergangszone, in der Hornhaut, Sklera und Bindehaut zusammen treffen. In dem am Limbus gelegenen Epithel befinden sich die Langerhans-Zellen, welche dendritische Fortsätze besitzen und immunkompetente Zellen darstellen [3]. Da die Hornhaut frei von Blutgefäßen ist, erfolgt die Ernährung über das vom Ziliarkörper gebildete Kammerwasser, die Tränenflüssigkeit und über das Randschlingennetz der Bindehautgefäße sowie aus Endzweigen der Gesichts- und Augenerien [1]. Die Hornhaut gehört zu den am dichtesten sensibel innervierten und damit empfindlichsten Geweben des menschlichen Körpers. Die Innervation erfolgt über Äste des N. ophthalmicus (N. nasociliaris), der ersten Abzweigung des N. trigeminus. Nach Keratoplastiken ist die nervale Regeneration oft auch noch Jahre später nur unvollständig [1, 3].

Die Hornhaut ist aus 3 zellulären Schichten (Epithel, Stroma, Endothel) und aus einer Lamelle (Bowman-Lamelle) und einer Membran (Descemet'sche Membran) aufgebaut (vgl. **Abb. 1**) [1].

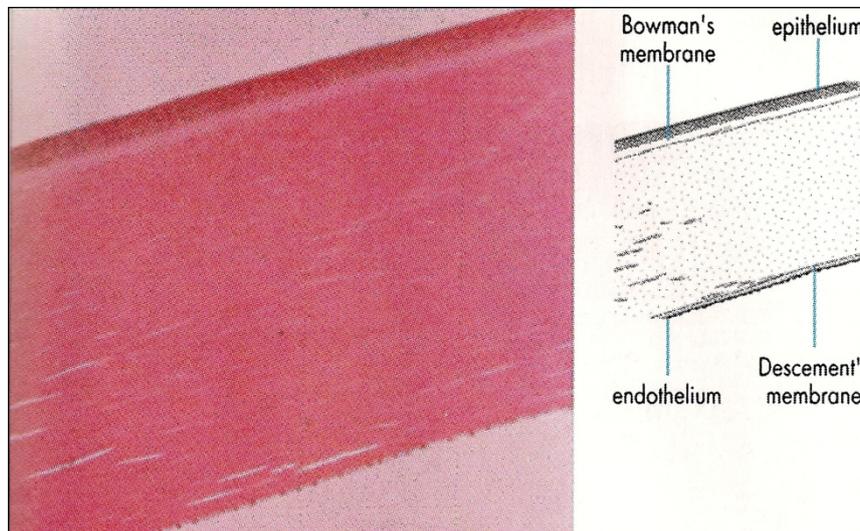


Abb. 1: Histologischer Schnitt einer regulären Hornhaut in HE-Färbung nach DelMonte et al. [1].

Epithel: Das unverhornte Plattenepithel bildet eine aus vier bis sechs Zellschichten aufgebaute, etwa 50 μm dicke Schicht und macht etwa 10 % der Hornhautdicke aus [3, 4]. Es ist morphologisch in drei Schichten unterteilt. Außen befinden sich in der Regel zwei Schichten der oberflächlichen Zellen, der Superfizialzellen. Zentral sind diese 4-6 μm und peripher nur 2 μm dick [4]. Die äußerste Schicht enthält Mikrovilli und Mikroplicae, welche eine Vergrößerung der Oberfläche und zusammen mit der Glykokalyx eine bessere Haftung der Mukusschicht des Tränenfilms bewirken [3]. Der Tränenfilm dient als Barriere, schützt so vor bakteriellen Invasionen sowie vor Chemikalien, Toxinen und Fremdkörpern. Außerdem enthält der Tränenfilm immunologische Bestandteile und Wachstumsfaktoren, die für die epitheliale Gesundheit, Proliferation und Reparatur wichtig sind [1]. Es folgt die mittlere Schicht. Unter der oberflächlichen Zellschicht und unmittelbar vor der tiefsten Basalschicht befinden sich die Flügelzellen, die durch eine große Anzahl von Tonofilamenten, Desmosomen und Gap junctions gekennzeichnet sind [1, 3]. Des Weiteren sind zwischen den Epithelzellen dendritische Zellen, d. h. Langerhans-Zellen und pigmentierte Melanozyten lokalisiert, die eine besondere Rolle bei der Transplantatabstoßung spielen und bis in die zentrale Hornhaut einwandern können [3]. Die dritte Schicht des Epithels bildet die Basalzellschicht. Sie besteht aus einer einzigen Lage zylinderförmiger Zellen, die durch Hemidesmosomen auf der unter ihr gelegenen 48 nm dicken Basalmembran haften. Diese starke Bindung verhindert die Abtrennung des Epithels von der darunterliegenden Schicht [1, 3]. Sie zeichnet sich durch eine hohe Mitoserate aus und trägt

somit zur Regeneration des Epithels bei. Unter dem Epithel schließt sich die Bowman-Lamelle an. Die azelluläre ca. 30 µm dicke Schicht besitzt eine unregelmäßige Rückfläche und ist vom Hornhautstroma schwer ablösbar. Die Bowman-Lamelle enthält multiple Kollagenmikrofilamente und ist dadurch sehr widerstandsfähig, aber nicht regenerationsfähig, so dass sie bei Verletzungen vernarbt [1, 2].

Stroma: Das Stroma macht 85-90% der Hornhautdicke aus. Es ist reich an Kollagenen (vor allem Typ I, Typ III, Typ V), Mukopolysacchariden und enthält keine Blutgefäße [2]. Die Kollagenfibrillen der Hornhaut stellen bei einem Durchmesser von 25-30 nm die dünnsten Kollagenfibrillen im menschlichen Körper dar und sind in eine wasserspeichernde Grundsubstanz aus Glykosaminoglykanen eingebettet, die mit ihrer konstanten Molekülgröße für einen gleichbleibenden Abstand zwischen den Kollagenfibrillen sorgen. Nur durch die regelmäßige Schichtung in relativ dehydriertem Zustand durch die endotheliale Pumpe kann die Transparenz dieses Gewebes gewährleistet werden [2, 5]. Das vordere Hornhautstroma spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Hornhautkrümmung. Organisatorische Unterschiede in der Anordnung der Kollagenbündel des vorderen Stromas können zu einer Stabilisierung in diesem Bereich beitragen und sind eine Erklärung dafür, dass der vordere Stromaabschnitt einer Hydratation viel besser widerstehen kann als das posteriore Stroma, das viel leichter dazu neigt in diesen Situationen Falten auszubilden [1].

Descemet'sche Membran: Die Descemet'sche Membran (DM) trennt die innere Oberfläche des Hornhautstromas vom Hornhautendothel. Sie kann bis zu 12 µm dick sein, hat bei der Geburt eine Dicke von etwa 3 µm und entspricht der Basalmembran des Endothels. Diese elastische und widerstandsfähige Membran enthält Kollagen vom Typ IV und wird elektronenmikroskopisch in 2 Schichten unterteilt [2, 5].

Endothel: Auf der Descemet'schen Membran sitzt das einschichtige Endothel, welche Endothelzellen mit hexagonaler Form enthält (ca. 4-6 µm dick und 20 µm breit) und durch seine Dichte für die Transparenz der Hornhaut mitverantwortlich ist. Diese Zellschicht reguliert zum Einen die Ernährung des Stromas durch den Austausch von Stoffwechselprodukten zwischen Kammerwasser und Stroma und zum Anderen den Quellungsstatus, in dem es zur Aufrechterhaltung eines konstanten Wassergehaltes der Hornhaut beiträgt. Die Transparenz der Hornhaut wird somit auch durch die endotheliale Schicht bewirkt, die mit Hilfe von Pumpmechanismen den dehydrierten Zustand aufrecht erhält. Diese Monoschicht besitzt eine wabenartige Mosaikstruktur. Im Laufe des Lebens ändert sich die Dichte und Topographie der Endothelzellen. Die zentrale Endothelzellendichte nimmt mit einer durchschnittlichen Rate etwa 0,6 % pro Jahr ab [1, 3, 4].

1.2 Die Keratoplastik

Eine Vielzahl von Hornhauterkrankungen führt zu Trübungen, die eine Hornhauttransplantation, auch als Keratoplastik bezeichnet, notwendig machen. Die Indikation zu dieser Operation wird nach den folgenden Kriterien eingeteilt: **optisch**, **tektonisch** und **therapeutisch**. Zu den **optischen** Indikationen gehören die zentralen Hornhauttrübungen bei hereditären Dystrophien, die bullösen Keratopathien wie z. B. die Fuchs'sche Endotheldystrophie, Wölbungsanomalien mit pathologischen Verdünnungen des Stromas bei einem Keratokonus sowie zentrale Hornhautnarben nach schweren Verletzungen oder Entzündungen. Dabei ist immer die Verbesserung des Sehvermögens das Ziel der Transplantationen. Zum Erhalt des Bulbus werden **tektonische** Keratoplastiken bei schweren strukturellen Schäden der Hornhaut wie z. B. bei Verdünnung der Hornhaut bis zur Descemetozele, bei einem perforierten Hornhautulkus oder bei einem rheumatischen Randulkus, welches nach einer akuten Entzündung entstanden ist, durchgeführt. Sprechen konservative Behandlungsmaßnahmen bei schwerwiegenden bakteriellen oder viralen Hornhautentzündungen nicht an, kann in Ausnahmefällen eine **therapeutische** Notfall-Keratoplastik (Keratoplastik „à chaud“) notwendig sein [6]. In seltenen Fällen kommt eine kosmetische Keratoplastik in Frage, um das äußere Erscheinungsbild zu verbessern, auch wenn dadurch keine Visusverbesserung erreicht wird. Bei einer Hornhauttransplantation wird entweder trübes oder unregelmäßig gekrümmtes Hornhautgewebe des Empfängers durch gesundes Gewebe des Spenders ersetzt. Das heißt, es werden entweder alle Schichten der erkrankten Hornhaut in einem den Bulbus eröffnenden Eingriff mittels eines Trepans entfernt und das entsprechende Hornhautscheibchen eines geeigneten Spenders als **perforierende Keratoplastik (PKP)** eingefügt oder lamellär, welche als **tiefe anteriore** oder als **posteriore lamelläre Keratoplastik (LKP)** erfolgen kann, nur die betroffenen Schichten der Hornhaut ausgetauscht.

Perforierende Keratoplastik

Seit etwa 1930 bis weit in die 90er Jahre war die perforierende Keratoplastik auch bei endothelialen Hornhauterkrankungen der „Goldstandard“. Sie wird weltweit mit mehr als 60.000 Operationen pro Jahr als häufigste Gewebetransplantation und allein in Deutschland etwa 5.000 mal pro Jahr durchgeführt [6]. Im Jahre 1905 war es Eduard Zirm gelungen, die erste erfolgreiche Hornhauttransplantation bei einem 45-jährigen Patienten durchzuführen, nachdem dieser durch eine Kalkverätzung beidseits eine leukomatös veränderte Hornhaut hatte. Er transplantierte die Hornhaut eines 11-jährigen Jungen, bei dem es intraoperativ beim Versuch einen intraokularen Metallfremdkörper zu entfernen, zu schwerwiegenden Komplikationen gekommen war und letztendlich eine Enuclatio bulbi durchgeführt werden musste. Mittels Trepanation wurde das Spendergewebe entfernt und erfolgreich in das linke Auge des Patienten eingesetzt. Auch 7 Monate postoperativ war ein klares und gut im Niveau angepasstes Transplantat sichtbar [7]. Dieser Erfolg

motivierter Ophthalmologen der damaligen Zeit auf diesem Gebiet weiter zu arbeiten. In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts gab es zahlreiche Innovationen auf dem Gebiet der Hornhauttransplantation. Nachdem die immunologischen Verhältnisse analysiert worden waren, konnte dieses Wissen auch bei der Hornhauttransplantation eingesetzt werden. Durch das bessere Verständnis der Behandlung von immunologischen Problemen nach Studien von Medwar, Billingham und Barker hatte der Erfolg der PKP begonnen. Demnach resultiert das immunologische Privileg der Kornea aus ihren histologischen und anatomischen Bestandteilen [8]. Heute ist bekannt, dass aufgrund der fehlenden Blut- und Lymphversorgung der Hornhaut der Vorderabschnitt des Auges ein immunprivilegiertes Kompartiment darstellt, welches unter anderem durch Arbeiten von Streilein et al. bestätigt wurde [9]. Auch die Einführung der postoperativen Therapie mit Steroiden verlängerte das Überleben eines klaren Hornhauttransplantates [10, 11]. Die Weiterentwicklung der mikrochirurgischen Technik, die Optimierung der postoperativen Pharmakotherapie zur Abstoßungs- und Infektionsprophylaxe sowie die postoperative Nachsorge mit der Reduktion der Inzidenz von Immunreaktionen haben den Eingriff der Hornhauttransplantation zu einer Routine-Operation mit geringem Risiko und guten postoperativen Ergebnissen werden lassen. Durch Castroviejo in Amerika und durch Löhlein in Deutschland fand die Keratoplastik eine rasante Verbreitung [12, 13]. Um die Versorgung mit Spenderhornhäuten zu verbessern, wurde 1981 die erste deutsche Hornhautbank in Hamburg eingerichtet [14]. Durch die Lagerung von Spenderhornhäuten in Hornhautbanken konnten nun Transplantate für die Keratoplastik kontinuierlich zur Verfügung gestellt werden. Die Hornhauttransplantation wurde zu einer planbaren OP.

Lamelläre Keratoplastik

Da sich etwa 40 % der Indikationen zur Keratoplastik auf die pathologisch veränderte Endothelschicht beschränken (Fuchs'sche Endotheldystrophie, bullöse Keratopathie nach Katarakt-Operation, Keratopathie beim Pseudoexfoliationssyndrom), ist es das Ziel der Operateure nur diese erkrankte Schicht der Hornhaut zu ersetzen [15]. Arthur von Hippel gelang es 1988 mit Hilfe eines von ihm entwickelten uhrwerkgetriebenen Hornhauttrepans die erste lamelläre Keratoplastik durchzuführen [16, 17]. Die Verbreitung dieser Methoden wurde aber in der damaligen Zeit durch technische Schwierigkeiten verhindert. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts gab es immer wieder Versuche, die lamellären Techniken erneut einzuführen, wobei postoperative Komplikationen wie die „Interface-Problematik“ und Fibrose im Stroma („Haze“ = homologer Stroma-Stroma-Kontakt) zu einer Visuslimitierung führten und deshalb die LKP lange Zeit nur auf tektonische Eingriffe beschränkt wurde [13]. Ende der 90er Jahre kam es dann zu einer rasanten Entwicklung lamellärer Techniken, so dass die LKP wie z. B. in einigen angelsächsischen und südeuropäischen Ländern standardmäßig eingesetzt wird. Je nachdem, welche Schicht ersetzt werden muss, kann man bei der LKP zwischen anteriorem und posteriorem Verfahren unterscheiden. Bei dieser Operation handelt es sich um eine

homologe und nicht wie bei der LASIK um eine autologe Technik. Eine vordere lamelläre Keratoplastik kommt bei stromalen Erkrankungen wie z.B. bei einem Keratokonus oder bei Narben und Trübungen im vorderen Stroma in Frage, um das intakte Empfängerendothel der Hornhaut zu erhalten. Dabei wird die konventionelle anteriore lamelläre Keratoplastik (ALK) von der tiefen anterioren Keratoplastik (Deep Anterior Lamellar Keratoplasty, DALK) unterschieden [18]. Ein schematischer Vergleich der verschiedenen lamellären Keratoplastik-Techniken ist in **Abbildung 2** dargestellt.

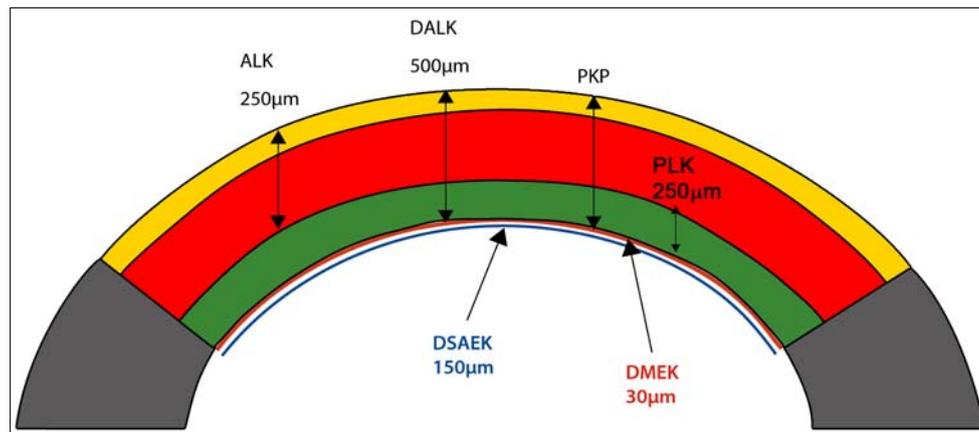


Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen lamellären Keratoplastik-Techniken (ALK, DALK, PKP, PLK, DSAEK, DMEK nach Maier et al. [18]).

Die ALK, bei der nur der erkrankte Teil des Stromas durch eine entsprechende Spenderhornhautlamelle ersetzt wird, kann manuell oder Mikrokeratom-gesteuert durchgeführt werden, wobei dieses Verfahren wegen visusreduzierenden Interface-Unregelmäßigkeiten oftmals schlechtere postoperative Ergebnisse als bei der PKP erreicht [18]. Bei der DALK wird das Hornhautstroma des Empfängers bis auf die Descemetmembran und die daran anhaftenden Endothelzellen entfernt. Danach wird das Hornhauttransplantat, bei dem vorher die Descemet'sche Membran entfernt wurde, meist mit fortlaufenden Nähten, wie sie sich bei der PKP bewährt haben, eingenäht. Da bei dieser Technik keine Stromalamellen aufeinander treffen, gibt es hier nur minimale Interfacereaktionen und somit meist bessere Visusergebnisse als bei der ALK [18]. Hauptvorteil der DALK ist das Vermeiden von endothelialen Immunreaktionen, da das verbliebene Wirtsendothel erhalten bleibt [19]. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um das Stroma komplett bis auf die Decemet'sche Membran entfernen zu können. Hierbei kommt zum Einen die Technik von Melles et al. zum Einsatz, bei der zunächst die Vorderkammer mit Luft gefüllt wird und anschließend über eine 30 Gauge-Kanüle vor der Descemet'schen Membran Viskoelastikum injiziert und dadurch die Trennung von Stroma und DM gewährleistet wird [20]. In der Praxis hat sich die sog. „Big bubble“-Technik von Anwar et al. durchgesetzt, bei der anstelle von Viskoelastikum Luft in das tiefe Stroma injiziert wird, wodurch die sog. „Big bubble“ die Descemet'sche Membran vom Stroma trennt [21].

Weitere mögliche Techniken wie die sog. „Water-pillow“-Technik sind von Krumeich et al. beschrieben, bei der über ein Trepannsystem 90 % des Stromas trepaniert werden und das übrige Reststroma mit Flüssigkeit aufgeschäumt und anschließend eine Wasserblase vor die DM gespritzt wird [22]. Bei all diesen beschriebenen Verfahren besteht die Gefahr der Descemet-Perforation und damit verbunden die Notwendigkeit der Umstellung auf eine PKP, wovon zahlreiche Autoren berichteten [23-25]. Vor allem bei Patienten mit einem Keratokonus und einer Hornhautdicke unter 250 µm besteht ein erhöhtes Risiko für eine Perforation [26]. Die Indikationen für eine DALK sind, um das primär gesunde Endothel des Empfängers zu erhalten, der Keratokonus sowie epitheliale und stromale Hornhautdystrophien. Die Visusergebnisse sind aber bei einer DALK im Vergleich zu einer PKP bei gleichen Indikationen meist schlechter, da sehr oft nur eine unvollständige Descemet-Präparation erreicht wird [18]. Sugita und Mitarbeiter konnten in ihren Studien bezüglich der Sehschärfe und Endothelzellzahl bei Patienten (47 von 120) mit intraoperativer Verletzung der DM 24 Monate postoperativ, im Vergleich zu den Patienten ohne Läsion der DM, keinen Unterschied beobachten [27].

Hintere lamelläre Keratoplastik

Da bei isolierten Hornhautendothelerkrankungen die Transplantation der gesamten Hornhaut eine Übertherapie darstellt, gab es schon in den 60er Jahren erste Versuche, nur den betroffenen hinteren Anteil der Hornhaut auszutauschen. Ende der 90er Jahre wurde die Methode der Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty (DLEK) von Melles et al. weiterentwickelt [28]. Am niederländischen Institut für Innovative Augenchirurgie in Rotterdam entwickelte diese Arbeitsgruppe Konzepte zur Behandlung von Endotheldystrophien [29]. 1998 wurde hier die erste Patientin mit einer DLEK versorgt. Bei Patienten mit erkranktem Hornhautendothel kommen verschiedene Formen der posterioren lamellären Technik in Frage, wobei selektiv die erkrankte Endothelschicht ersetzt wird. Man unterscheidet die posteriore Keratoplastik, posteriore lamelläre Keratoplastik von der DLEK, Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (DSAEK) und seit neustem Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK). Bei der posterioren Keratoplastik wird eine tiefe Lamelle mit Hilfe eines Mikrokeratoms geschnitten und aufgeklappt. Das posteriore Stroma wird trepaniert und durch ein Spender-Präparat ersetzt. Dieses wird mit Nähten fixiert und anschließend vom Flap bedeckt, welcher auch mit Nähten fixiert wird. Aufgrund der hohen Komplikationsrate von 21 %, bei der die Risiken der lamellären und perforierenden Keratoplastik vereint werden, wird diese Technik nicht mehr eingesetzt [18]. Eine weitere Möglichkeit ist die posteriore lamelläre Keratoplastik (PLK) bzw. die Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty (DLEK). Ziel dieses Vorgehens ist es einen „open-sky-Eingriff“ zu vermeiden, indem das endothel-tragende Gewebe über einen korneoskleralen Zugang eingesetzt wird [18]. Der Begriff „deep lamellar keratoplasty“ wurde von Archila (1984) eingeführt. Er war es auch, der als Erster die Methode der intrastromalen Luftinjektion mit einer

Spritze zur leichteren Trennung der Lamellen nahe der Descemet'schen Membran beschrieben hat [30]. Eine ähnliche Technik wurde 1989 von Price beschrieben [31]. Auch Melles et al. konnten Ende der 90er Jahre in ihren Versuchsmodellen nachweisen, dass eine posteriore lamelläre Keratoplastik über eine limbale Inzision und eine Stromatasche durchgeführt werden kann und diese Methode ein potenzielles chirurgisches Verfahren zur Therapie endothelialer Hornhauterkrankungen darstellt. Er nannte diese Methode posteriore lamelläre Keratoplastik [18, 28, 29]. Terry führte die Bezeichnung „Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty“ (DLEK) ein. Bei dieser lamellären Technik wird am Empfänger über einen korneoskleralen Zugang ein Scheibchen aus dem hinteren Stroma mit Descemet'scher Membran und Endothel manuell präpariert, trepaniert und entfernt. Anschließend wird ein entsprechendes Spenderscheibchen, welches manuell oder mittels Mikrokeratom gewonnen wurde über den korneoskleralen Zugang in die Vorderkammer verbracht und mit Luft fixiert [18]. Das Transplantat wird somit ohne Nähte adaptiert. Dieses Verfahren induziert im Gegensatz zur sogenannten „posterioren Keratoplastik“ kaum Astigmatismus [32, 33]. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass der postoperative Endothelzellverlust bei einer DLEK vergleichbar dem nach einer PKP war [32, 34]. Aufgrund der schwankenden Visusresultate und visuslimitierenden Interface-Unregelmäßigkeiten, die bei den Untersuchungen von Terry und Melles et al. auffielen, wurde schließlich die Technik der DLEK weiterentwickelt und verfeinert und durch das Verfahren der „Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty“ (DSAEK) ersetzt [18, 29, 32].

Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty

Aus den Techniken der DLEK wurde die DSAEK entwickelt. Melles et al. beschrieben 2004 die Durchführung der Descemetorhexis, bei der vom Empfänger nur die Descemet'sche Membran über einen korneoskleralen oder einen noch kleineren, kornealen Zugang entfernt wird [35, 36]. Bei der DSAEK wird die Wirts-DM isoliert als sogenanntes „Descemetstripping“ entfernt. Die posteriore Spenderlamelle kann manuell, mit dem Mikrokeratom oder mit dem Femtosekundenlaser gewonnen und dann en bloc in die Vorderkammer transplantiert werden [37-39]. Diese lamellären Transplantate können auch als „precut tissues“ bereitgestellt werden, die bereits in der Hornhautbank aus konserviertem Material präpariert werden [40]. Den größten Teil der Indikationen zur posterioren lamellären Keratoplastik (DSAEK) machen die Fuchs'sche Endotheldystrophie, die pseudophake bullöse Keratopathie und die Pseudoexfoliations-Keratopathie (PEX-Keratopathie) aus. Die Technik der DSAEK kommt bei Patienten in Frage, die endotheliale Hornhauterkrankungen haben, bei denen es nicht zu einer irreversiblen Hornhautstromatrübung gekommen ist. Auch bei Patienten mit Transplantatversagen nach perforierender Keratoplastik ist eine DSAEK möglich [15, 41]. Eine kombinierte Keratoplastik mit Kataraktoperation und Intraokularlinseneinsatz im Sinne einer Triple-

Operation ist bei der Fuchs'schen Endotheldystrophie sowie bei der PEX-Keratopathie ebenso möglich und sinnvoll [41-43].

Zur Technik der posterioren lamellären Keratoplastik mittels Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty

Transplantatgewinnung: Eine 14-16 mm große korneosklerale Spenderscheibe wird auf die künstliche Vorderkammerbank gebracht und bei einem „intraokularen“ Druck (IOD) von etwa 60 mmHg fixiert. Mit einem Mikrokeratom wird das vordere Stroma mit einer Dicke von 300-350 µm abgetrennt. Auf einem Hanna-Stanzblock wird mit niedrigem Vakuum das verbliebene Gewebe von etwa 150 µm Dicke angesaugt und mit einem Trepan (Durchmesser 8,0, 8,5 oder 9 mm) von der endothelialen Seite herausgestanzt [41].

Transplantation: Bei der Operation wird ein ca. 8 mm breiter korneoskleraler Tunnel temporal oder ein 4,5 mm breiter „clear cornea“-Tunnel präpariert, über den die Lamelle in die Vorderkammer eingesetzt wird. Gegenüber wird ein kleinerer Keratom-Schnitt in die Hornhaut sowie bei 6 Uhr ein Zugang für die Vorderkammerinfusion angelegt. Es erfolgt eine kreisrunde Markierung in der Größe der zu entfernenden Descemet'schen Membran auf der epithelialen Seite der Hornhaut und nach einer zirkulären Inzision mit Hilfe eines geeigneten Instruments, die komplette Ablösung der Descemet'schen Membran (Descemetstripping). Danach wird der Korneoskleralschnitt erweitert und die posteriore Lamelle en bloc über eine entsprechende Implantations-Schiene oder mit einer Spezialpinzette in die Vorderkammer implantiert. Durch eine Luftinjektion wird dann das Transplantat entfaltet und retrokorneal fixiert. Zum Abschluss der Operation wird die Luftfüllung der Vorderkammer auf Transplantatgröße reduziert. Zur intraoperativen Flüssigkeitsdrainage können im Bereich der parazentralen Hornhaut mehrere Einschnitte angebracht werden. Die Hornhauttransplantation wird in der Regel nahtfrei durchgeführt und somit treten bei der DSAEK keine fadenassoziierten Komplikationen auf [41].

Eine der früh beobachteten postoperativen Komplikationen bei der DSAEK ist die Transplantatdislokation bzw. die inkomplette Adhärenz der posterioren Stromalamelle. Durch eine erneute Luftinjektion in die Vorderkammer (Re-Bubbling) kann dieses Problem behoben und eine Wiederanlage des Transplantates erreicht werden [44, 45]. Auch Trübungen im Interface durch z. B. Verschleppung von Tupfermaterial, Pigment oder Blut stellen bei zentraler Ablagerung eine Komplikation mit möglicher Visusbeeinträchtigung dar, weshalb auf eine äußerst saubere Präparation geachtet werden muss [41]. Außerdem wird das sog. Urrets-Zavalía-Syndrom sowie das Pupillarblockglaukom beschrieben, das durch Luftauffüllung der Vorderkammer bei fehlender Iridektomie bzw. präoperativ nicht durchgeführter Iridotomie verursacht wird. Dabei entsteht aufgrund des resultierenden Pupillarblockes eine Irisstromaneurose, die eine dauerhaft dilatierte Pupille zur

Folge hat [41, 46, 47]. Die Angaben über den postoperativen Endothelzellverlust variieren. Es wird ein Endothelzellverlust von bis zu 50 % postoperativ nach 6 Monaten beschrieben, wobei das Einführen des Transplantates mit der Gleitschiene eine geringere Endothelzellverlustquote aufweist als beim mit der Pinzette gefalteten Transplantat. So wird beispielsweise beim Einsetzen des lamellären Transplantates mit dem sog. „Busin-Glide“ ein geringerer Verlust von Endothelzellen beobachtet [48-50]. Trotz der aufgeführten Probleme, die sowohl von der Qualität der Spenderhornhaut als auch mit der Lernkurve des Operateurs korrelieren, ist die DSAEK eine sehr anspruchsvolle Technik, die kontinuierlich weiterentwickelt wird und deren Anteil an den Hornhauttransplantationen auch in Deutschland steigt.

Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty

Auf der Grundlage der DSAEK entwickelten Melles et al. die DMEK, bei der isoliert nur die Descemet'sche Membran und das Hornhautendothel ohne Stromaanteile transplantiert werden [28, 51, 52]. Die DMEK ist ausschließlich bei Pathologien des Hornhautendothels indiziert, die noch nicht zu einer irreversiblen Schädigung des Stromas oder zu stromalen Neovaskularisationen geführt haben. Die Indikationen zur DMEK sind nahezu identisch mit denen der DSAEK [53]. Die DMEK stellt eine technisch anspruchsvollere Methode dar, bei der Schichten mit einer Gesamtdicke von $\pm 15 \mu\text{m}$ transplantiert werden und dadurch insgesamt ein besseres postoperatives Sehvermögen im Vergleich zur DSAEK erzielt wird. In den Studien von Melles et al. wurden bei der DMEK bessere Visusresultate als bei anderen lamellären Techniken festgestellt und es konnte somit die Vermutung „Je dünner das Transplantat, desto höher ist die Sehschärfe“ bestätigt werden. Bei 75 % der DMEK-Patienten wurde ein Visus von mindestens 0,8 erzielt. Die besseren Visusergebnisse nach DMEK resultieren vorwiegend aus dem geringer ausgeprägten Interface [53-55]. Es wird somit nur die erkrankte Hornhautschicht ausgetauscht, eine operativ sehr anspruchsvolle Methode, die derzeit nur in wenigen Zentren erfolgt. In **Abbildung 3** ist eine schematische Darstellung der Unterschiede zwischen DSAEK und DMEK aufgeführt.

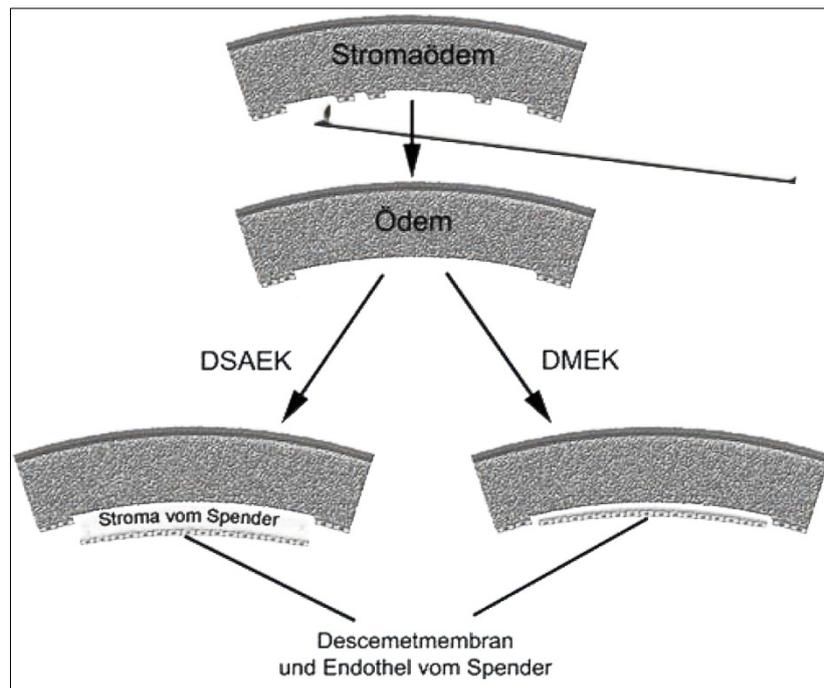


Abb. 3: Vergleich von Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty und Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty nach Cursiefen et al. [53].

1.3 Problemstellung

Die PKP galt bislang als der „Goldstandard“ für die Therapie nahezu aller Hornhauttrübungen einschließlich jener, die durch endotheliale Hornhauterkrankungen hervorgerufen werden. Die Operation am „offenen Auge“ birgt jedoch das Risiko ernster Komplikationen wie z. B. der expulsiven Blutung. Trotz der guten Visusergebnisse nach PKP kam es in letzter Zeit zu einer schnellen Etablierung lamellärer Techniken, die auch als eine Renaissance dieser Verfahren bezeichnet wird. Die Vorteile der hinteren lamellären Keratoplastik gegenüber der PKP sind zum Einen die zügige visuelle Rehabilitation und zum Anderen eine zügige Heilung der Wunden, da bei den hinteren lamellären Verfahren, also bei der DLEK, DSAEK und DMEK die vordere stromale Lamelle, welche die Stabilität der Krümmung an der Hornhaut gewährleistet, erhalten bleibt. Neben der schnelleren visuellen Rehabilitation stellt die Reduktion des postoperativen Astigmatismus den wesentlichen Vorteil der hinteren lamellären Techniken dar. In den Studien von Price zeigten sich bei DSAEK-Patienten keine signifikanten Änderungen des sphärischen Äquivalents und des Astigmatismus zwischen präoperativ und 6 Monate postoperativ [41, 56]. Allerdings resultieren bei den hinteren lamellären Verfahren im Vergleich zur PKP oft schlechtere visuelle Ergebnisse, die ursächlich mit dem visuslimitierenden Interface in Zusammenhang gebracht wurden. Das Interface stellt die Grenzfläche zwischen Spender- und Wirtshornhaut dar und ist nach lamellären Hornhauttransplantationen sehr häufig gut erkennbar. Mögliche Ursachen für die deutliche Visusreduktion können Unregelmäßigkeiten an der geschnittenen Stromaoberfläche oder auch feinste

Trübungen in der optischen Achse sein. Bei der LASIK werden diese Phänomene jedoch selten beobachtet, da es sich hier um autologes Gewebe handelt, was sich auf die Gestaltung des Interface auszuwirken scheint. Des Weiteren kommt es bei mikrokeratom- oder lasergesteuerten Verfahren zu Rotationsverschiebungen und Oberflächenunregelmäßigkeiten zwischen den Hornhautlamellen von Spender und Empfänger, die auch eine Rolle bei der Visusreduktion spielen können [18, 57]. Hingegen wird bei der Übertragung der isolierten Descemet'schen Membran mit Endothel im Rahmen einer DMEK postoperativ im Vergleich zur DSAEK und PKP eine schnellere visuelle Rehabilitation berichtet [53-55]. Es ist zu vermuten, dass der geringe Visusanstieg aus den Unterschieden der Grenzflächenbeschaffenheit resultiert. Da die Präparation der posterioren Hornhautlamelle mittels Mikrokeratom oder Femtosekundenlaser erfolgen kann, ist anzunehmen, dass die Homogenität der Schnittfläche von der Art des Schneidgerätes abhängt und damit verbunden sich unterschiedliche Interface-Qualitäten ergeben.

Deshalb ist es Anliegen dieser Arbeit, die Beschaffenheit der Schnittflächen nach Verwendung verschiedener Geräte anhand rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Probengewinnung und- konservierung mittels Mikrokeratom und Femtosekundenlaser

Für die Untersuchungen kamen zur Gewinnung der posterioren Lamelle drei verschiedene Mikrokeratome (Gebauer SL der Medizintechnik GmbH, Neuhausen; Moria CBm der Firma Moria S.A., Antony/Frankreich; Amadeus II ZiemerS der Firma T.MED, Schweiz) sowie zwei Femtosekundenlaser (VisuMaxTM der Carl Zeiss Meditec AG, Jena und TissueSurgeon Lasermikrotom der ROWIAK GmbH, Hannover) zum Einsatz. Insgesamt wurden mit jedem Mikrokeratom (MK) jeweils acht porcine und acht humane Präparate geschnitten. In der Serie der Femtosekundenlaser (FSL) wurden mit dem VisuMaxTM Femtosekundenlaser ausschließlich acht humane Hornhäute und mit dem TissueSurgeon Lasermikrotom acht porcine Hornhäute geschnitten. In **Tabelle 1** ist eine kurze Übersicht über die Anzahl der geschnittenen Hornhäute je Schneidgerät abgebildet.

Tab. 1: Zusammenfassung der humanen und porcinen Präparate je Schneidgerät

Geräte	Humane Hornhäute	Porcine Hornhäute
Gebauer SL Mikrokeratom	8	8
Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom	8	8
Moria CBm Mikrokeratom	8	8
VisuMax TM FSL	8	
TissueSurgeon FSL		8

Die Schweineaugen wurden vom Schlachthof der Schweriner Fleischwaren GmbH geholt und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei ca. + 4 °C aufbewahrt. Die humanen Hornhäute stammen aus der Hornhautbank in Schwerin. Sobald die porcinen und humanen Hornhäute verfügbar waren, wurden innerhalb der nächsten 48 Stunden die lamellären Keratotomien durchgeführt. Acht intakte Schweinebulbi mit erhaltenem Epithel und Stroma wurden ausgewählt und zur Durchführung der Schnitte vorbereitet. Vor Beginn des Schneidevorganges wurden die Schweinebulbi ca. eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert, um die Entquellung des Stromas im Sinne eines Rewarming-Effektes abzuwarten. Die Bulbi wurden aus der feuchten Kammer herausgenommen und nach gründlicher Säuberung von Geweberesten sowie Abtrennen seiner Adnexe auf einem Bulbushalter nach Spitznas durch Ansaugen mit einer 5 ml Einwegspritze mittels Vakuum fixiert. Der Trepan mit einem Durchmesser von 15 mm wurde vorsichtig bis zur Perforation manuell rotiert. Anschließend erfolgte die komplette zirkuläre Durchtrennung der Sklera mit einer Keratotomieschere. Die Anheftungen der Iris und des Ziliarkörpers wurden vorsichtig stumpf mit einem Hockeymesser entfernt [12]. Danach wurde die Hornhautoberfläche zur Säuberung von Irispigmentzellen mit NaCl gespült. Nach erfolgreichem Aufbau des Vakuums und IOD-Kontrolle mit einem Barraquer Tonometer oder Impressionstonometer nach Schiötz konnten die Schnitte durchgeführt werden. In der Serie der Mikrokeratome erfolgten die lamellären Keratotomien und Trepanationen je zur Hälfte durch Herrn Prof. Dr. F. Wilhelm und die Promovendin. Mit dem VisuMaxTM FSL aus den HELIOS Kliniken Erfurt wurden die acht humanen Präparate durch Frau Dr. K. Kunert und mit dem TissueSurgeon FSL (Medizinische Hochschule Hannover) an acht Schweinehornhäuten durch Herrn Dr. F. Will geschnitten. Nach dem Schneiden wurde die Hornhautlamelle vorsichtig mit einer Pinzette angehoben und nach Abspülung mit NaCl zur Entfernung möglicher Verunreinigungen mittels eines Handtrepans von der endothelialen Seite trepaniert (vgl. **Abb. 8**). Anschließend wurden die gewonnenen Präparate in eine Fixierlösung gebracht, welche sich aus 0,1 M HEPES-Puffer (pH 7,4), 1 mM Kalziumchlorid, 25 mM Natriumazid, 1 mM Magnesiumchlorid und 3 % Glutaraldehyd zusammensetzt. Die genaueren Bestandteile der Fixierlösung sind in **Anlage 1** aufgeführt. Die so gewonnenen Proben wurden anschließend bei + 4 °C im Kühlschrank gelagert. Unmittelbar nach Durchführung der lamellären Keratotomien erfolgte innerhalb von ca. 48 Stunden die Präparation zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung durch Frau Dr. Sietmann und ihre Mitarbeiter im Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Fachrichtung für Biologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.

2.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Aufbereitung der Hornhaut für die Elektronenmikroskopie

Nach der Gewinnung der posterioren Lamelle mittels Mikrokeratom erfolgte die weitere Präparation der Hornhäute im Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Fachrichtung für Biologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Folgende Schritte sind zur Präparation für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen notwendig:

Die Proben wurden im Fixativ (3 % Glutaraldehyd, 0,1 M Hepes, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 25 mM NaN_3) für 2 h bei Raumtemperatur und bis zur weiteren Behandlung bei + 4 °C gelagert. Nach dem Überführen der Proben in Waschpuffer (WP; 0,1 M Cacodylatpuffer [pH 7,4], 1 mM CaCl_2 , 25 mM NaN_3) für 4 x 15 min erfolgte eine Behandlung mit 2 % Tannin für 1 h. Anschließend wurden die Proben erneut 4 x 15 min mit WP gewaschen, vor der Behandlung mit 2 % Osmiumtetroxid über die Dauer von 2 h. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Dem erneuten Waschen mit 0,9%iger NaCl-Lösung (für 2 x 10 min und 2 x 15 min) folgte die Behandlung der Proben mit 2 % Uranylacetat für 1 h. Dann wurden die Proben in einer aufsteigenden Reihe Aceton (20 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %) entwässert. Schließlich wurde den Proben auf dem Wege der Kritischen-Punkt-Trocknung das Restwasser entzogen. Anschließend wurden die Proben auf Aluminiumhalter aufgebracht, mit Gold besputtert und mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskopes (REM) Modell DSM 940A bzw. EVO LS10 (Fa Zeiss, Oberkochen, **Abbildung 4**) betrachtet. Eine Übersichtsaufnahme mit 10facher Vergrößerung sowie drei Aufnahmen der Schnittflächen (mit jeweils 50-, 100-, und 200facher Vergrößerung) wurden aufgenommen und mit Hilfe eines semiquantitativen Score-Systems ausgewertet. Die einzelnen Schritte der Präparation sind in **Abbildung 5** zusammengefasst und die angewendeten Chemikalien in **Anlage 2** aufgelistet.



Abb. 4: Links: Rasterelektronenmikroskop DSM-940A (Fa Zeiss); Rechts: Steuereinheit.

Durchführung der lamellären Keratotomien mit den verschiedenen Geräten



Aufbewahrung der Proben in Fixierlösung



Präparation der Proben für die REM-Untersuchungen

Lagerung der Proben in 1 ml WP, anschließend 4 x Waschen mit 1 ml WP für je 15 min
(zwischenzeitlich Schütteln)



Austauschen von WP mit 1 ml 2%ige Tannin-Lösung
(Lagerung für 60 min abgedunkelt bei Raumtemperatur)



Waschen 4 x mit 1 ml WP für je 15 min (zwischenzeitlich Schütteln)



Austauschen von WP durch 1 ml 2%ige OsO₄-Lösung
(Lagerung für 120 min abgedunkelt bei Raumtemperatur)



Waschen der Proben mit 1 ml 0,9 % NaCL-Lösung
(für 2 x 10 min und 2 x 15 min)



Umlagerung der Präparate in 1 ml 2 % Uranylacetat
(Lagerung für 60 min abgedunkelt bei Raumtemperatur)



Waschen mit Aqua bidest 2 x 5 min



Entwässerung mit Ethanol in aufsteigender Konzentration
(je 1 ml im geschlossenen Probengefäß)



15 min in 20%igem Ethanol

15 min in 40%igem Ethanol

15 min in 60%igem Ethanol

Lagerung der Proben über Nacht in 70%igem Ethanol

15 min in 80%igem Ethanol

15 min in 90%igem Ethanol

15 min in 96%igem Ethanol

3 x für 15 min in 100%igem Ethanol



Umlagerung der Proben in Amylacetat
im Verhältnis Ethanol : Amylacetat = 2 : 1 und 1 : 2 für je 15 min
anschließend 3 x für 15 min in 100%igem Amylacetat



Durchführung der Kritischen-Punkt-Trocknung (12 Vorgänge)



Aufblocken der Proben auf Aluminiumobjektträger



Sputtern mit Gold unter Rotation 8 min lang



Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie
(50fache, 100fache und 200fache Vergrößerung)



Auswertung der Schnittflächen mittels eines semiquantitativen Score-Systems

Abb. 5: Schematische Darstellung des Präparationsablaufes.

2.3 Vorstellung der verwendeten Schneidgeräte

2.3.1 SL Mikrokeratom der Gebauer Medizintechnik GmbH (Neuhausen)

Das Gebauer SL Mikrokeratom der Medizintechnik GmbH (**Abbildung 6**) ist ein linear und automatisch geführtes System, das aus drei Teilen besteht: Einem sterilen Single-Use-Kopf mit bereits eingeschobener DSAEK-Klinge sowie der Vorderkammerbank. Dieses System wird vor dem Eingriff zusammengesetzt und erlaubt durch den einfachen „Click-and-Go“ Mechanismus eine sichere, stabile und einhändige Handhabung. Während des Schnittes bleibt das Gebauer SL Mikrokeratom-Handstück an der Vorderkammerbank fixiert. Arbeitsbewegung und Vorschub erfolgen durch getrennte Antriebe, was eine optimale Schnittqualität gewährleistet. Ein Motor bewegt nur den Schneidkopf während des Eingriffs, wobei das Handstück stabil und fixiert bleibt. Durch den Fußschalter und durch fest eingestellte Parameter wird eine Bedienung ohne zusätzlichen Einsatz der Hände ermöglicht. Dieses Mikrokeratom schneidet mit einer Oszillationsfrequenz von 10.000 rpm (rounds per minute) bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 1,5 mm/sec. Nach Aufbau des Vakuums erfolgt der Schneidvorgang einschließlich Vorschub und Rückzug der Klinge vollständig automatisch. Das System erlaubt durch verschiedene Ringgrößen (19 mm oder 20 mm) eine individuelle Anpassung an den Patienten. Die Flap-Dicke ist in mehreren Stufen von je 50 µm zwischen 250 µm und 450 µm wählbar. Das Mikrokeratom "Gebauer SL" ist auch für die LASIK und die EPI-LASIK einsetzbar. Für die LASIK stehen Single-Use-Schneideinheiten von 95 µm und 130 µm zur Verfügung. Dieses System gewährleistet eine sichere Entfernung des Epithels mit den Single-Use-Epi-Separatoren-Sets, da es stets selbstständig die Delamination kontrolliert.



Abb. 6: Gebauer SL – Mikrokeratom (Firmenfoto).

2.3.2 Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom (Biel/Schweiz)

Das Mikrokeratom Amadeus II ZiemerS vertrieben über die Firma T.MED (**Abbildung 7**) ist ebenfalls ein linear und automatisch geführtes System mit weniger einwirkenden Scherkräften als bei einem System mit Torsionsbewegungen. Folgende Bestandteile gehören zum Gerät, wenn eine lamelläre Keratoplastik mit dem Amadeus II erfolgt: Motoreinheit, künstliche Vorderkammer, Klingenhalter, Barraquer Tonometer 65 mmHg, Drei-Wege-Absperrhahn sowie Einlagen mit Entfernerwerkzeug. Das Amadeus System ermöglicht, Lamellen variabler Dicke und verschiedener Durchmesser zu schneiden. Des Weiteren ist für die lamelläre Keratoplastik mit dem Amadeus II MK eine künstliche Vorderkammer mit einer entsprechenden Saugereinheit erforderlich. Die Lamellendurchmesser können durch die Auswahl der verfügbaren Saugereinheiten bestimmt werden, die Lamellendicke wird durch die Auswahl des Klingenhalters definiert. Es sind Klingenhalter mit folgender nominaler Schnittdicke erhältlich: 200, 250, 300, 350, 400 und 450 μm . Die Saugvorrichtungen stehen mit den vorgegebenen Lamellendurchmessern von 8,5, 9,0, 9,5 und 10,0 mm zur Verfügung. Jede Kombination von Durchmesser und Dicke ist möglich, deshalb kann auch hier der Operateur eine Anpassung an die individuellen anatomischen Begebenheiten vornehmen. Für dieses Mikrokeratom kann eine Klinge-Oszillationsfrequenz von 4.000 bis 20.000 rpm gewählt werden. Empfohlen werden 11.000 rpm. Bei einer möglichen Klinge Vorschubgeschwindigkeit von 1,5 bis 4,0 mm/s haben sich 1,5 mm/s bewährt. Während des Schneidevorgangs mit dem Amadeus II sind beide Hände des Operateurs frei. Die Vorschub- und Rückbewegung sind automatisch und somit konstant. Die vollautomatische Schneidevorrichtung ermöglicht eine vom Operateur unabhängige, definierte und reproduzierbare Schnittqualität.



Abb. 7: Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom (Firmenfoto).

2.3.3 Moria CBm Mikrokeratom der Firma Moria S. A. (Antony/Frankreich)

Das Moria CBm-Mikrokeratom (**Abbildung 8**) ist ein manuell geführtes System bei dem der Vorschub durch den Anwender selbst bestimmt wird. Für dieses Gerät stehen austauschbare Köpfe zur Verfügung, die es ermöglichen, Lamellen unterschiedlicher Dicke zu schneiden, verschiedene Saugringe, welche variable Durchmesser einstellen können sowie eine künstliche Vorderkammer für die Gewinnung des lamellären Transplantates vom Spendergewebe. Die künstliche Vorderkammer besteht aus einer Basis mit einem zentralen Kolben, der durch Drehen eines Rändelringes angehoben oder gesenkt werden kann, einer äußeren Verschlussvorrichtung zur Fixierung der Spenderhornhaut sowie einer Schwalbenschwanzführung für das Mikrokeratom. Eine Infusion ist mit der Basis über ein Schloss verbunden, so dass Flüssigkeit über einen Kanal durch den zentralen Kolben in die künstliche Vorderkammer gelangt, über der die Hornhaut fixiert ist. Es sind auch eine andere Verschlussvorrichtung und Schwalbenschwanzführung für das CBm-Mikrokeratom verfügbar, welche im Handstück integriert sind. Dieses Einzelstück ist nicht verstellbar, erlaubt aber größere Durchmesser zu schneiden. Sowohl rotierende als auch lineare Modelle sind für den Gebrauch für dieses Mikrokeratom verfügbar, wobei beide Modelle gleich gut funktionieren [58]. Bei unseren Versuchen kam ein Schneidkopf mit rotierender Vorschubbewegung zur Anwendung. Insgesamt gibt es vier verschiedene Saugringe zur Auswahl. Je steiler die Hornhaut, desto höher sollte die Nummer des Saugringes gewählt werden. Es stehen austauschbare Schneidköpfe mit Schnitttiefen von 130, 160, 250, 300 und 350 μm zur Verfügung. Es kann auch noch ein 400 μm Schneidkopf jedoch nur für das Spendergewebe eingesetzt werden. Ein Minimum von drei Köpfen sollte für den Gebrauch verfügbar sein, um oberflächliche (130-160 μm), mittlere stromale (200-250 μm) und tiefe (300-350 μm) Schnitte durchführen zu können [58].



Abb. 8: Moria CBm Mikrokeratom (links) mit Trepanationsvorrichtung (rechts) (Firmenfotos).

2.3.4 TissueSurgeon Lasermikrotom der Firma ROWIAK GmbH (Hannover)

Um einen Vergleich von Femtosekundenlasern mit den eingesetzten Mikrokeratomen anstellen zu können, wurde der TissueSurgeon Femtosekundenlaser der Firma ROWIAK GmbH angewendet. Für die Laserschnitte wurden frisch enukleierte Schweinebulbi vom Schlachthof bereitgestellt. Diese wurden ca. eine Stunde nach Entnahme von noch anhängender Adnexe und Gewebe gesäubert und anschließend in NaCl-Lösung gelagert (vgl. Abschnitt 2.1). Die Experimente wurden ca. fünf Stunden nach Entnahme durch Herrn Dr. F. Will unter Anleitung von Herrn Dr. L. Blomberg in der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Es wurde am intakten Bulbus geschnitten, die Kornea wurde erst später heraus trepaniert. Mit dem TissueSurgeon Femtosekundenlaser wurden acht Präparate gewonnen, die anschließend auch zur rasterelektronenmikroskopischen Aufbereitung in das Labor der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald verschickt wurden. Für jede der acht Hornhautlamellen wurden eine Übersichtsaufnahme sowie eine Aufnahme der Schnittfläche angefertigt. Bei allen Schnitten wurden eine Schnitttiefe von 500 µm, ein Pulsüberlapp von 75 % und ein Linienüberlapp von 30 % sowie ein Brechungsindex von 1,3 angewendet. In **Tabelle 2** ist eine Übersicht der eingesetzten Pulsenergie und Schnitttiefe der Hornhaut mit dem TissueSurgeon Lasermikrotom für die einzelnen Präparate aufgeführt.

Tab. 2: Übersicht der einzelnen Geräteparameter für die Schnitte mit dem TissueSurgeon FSL

Präparate	Porcine Kornea	Objektträger
Schnitt (n = 8)	Pulsenergie in nJ	Schnitttiefe in µm
1	100	480
2	90	500
3	90	540
4	110	500
5	110	460
6	100	470
7	80	480
8	100	470

Laserbeschreibung

Hauptbestandteil des TissueSurgeon Lasermikrotoms der Firma ROWIAK ist der Femtosekundenlaser (vgl. **Abbildung 9**). Um einen Schnitt ausführen zu können, wird der Laserstrahl durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur in das Gewebe fokussiert. Aufgrund der sehr hohen Photonendichte im Laserfokus werden nicht lineare optische Prozesse induziert, die letztendlich zur Ablation führen. Diese Wirkung aber wird nur auf das sehr kleine fokale Volumen beschränkt und ermöglicht auf diese Art Schnitte mit Mikrometergenauigkeit. Beim Schneidvorgang werden der Laserstrahl und das Muster simultan bewegt. Je nachdem wie das Material verarbeitet wird, sind Scheibendicken von 7 bis 100 μm möglich. An transparentem Gewebe wie der Kornea können 500 μm dicke Lamellen geschnitten werden. Im TissueSurgeon FSL wird ein **Laser t-Pulse 500** der Firma **Amplitude-Systems**, Frankreich (siehe **Abbildung 10**) angewendet. In unseren Untersuchungen wurde dieses Gerät für die Präparation der Kornea optimiert und der t-Pulse 200 Laser verwendet. Der t-Pulse Laser ist ein Femtosekundenlaseroszillator. Der Gebrauch eines Oszillators mit hoher Pulsfrequenz (10 MHz) erlaubt die Verwendung sehr geringer Pulsenergien. Dadurch werden thermische und andere Nebeneffekte minimiert. Im Vergleich dazu arbeiten refraktiv-chirurgische Laser meistens mit einem Verstärkersystem geringer Pulsfrequenz. Die dadurch notwendigen höheren Pulsenergien führen zu deutlich stärkeren Nebeneffekten als bei Verwendung eines Oszillators.



Abb. 9: TissueSurgeon Lasermikrotom der ROWIAK GmbH (Firmenfoto).



Abb. 10: t-Pulse 500 Amplitude- Systems (Firmenfoto).

2.3.5 VisuMax™ Femtosekundenlaser der Firma Carl Zeiss Meditec AG (Jena)

In den vorliegenden Untersuchungen wurden zusätzlich acht weitere humane Präparate mit dem VisuMax™ FSL der Firma Carl Zeiss Meditec AG am HELIOS Klinikum in Erfurt angefertigt. Sowohl ein Flap als auch ein Lentikel aus einem intrastromalen Hornhautgewebe wurden simultan geschnitten. Es wurde bei allen Präparaten eine Energie von 180 nJ und eine Spotsizes von 3 x 3 µm angewendet. In der **Tabelle 3** sind die acht Präparate mit einer Übersicht der Hornhautdicke und RST (residual stromal thickness) in µm aufgeführt. Die Hornhäute wurden nach dem Verfahren der Femtosekunden-Lentikel-Extraktion (FLEX) geschnitten, welches sich von den bislang bekannten refraktiven Verfahren besonders von der so genannten "Femto-LASIK" unterscheidet, bei der ein Excimerlaser den refraktiven Schritt ausübt [59-61]. Anschließend wurden die Präparate zur rasterelektronenmikroskopischen Aufbereitung in das Labor der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald verschickt.

Tab. 3: Übersicht der Hornhautdicke und RST mit dem VisuMax™ FSL

Schnitt n = 8	Hornhaut-Dicke in µm	RST in µm
1	562	341
2	562	301
3	515	311
4	518	308
5	567	360
6	566	362
7	515	310
8	521	319

Der VisuMax™ Femtosekundenlaser arbeitet mit einer Laserpulsfrequenz von 200 kHz. Er enthält ein Operationsmikroskop für alle Behandlungsphasen sowie einen Adapter zum Präparieren der Hornhaut (**Abbildung 11**). Des Weiteren kommt ein spezielles Kontaktglas (Treatment Pack KP) zum Einsatz, welches zu den meisten künstlichen Vorderkammern kompatibel ist (**Abbildung 12**). Ein geringer Spotabstand ermöglicht eine kalkulierbare Schnittqualität. Aufgrund der schnellen und exakten Schnittführung, die durch die geringe Laserimpulsenergie und hohe Pulsfrequenz gewährleistet wird, können genau definierte Hornhautlamellen in gewünschter Tiefe angefertigt werden. Über die VisuMax™ Software erfolgt automatisch die Patientenpositionierung zwischen OP-Mikroskop und Behandlungsposition. Verschiedene Kontaktglasgrößen ermöglichen die Anpassung an die individuelle Augengröße. Der Kontakt und die Fixierung am Patientenauge erfolgen ausschließlich korneal. Die Ansaugung erfolgt automatisch, wird während des Eingriffes ständig überwacht und dauert kaum länger als der eigentliche Laserschnitt.



Abb. 11: VisuMax™ Femtosekundenlaser der Carl Zeiss Meditec AG (Firmenfoto).



Abb. 12: Kontaktglas (Typ KP) zum Präparieren der Spender-Hornhaut (Firmenfoto).

2.4 Score-System zur Bewertung der Schnittflächen in den REM-Aufnahmen

Von allen Präparaten wurden Übersichtsaufnahmen mit einer 10fachen Vergrößerung sowie Aufnahmen der Schnittflächen mit einer 50-, 100- und 200fachen Vergrößerung angefertigt. Die Schnittflächen der rasterelektronenmikroskopischen Bilder von humanen und porcinen Hornhäuten wurden mittels eines semiquantitativen Score-Systems bewertet, das durch mehrere Studien zum Vergleich von Schnittflächen etabliert ist [62-64]. Dadurch wird die Möglichkeit gegeben, die einzelnen Bewertungen zu quantifizieren und so miteinander zu vergleichen. Die Übersichtsaufnahmen der Schnittflächen wurden bei einer 10fachen Vergrößerung und die Homogenität der Schnittflächen, der Anteil und die Lokalisation der Unebenheiten der Schnittflächen an Bildern bei 50facher Vergrößerung beurteilt. Anhand dieser Vergrößerungen und bestimmter Kriterien konnte die Homogenität der Oberfläche sowie dessen Ausprägung und Lokalisation bewertet werden. Auf Grundlage dieser Werte waren eine semiquantitative Einschätzung der Schnittflächen und ein Vergleich der eingesetzten Mikrokeratome und Femtosekundenlaser möglich. Für jedes Präparat kann der höchste Wert mit 11 Punkten vergeben werden, was für eine absolut homogene Schnittfläche spricht. Die einzelnen Kriterien zur Bewertung der Schnittflächen mit Ausprägungsgrad und Score-Punktzahl sind in der **Tabelle 4** aufgeführt.

Tab. 4: Kriterien der Schnittflächenbewertung (Score) nach Giessmann [63, 64]

Nr.	Kriterium	Ausprägung	Score
A	Oberflächenrelief (10fache Vergrößerung)	keine Unebenheiten Unebenheiten vorhanden	2 1
B	Homogenität der Schnittfläche (50fache Vergrößerung)	nahezu vollständig teilweise homogen völlig irregulär	3 2 1
C	Anteil der Unebenheiten (50fache Vergrößerung)	<10 % der Schnittfläche 10 % - 20 % der Schnittfläche >25 % der Schnittfläche	3 2 1
D	Lokalisation der Unebenheiten (50fache Vergrößerung)	keine Unebenheiten vorhanden Unebenheiten nur peripher Unebenheiten peripher und zentral	3 2 1

Die Summe der Mittelwerte der Kriterien B, C und D ergibt den Regularitätsindex, der die Homogenität bzw. Regelmäßigkeit der Oberfläche der Schnittflächen beschreibt und zusammenfasst. Der Gesamtscore ergibt sich aus der Summe der Mittelwerte der Ergebnisse. In **Abbildung 13** sind Beispielbilder für eine regelmäßige Oberfläche und eine unregelmäßige Schnittfläche zum Vergleich in 50facher Vergrößerung gegenübergestellt.

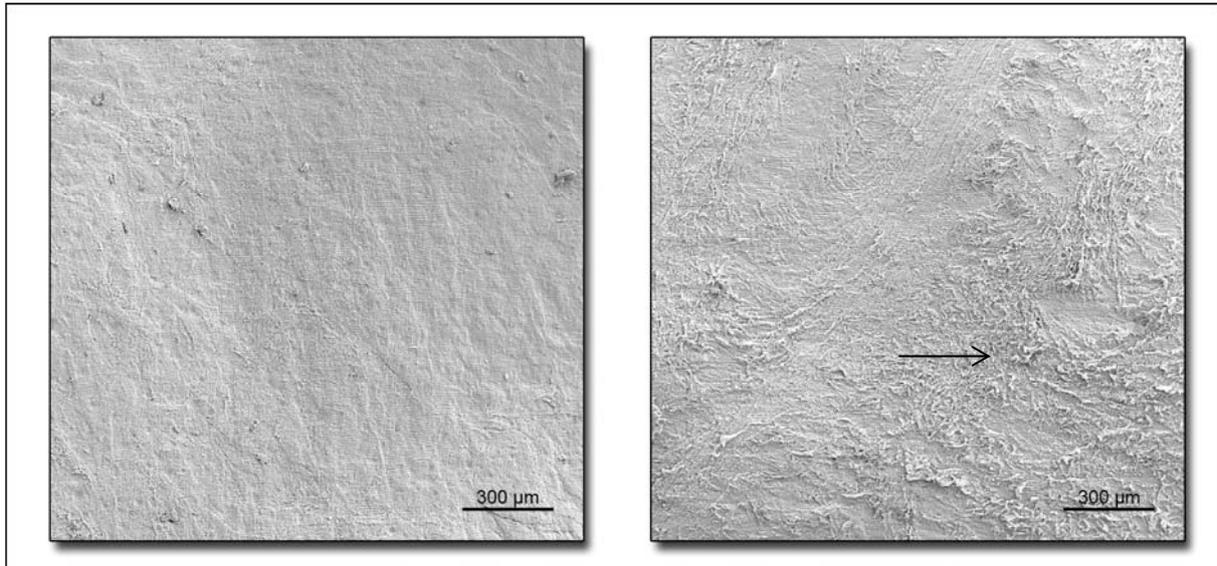


Abb. 13: Bewertung der Bilder aufgenommen bei etwa 50facher Vergrößerung. Links: Schnittfläche ohne Unebenheiten; rechts: Schnittfläche mit Unebenheiten.

2.5 Statistische Methoden

Um die Ergebnisse der Untersuchungen auswerten zu können, wurde trotz des geringen Stichprobenumfangs eine statistische Analyse der erzielten Daten durchgeführt. Die statistische Aufbereitung der Resultate erfolgte durch die Mitarbeiter der medistat GmbH (Medizinische Statistik, Kiel). Zunächst wurden die einzelnen Ergebnisse in Excel-Tabellen erfasst. Anschließend wurde aus der ermittelten Punktzahl für jedes Kriterium und aus dem Regularitätskriterium (Summe der Kriterien B, C, D) je Schnitt, getrennt nach humanen und porcinen Hornhäuten, der Mittelwert, Median und die entsprechende Standardabweichung (SD), berechnet. Die Ergebnisse wurden dann deskriptiv in Form von Boxplots (vgl. **Abbildung 14**) graphisch dargestellt. Zusätzlich wurden Tests auf Normalverteilung (Saphiro-Wilk-Test mit Berechnung der Signifikanzen), der Mann-Whitney-Test und der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt (vgl. **Anlage Nr. 11 bis Nr. 15**) [65]. Alle Schneidgeräte wurden miteinander verglichen. Hierbei wurde ein Posthoc-Paarvergleich durchgeführt. Die einzelnen Daten sind in Form von Tabellen zusammengefasst und in den Anlagen wiederzufinden (**Nr. 16 bis Nr. 27**). Die Gegenüberstellungen der p-Werte im Paarvergleich für die Punktzahl und das Regularitätskriterium je Schnitt wurden tabellarisch in der **Anlage (Nr. 28)** aufgelistet.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Bewertung aller mit den getesteten Schneidgeräten erzielten Schnittflächen an humanen und porcinen Schnittbildern beschrieben und anhand von Beispielen für den erreichten höchsten und niedrigsten Score-Wert in der jeweiligen Schnittserie dargestellt. Die Präparate wurden nach den in Tabelle 4 aufgeführten Kriterien bewertet (vgl. Anlage Nr. 3- 10).

3.1 Untersuchungen an Schweinehornhäuten

In dieser Versuchsreihe wurden mit dem Gebauer SL Mikrokeratom, dem Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom, dem Moria CBm Mikrokeratom und dem TissueSurgeon Femtosekundenlaser jeweils acht porcine Hornhäute geschnitten und die Lamellen hinsichtlich der Schnittflächen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. In **Tabelle 5** sind die Score-Ergebnisse der einzelnen Kriterien (Mittelwerte) der Schnittflächen porciner Hornhäute zusammengefasst.

Tab. 5: Schnittflächenbewertung der porcinen Hornhäute (Mittelwerte der einzelnen Kriterien nach dem Score-System)

Instrument	A	B	C	D	Regularitätsindex (Mittelwert B-D)
	Relief	Oberflächen- beschaffenheit	Unregelmäßigkeiten Anteil Lokalisation		
Gebauer SL MK	1,125	1,5	1,5	1,375	4,375
Amadeus II ZiemerS MK	1	1,25	1,25	1	3,5
Moria CBm MK	1	1	1	1	3,0
TissueSurgeon FSL	1,25	2,0	1,75	1	4,75

Das **Gebauer SL Mikrokeratom** erreichte mit 44 Punkten 50 % von maximal möglichen 88 Punkten der Gesamtbewertung. In der Serie der porcinen Hornhäute fällt auf, dass fast alle möglichen Kriterien der Schnittflächenbewertungen vorkommen. Daraus resultiert ein Regularitätsindex von 4,375. Das Kriterium B (Homogenität) und Kriterium C (Anteil der Unebenheiten) wurde mit einem Durchschnittswert von 1,5 Punkten bewertet, wobei der Anteil an Unebenheiten deutlich schwankt und sowohl peripher als auch zentral vorkommt (Kriterium D). In einem der acht Schnitte (Präparat Nr. 6) wurde die maximal mögliche Einzelbewertung erreicht (vgl. Tabelle 8 und Anlage Nr. 4). Typische Beispielbilder für die jeweils höchste und niedrigste Bewertung sind in der **Abbildung 15** zu sehen.

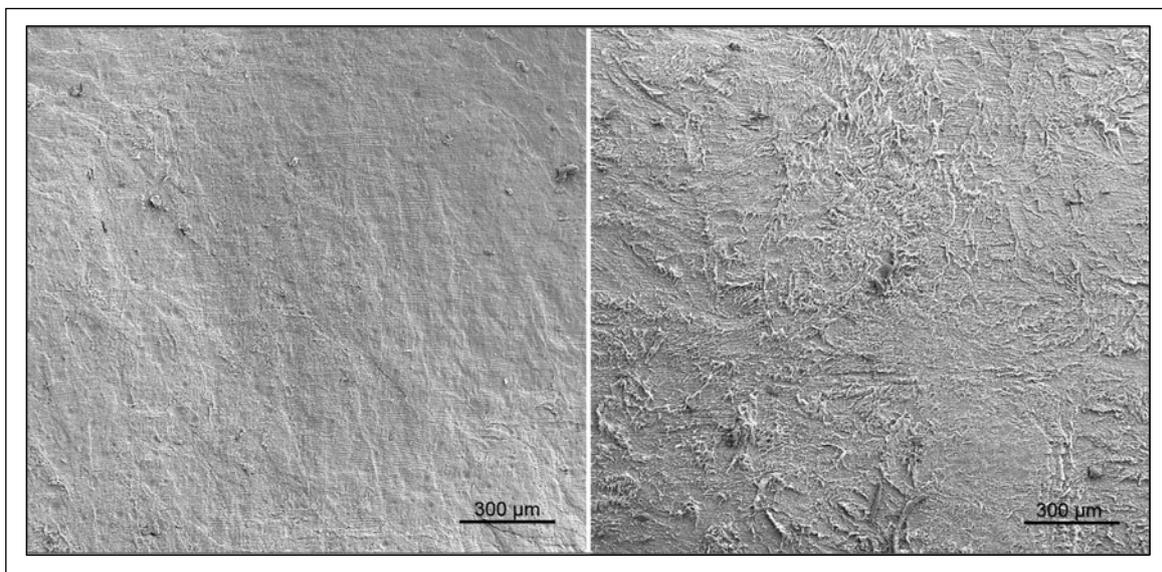


Abb. 15: Typische Befunde der Schnittflächen porciner Hornhäute für das Gebauer SL Mikrokeratom (REM-Aufnahmen 50fache Vergrößerung). Rechts Score = 4; links Score = 10.

Das **Moria CBm Mikrokeratom** erzielte bei den Schnittflächen porciner Hornhäute mit 32 Punkten 36 % der möglichen Gesamtpunktzahl. Dabei weisen alle Schnitte eine ausgeprägte unregelmäßige und raue Schnittoberfläche auf. Es ergibt sich ein Regularitätsindex von 3. Das Kriterium B (Homogenität) und Kriterium C (Anteil der Unebenheiten) wurde mit einem Durchschnittswert von einem Punkt bewertet, wobei der Anteil der Unebenheiten sowohl peripher als auch zentral vorkommt (Kriterium D) und in ausgeprägter Form vorliegt (vgl. Tabelle 8 und Anlage Nr. 6). Die **Abbildung 16** stellt Beispiele für die typischen Schnittbefunde aller Hornhäute dieser Serie dar.

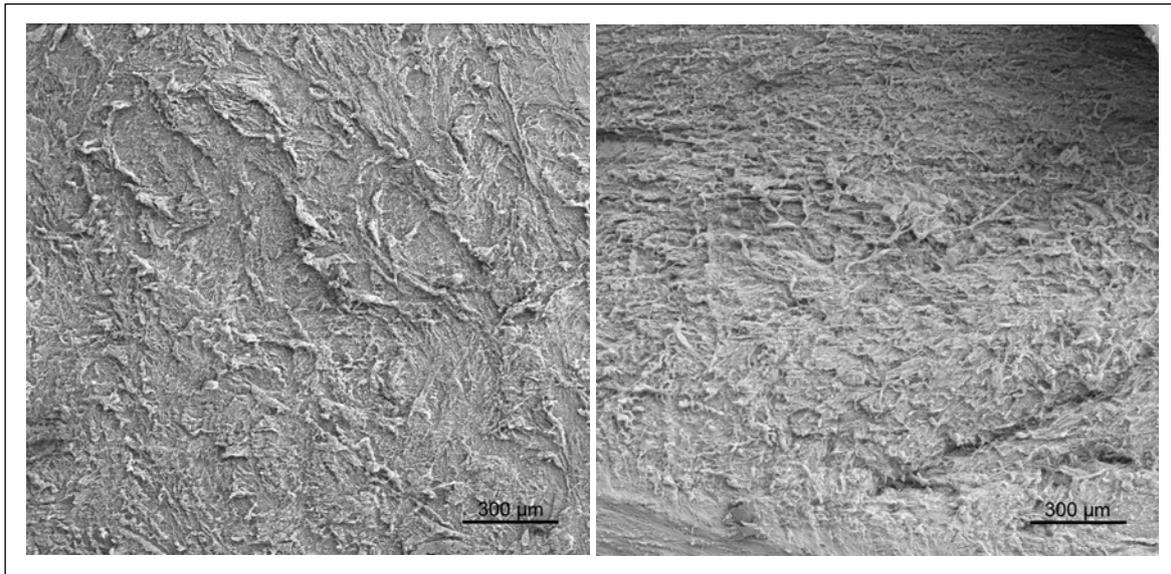


Abb. 16: Typische Bilder der Schnittflächen porciner Hornhäute für das Moria CBm-Mikrokeratom (REM-Aufnahmen 50fache Vergrößerung). Rechts Score = 4; links Score = 4.

Das **Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom** erzielte in dieser Serie mit 36 Einzelpunkten 41 % von möglichen 88 Punkten. Der Regularitätsindex beträgt in dieser Schnittserie 3,375. Das Kriterium B (Homogenität) wurde mit einem Durchschnittswert von 1,25 und das Kriterium C (Anteil der Unebenheiten) mit 1,125 bewertet. Nur in 2 Schnitten liegen teilweise homogene Flächen vor, wobei der Anteil an Unebenheiten in allen Präparaten sowohl zentral als auch peripher auftritt (Kriterium D, vgl. Tabelle 8 und Anlage Nr. 8). Auffallend ist, dass die Schnitte dieser Serie neben einer flachen rauen Oberflächenbeschaffenheit auch in nahezu allen Präparaten kreisrunde Prominenzien mit unterschiedlichen Durchmessern aufweisen. Beispielbilder hierfür sind in **Abbildung 17** dargestellt.

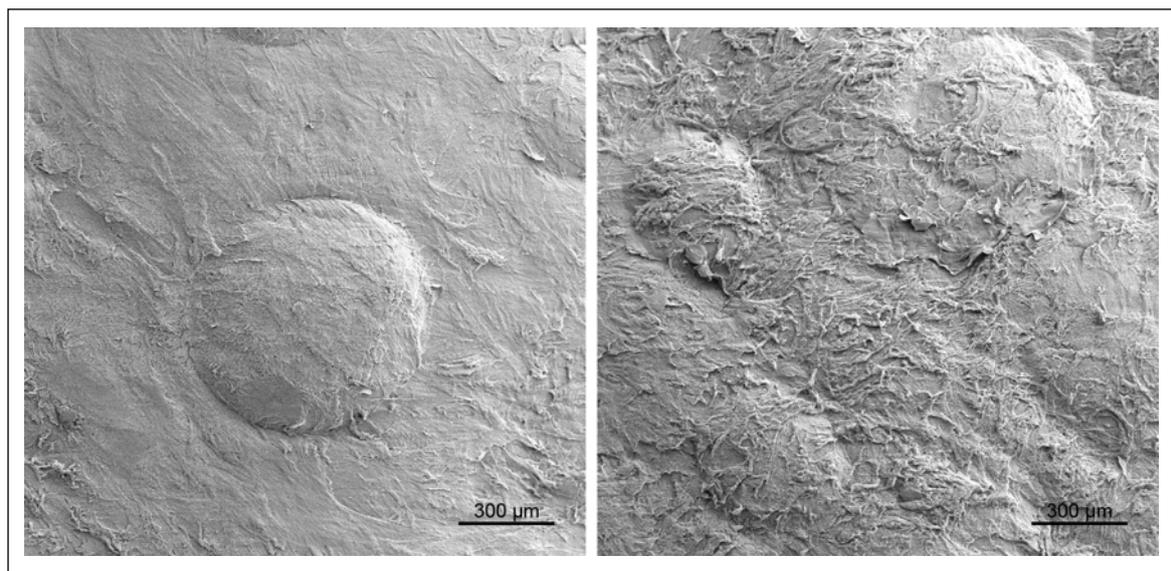


Abb. 17: Typische Befunde der Schnittflächen porciner Hornhäute für das Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom mit kreisrunden Prominenzien unterschiedlicher Durchmesser (REM-Aufnahmen 50fache Vergrößerung). Rechts Score = 4; links Score = 6.

Das **TissueSurgeon Lasermikrotom** erreichte insgesamt 48 Punkte, was bei einer Maximalpunktzahl von 88 Punkten 55 % entspricht. In dieser Serie liegt ein Regularitätsindex von 4,75 vor. Das Kriterium B (Homogenität) weist einen Durchschnittswert von 2,0 auf. Das Kriterium C (Anteil der Unebenheiten) entspricht einem Durchschnittswert von 1,75 und wird hier ebenfalls sowohl zentral als auch peripher beobachtet (vgl. Tabelle 8 und Anlage Nr. 10). Insgesamt ist in nahezu allen Präparaten eine flache relativ inhomogene unebene Oberflächenstruktur sichtbar. Zusätzlich weisen 3 Schnitte auch feine, parallelverlaufende Linien auf. In **Abbildung 18** sind typische Befunde dieser Serie erkennbar.

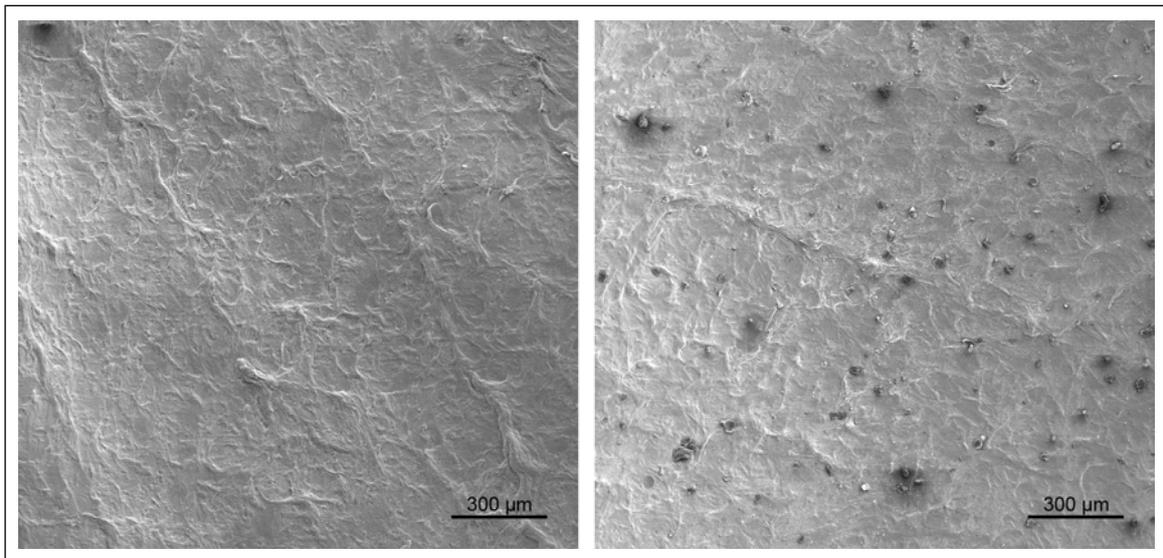


Abb. 18: Typische Befunde der Schnittflächen porciner Hornhäute des TissueSurgeon Lasermikrotoms mit feinen parallelverlaufenden Linien (REM-Aufnahmen 50fache Vergrößerung). Links Score = 7, rechts Score = 5.

3.2 Untersuchungen an humanen Hornhäuten

In der zweiten Serie wurden mit dem Gebauer SL MK, dem Amadeus II ZiemerS MK, dem Moria CBm MK und dem VisuMaxTM Femtosekundenlaser jeweils acht humane Hornhäute geschnitten und die jeweiligen Hornhautlamellen ebenfalls hinsichtlich der Schnittflächen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. In **Tabelle 6** sind die Score-Bewertungen für die einzelnen Kriterien (Mittelwerte) der Schnittflächen humaner Hornhäute aufgelistet.

Tab. 6: Schnittflächenbewertung der humanen Hornhäute (Mittelwerte der einzelnen Kriterien nach dem Score-System)

Instrument	A	B	C	D	Regularitätsindex (Mittelwert B-D)
	Relief	Oberflächen- beschaffenheit	Unregelmäßigkeiten Anteil	Lokalisation	
Gebauer SL MK	1	1	1	1	3
Amadeus II ZiemerS MK	1	1,125	1,125	1,0	3,25
Moria CBm MK	1	1,25	1,25	1,125	3,625
VisuMax TM FSL	1	1	1	1	3

Für die Schnitte humaner Hornhäute wurden mit dem **Gebauer SL Mikrokeratom** 32 Punkte und damit 36 % von möglichen 88 Punkten vergeben. Alle Präparate weisen eine deutlich unebene und raue Oberflächenbeschaffenheit mit zentralen und peripheren Unebenheiten (Kriterium D) auf. Es liegt ein Regularitätsindex von 3 vor. Das Kriterium B (Homogenität) und Kriterium C (Anteil der Unebenheiten) wurde jeweils mit einem Durchschnittswert von einem Punkt bewertet (vgl. Tabelle 8 und Anlage Nr. 3). Die **Abbildung 19** stellt Beispielbilder über die typischen Schnittbefunde dieser Serie dar.

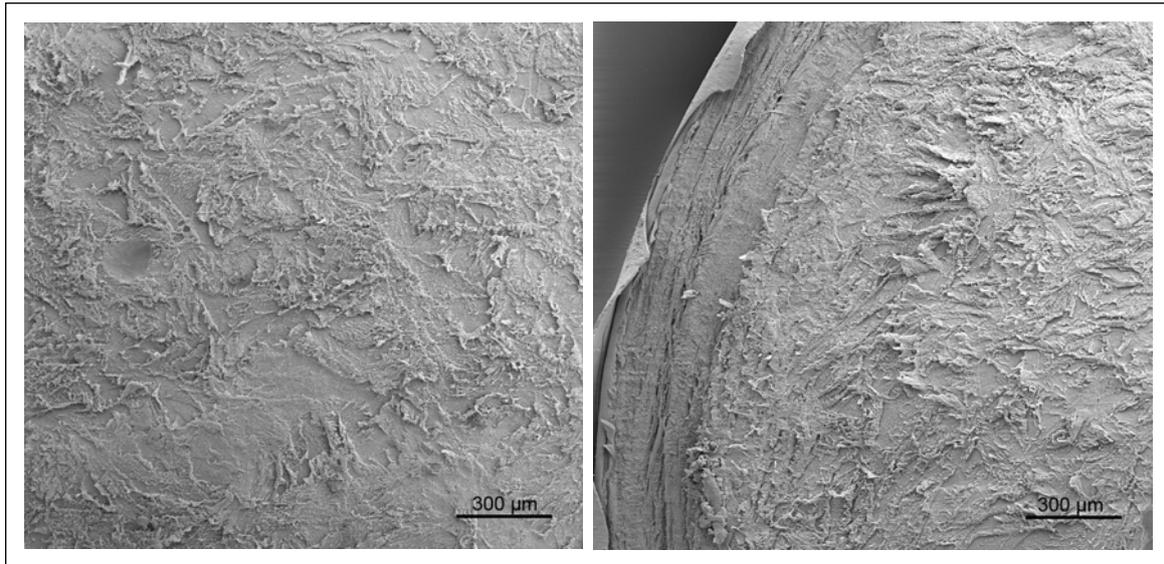


Abb. 19: Beispielbilder für die Schnittflächen an humanen Hornhäuten der Schnittserie des Gebauer SL Mikrokeratoms (REM-Aufnahmen 50fache Vergrößerung). Links Score = 4; rechts mit angrenzendem Schnitttrand, Score = 4.

Das **Moria CBm Mikrokeratom** erzielte bei den humanen Präparaten 42 % der möglichen Maximalpunktzahl von 88 Punkten. Nur in einem Schnitt (Präparat Nr. 4) liegen maximale Einzelbewertungen vor. In allen anderen Schnitten weist die Oberfläche unregelmäßige, an Zotten erinnernde Erhabenheiten auf, die Kriterium D entsprechen und in allen Quadranten erkennbar sind (vgl. Tabelle 8 und Anlage Nr. 5). Beispielbilder dafür sind in **Abbildung 20** zu sehen.

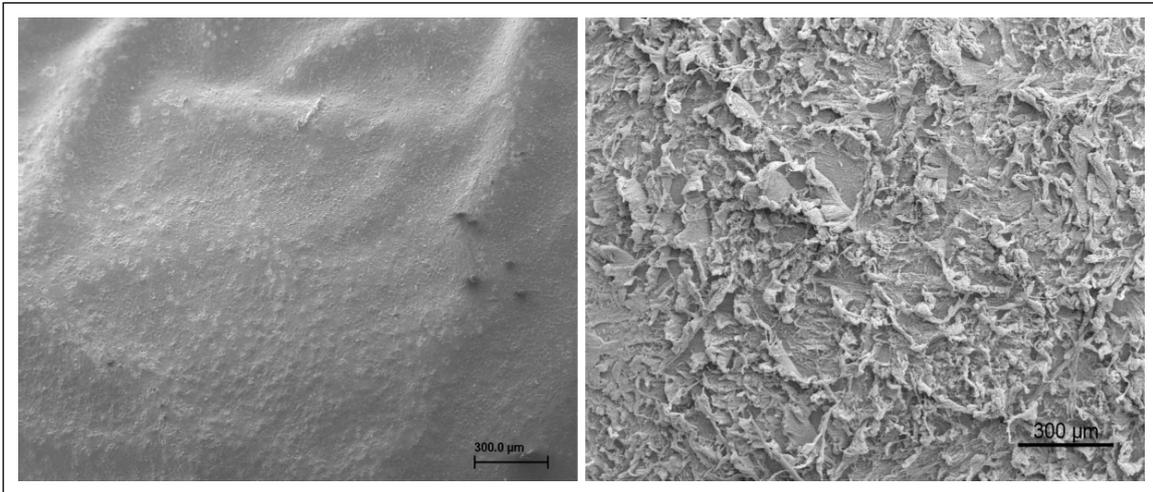


Abb. 20: Typische Befunde der Schnittflächen humaner Hornhäute der Schnittserie des Moria CBm-Mikrokeratoms (REM-Aufnahmen 50fache Vergrößerung). Rechts Score = 4; links Score = 9.

Das **Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom** erreichte bei der Beurteilung der Schnittflächen der humanen Hornhäute 34 von 88 Punkten und erzielt so 39 % der Maximalpunktzahl. Auch hier wurde nahezu in allen Präparaten außer bei Schnitt 7 eine raue und unebene Fläche beobachtet. Die Kriterien B (Homogenität) und C (Anteil der Unebenheiten) wurden jeweils mit einem Durchschnittswert von 1,125 bewertet (vgl. Tabelle 8 und Anlage Nr. 7). Typische Bilder sind in der **Abbildung 21** zu finden.

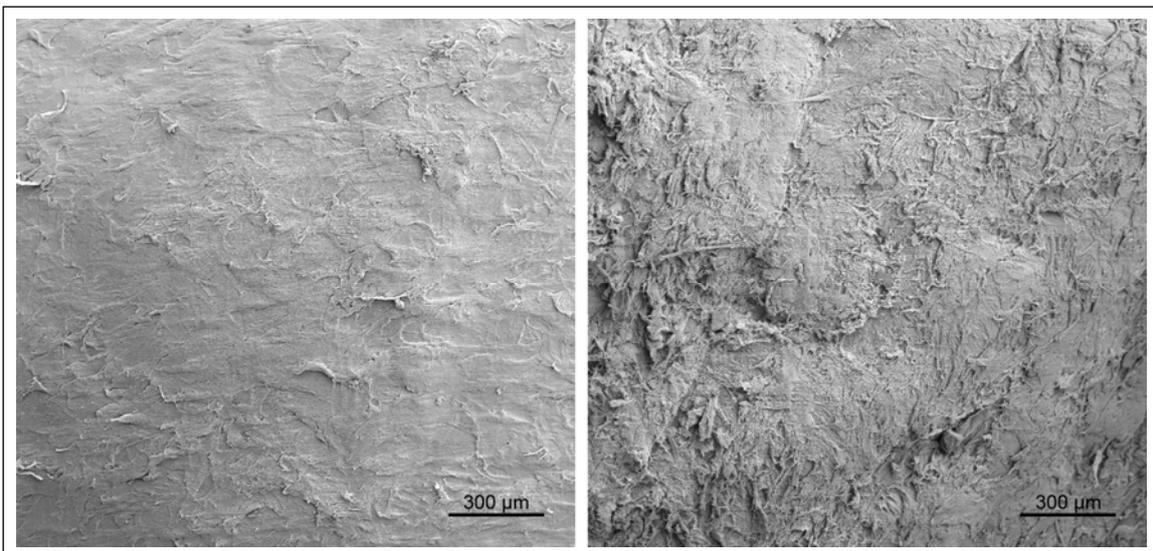


Abb. 21: Typische Befunde der Schnittflächen humaner Hornhäute der Gruppe des Amadeus II ZiemerS Mikrokeratoms (REM-Aufnahmen 50fache Vergrößerung). Rechts Score = 4; links Score = 6.

Der **VisuMax™ Femtosekundenlaser der Firma Zeiss** erzielte bei der Auswertung der humanen Hornhäute mit 32 Punkten 36 % der möglichen Maximalpunktzahl von 88 Punkten. Die Präparate sind durch eine z.T. völlig irreguläre und raue Oberflächenbeschaffenheit gekennzeichnet. Jedes Kriterium (A-D) ergibt den Durchschnittswert von nur einem Punkt (vgl. Tabelle 8 und Anlage Nr. 9). Außerdem sind in allen Präparaten ungeordnete, linienförmige Einkerbungen zu erkennen, die in allen 4 Quadranten auftreten. **Abbildung 22** zeigt Beispielbilder über die Schnittbefunde dieser Serie.

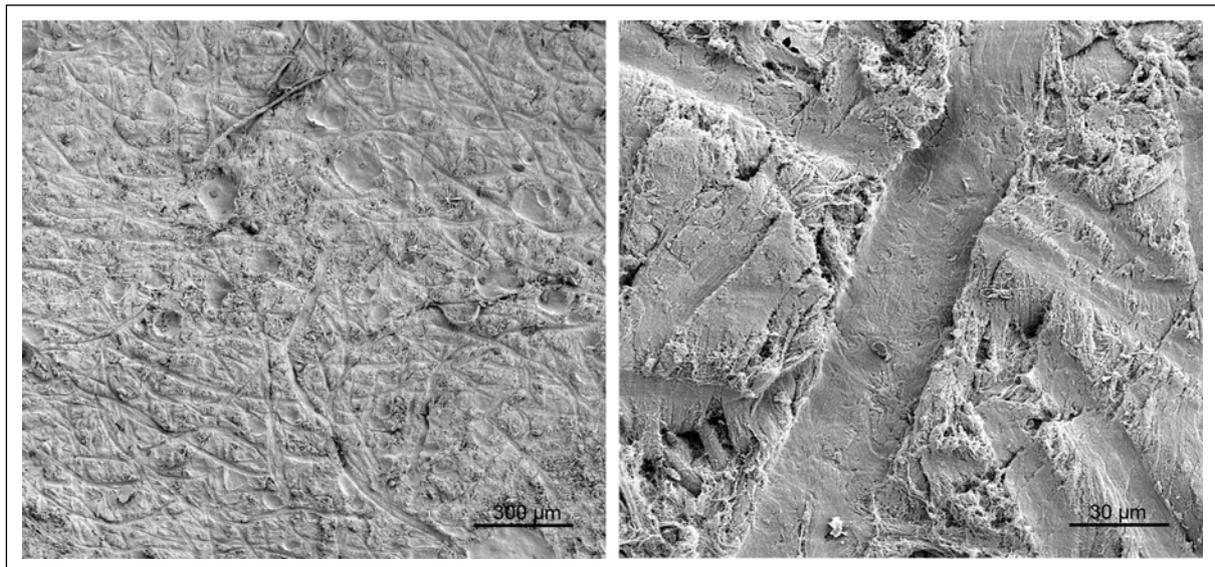


Abb. 22: Typische Befunde der Schnittflächen humaner Hornhäute mit ungeordneten linienförmigen Einkerbungen des VisuMax™ Femtosekundenlasers, Score = 4 (REM-Aufnahmen links 50fache und rechts 500fache Vergrößerung).

3.3 Vergleich der verschiedenen Schneidsysteme

In dieser Versuchsreihe wurden drei verschiedene Mikrokeratome und 2 Femtosekundenlaser getestet. Es wurden mit den Mikrokeratomen sowohl porcine als auch humane Hornhäute geschnitten. In der Schnittserie der porcinen Hornhäute wurden mit dem Gebauer SL Mikrokeratom, Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom, Moria CBm Mikrokeratom und TissueSurgeon Femtosekundenlaser jeweils acht Präparate gewonnen. In der Schnittserie der humanen Hornhäute wurden ebenfalls mit dem Gebauer SL Mikrokeratom, Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom, Moria CBm Mikrokeratom und VisuMaxTM Femtosekundenlaser jeweils acht Hornhäute bearbeitet. Um die Ergebnisse für die vorhandenen Gewebe übersichtlich vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte der einzelnen Kriterien der verschiedenen Schnittserien nach dem Score-System in den **Tabellen 5 und 6** zusammengefasst (siehe Seite 27 und 31).

Schnittserie der porcinen Hornhäute mit allen eingesetzten Schneidgeräten

Beim Vergleich der Femtosekundenlaser erzielte der TissueSurgeon FSL mit 55 % von möglichen 88 Punkten den höchsten Score-Wert unter den Schneidgeräten. Das Gebauer SL Mikrokeratom erzielte bei den porcinen Hornhäuten 50 % von der Maximalpunktzahl und damit den höchsten Score-Wert unter den getesteten Mikrokeratomen. Das Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom erreichte in der Serie der porcinen Hornhäute 41 % des maximalen Score-Wertes und somit den dritthöchsten unter den getesteten Mikrokeratomen. In der Serie der porcinen Hornhäute erzielte das Moria CBm Mikrokeratom nur 36 % und damit den niedrigsten Score-Wert.

Schnittserie der humanen Hornhäute mit allen eingesetzten Schneidgeräten

Mit 42 % erlangte das Moria CBm Mikrokeratom bei den humanen Hornhäuten den zweithöchsten Score-Wert unter den untersuchten Mikrokeratomen und wies im Vergleich zu den porcinen Präparaten eine homogenere Schnittflächenbeschaffenheit auf. In der Schnittserie der humanen Hornhäute erreichte das Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom 39 % von der möglichen Maximalpunktzahl (vierthöchster Score-Wert). Bei den humanen Präparaten erreichte das Gebauer SL Mikrokeratom allerdings nur 36 % der möglichen Maximalpunktzahl (niedrigster Score-Wert). Der VisuMaxTM Femtosekundenlaser jedoch erlangte beim Vergleich der Schnitte an humanem Gewebe ebenfalls wie das Gebauer SL Mikrokeratom nur 36 % von möglichen 88 Punkten und damit den niedrigsten Score-Wert.

Die statistische Auswertung ergab bei den Femtosekundenlasern signifikante Unterschiede hinsichtlich Punktzahl und Regularitätskriterium (je Schnitt) zwischen den humanen und porcinen Präparaten (Mann-Whitney-U-Test, jeweils $p < 0,001$). Bei den Mikrokeratomen unterscheiden sich jedoch die humanen und porcinen Präparate nicht signifikant hinsichtlich Punktzahl und

Regularitätskriterium (vgl. **Anlage Nr. 13**). In **Abbildung 14** sind die Ergebnisse aller Schneidgeräte auf Schnittebene in Form von Boxplots graphisch dargestellt. Dabei ist an den Schnitten porciner Hornhäute zu erkennen, dass das Gebauer SL Mikrokeratom sowohl bei der Punktzahl und dem Regularitätskriterium je Einzelschnitt die größte Spannweite aufweist, hingegen das Moria CBM Mikrokeratom am besten reproduzierbar ist.

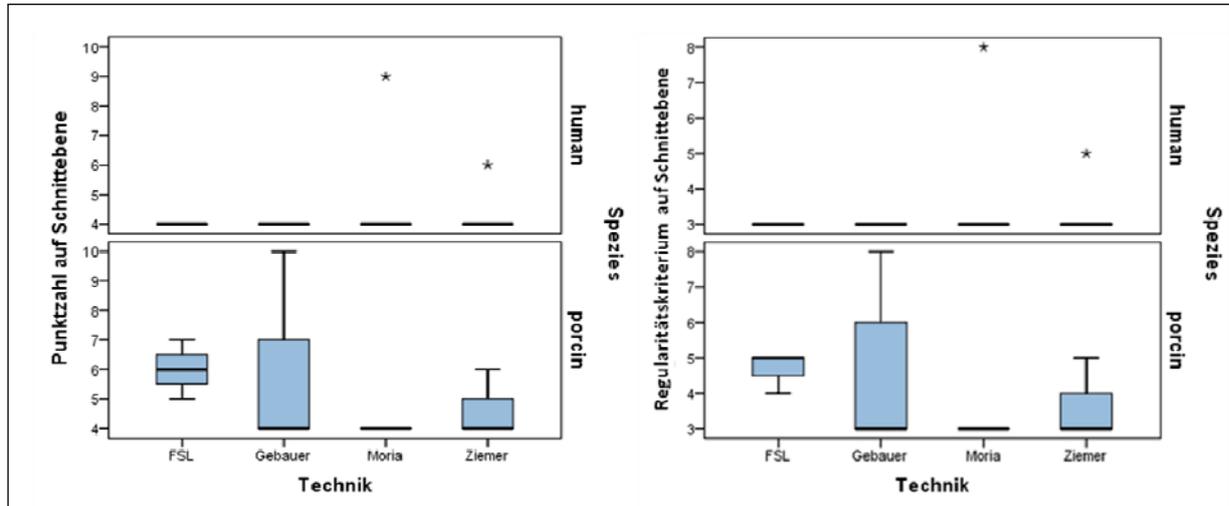


Abb. 14: Boxplots für Punktzahl (rechts) und Regularitätskriterium (links) der Schnittflächen humaner und porciner Hornhäute je Schnitt.

Die Schnitte mit den mechanischen Mikrokeratomen wurden unter Einsatz der in **Tabelle 7** aufgeführten Parameter durchgeführt. Aus Oszillationsfrequenz und Vorschub wurde der Oszillations-Vorschub-Quotient gebildet, um den Weg je Oszillation ableiten zu können. Je größer der Quotient ist, umso kürzer ist die zurückgelegte Strecke und dadurch erfolgen mehr Schneidbewegungen. Der Vorschub beim Moria CBm Mikrokeratom wird durch den Anwender selbst bestimmt, da es sich hier um ein manuell geführtes Mikrokeratom handelt. Damit konnte beim Moria CBm Mikrokeratom kein Oszillations-Vorschub-Quotient errechnet werden. Das Gebauer SL Mikrokeratom zeigte mit 222 Schnitten pro mm Vorschub einen geringgradig niedrigeren Oszillations-Vorschub-Quotienten als beim Amadeus II ZiemserS Mikrokeratom mit 244 Schnitten pro mm (vgl. **Tabelle 7**).

Tab. 7: Übersicht der Geräteparameter mit Angabe der verschiedenen Oszillations-Vorschub-Quotienten

Instrument	Schneidkopf in μm	Oszillations- frequenz in U/min (cuts/min; cuts/s)	Vorschub in mm/s	Oszillations- Vorschub- Quotient in U/min x mm/s (cuts/mm)	Weg je Oszillation in $\mu\text{m}/\text{U}$
Gebauer SL Mikrokeratom	250-450	10.000 20.000 (333)	1.5	6.666 (222)	9.036
ZiemerS, Amadeus II Mikrokeratom	200-450	11.000 22.000 (366)	1.5	7.333 (244)	8.196
Moria CBm Mikrokeratom	130-400	15.000	-	-	-

3.4 Vergleich der Schnittflächen an humanen und porcinen Hornhäuten

Der Regularitätsindex (Summe aus den Mittelwerten der Kriterien B, C und D) drückt die Regelmäßigkeit bzw. Homogenität der Schnittfläche aus. In der **Tabelle 8** sind die jeweils pro Kriterium erreichten Score-Werte für die Schnittflächenbewertung der Schneidgeräte zusammengefasst.

Das Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom erreichte für die porcinen Präparate einen Regularitätsindex von 3,5 und damit den dritthöchsten Wert in der Serie der Schweinehornhäute. Hier lagen bei 25 % der Schnitte teilweise homogene Schnittflächen vor, mit einem Anteil an Unebenheiten von 10-20 %, die zur Peripherie hin zunahmen. Bei den Schnittflächen humaner Hornhäute erreichte das ZiemerS Amadeus II Mikrokeratom einen Regularitätsindex von 3,25 (zweithöchster Regularitätsindex in der Gruppe der humanen Hornhäute). Nur in einem Schnitt (Nr. 7) lag eine teilweise homogene Schnittfläche mit einem Anteil an Unebenheiten von 10-20 % vor. Die restlichen 88 % der Schnitte wiesen hier in über 25 % der Schnittfläche Unebenheiten sowohl peripher als auch zentral auf.

Das Moria CBm Mikrokeratom erzielte in der Serie der porcinen Präparate den niedrigsten Regularitätsindex von 3,0. Im Vergleich zu den Schweinehornhäuten wurde in der Schnittserie des Moria CBm Mikrokeratoms bei den humanen Präparaten der höchste Regularitätsindex von 3,625 vergeben. 88 % der Schnitte zeigten hier Unebenheiten (Kriterium C und D) von > 25 % der Schnittfläche auf, wobei die Unebenheiten über die gesamte Fläche verteilt waren.

Das Gebauer SL Mikrokeratom erzielte einen Regularitätsindex von 4,375 und damit den zweithöchsten Regularitätsindex in der Serie der Schweinehornhäute. Hier wurden in 38 % der Schnitte, das Kriterium B, C und D betreffend, gute Ergebnisse erzielt. In 3 Schnitten lagen z.T. größere homogene Flächen vor. Im Vergleich zu den Schweinehornhäuten erreichte das Gebauer SL MK bei den Schnittflächen menschlicher Hornhäute den niedrigsten Regularitätsindex von 3,0.

Den höchsten Regularitätsindex der an den porcinen Hornhäuten getesteten Schneidgeräte erzielte der TissueSurgeon FSL (4,75). Insgesamt lag hier eine bessere Schnittqualität vor. Trotzdem zeigten auch hier bis zu 25 % der Schnitte einen Anteil an Unebenheiten von über 25 % der Schnittfläche und 75 % der Schnitte einen Anteil von 10-20 %. Da mit diesem Femtosekundenlaser ausschließlich porcine Hornhäute geschnitten wurden, ist für diese Serie ein Vergleich zwischen porcinen und humanen Präparaten nicht möglich. Mit dem VisuMaxTM FSL wurden nur humane Hornhäute bearbeitet. Dieser Femtosekundenlaser erzielte den niedrigsten Regularitätsindex von 3,0 und damit vergleichbare Resultate wie die Mikrokeratome. Auch hier ist ein Vergleich zwischen humanen und porcinen Hornhäuten nicht möglich, da mit diesem Gerät keine porcinen Hornhäute bearbeitet wurden. Das Schnittmuster des Femtosekundenlasers zeigte in dieser Serie über die gesamte Fläche linienförmige Einkerbungen, die ungeordnet verlaufen und von einer rauen Oberfläche umgeben sind.

Beim Vergleich der Schnittflächen hinsichtlich ihrer Homogenität wurden die porcinen Hornhäute bis auf die Schnittserie des Moria CBm Mikrokeratoms mit einem höheren Regularitätsindex bewertet. In der Serie der porcinen Präparate wurde nur beim Moria CBm Mikrokeratom der niedrigste

Regularitätsindex mit 3,0 vergeben. In der Schnittserie der humanen Hornhäute wurden jedoch beim Gebauer SL Mikrokeratom und beim VisuMaxTM Femtosekundenlaser hier die niedrigsten Score-Werte zugeordnet. Es wurde allerdings in keinem Fall - weder bei den porcinen noch bei den humanen Präparaten - der höchstmögliche Regularitätsindex von 9 Punkten erzielt.

In der Serie der porcinen Hornhäute konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich Punktzahl und Regularitätskriterium zwischen den einzelnen Schneidgeräten nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,003$ jeweils für Punktzahl, $p = 0,005$ für Regularitätskriterium). Bei den humanen Hornhäuten waren aber keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Punktzahl oder Regularitätskriterium zwischen den einzelnen Schneidgeräten auszumachen (Kruskal-Wallis-Test, jeweils $p = 0,558$, vgl. **Anlage Nr. 14** und **Nr. 15**). Die **Abbildung 23** stellt den Regularitätsindex für die Schnitte an humanen und porcinen Hornhäuten in Form von Säulendiagrammen gegenüber. Der prozentuale Anteil der erreichten Punkte von der möglichen Maximalpunktzahl ist als Liniendiagramm in diese Graphik integriert.

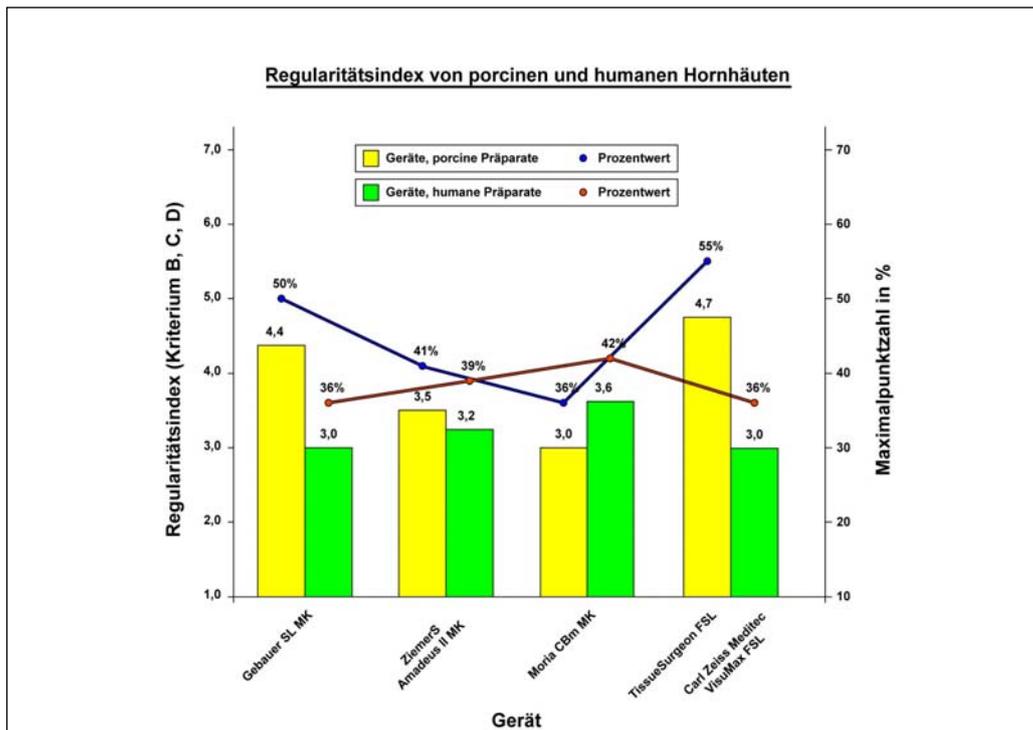


Abb. 23: Reguläritätsindex aller getesteten Schneidgeräte humaner und porciner Hornhäute sowie prozentualer Anteil an der Maximalpunktzahl von 88 Punkten.

Der Gesamtscore, der durch die Summe der Mittelwerte der Ergebnisse gebildet wird, ist unter Berücksichtigung humaner und porciner Hornhäute als Säulendiagramm in **Abbildung 24** dargestellt. Auch hier ist der prozentuale Anteil der erzielten Punkte von der Maximalpunktzahl als Liniendiagramm in diese Graphik eingefügt.

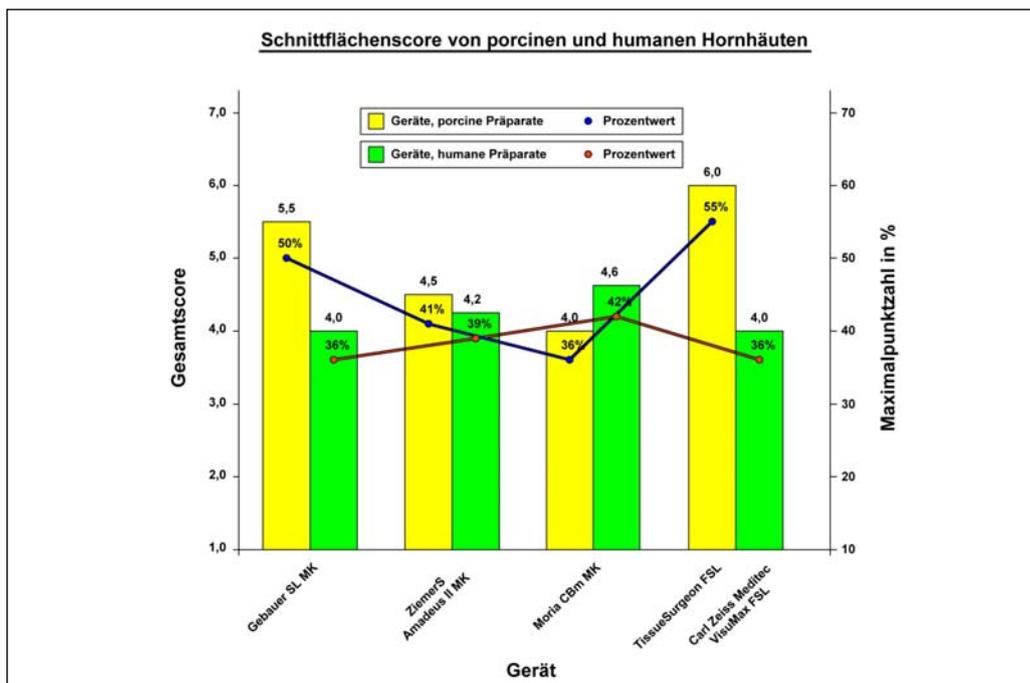


Abb. 24: Gesamtscore aller getesteten Schneidgeräte humaner und porciner Hornhäute sowie prozentualer Anteil an der Maximalpunktzahl von 88 Punkten.

Das Kriterium A beschreibt die Reliefbeschaffenheit. Bei der Bewertung des Oberflächenreliefs konnten hier nur maximal zwei Punkte vergeben werden, wenn keine absoluten Unebenheiten vorlagen. Nur in drei Schnitten aller Präparate waren keinerlei Unebenheiten sichtbar (vgl. **Abbildung 25**). In der Serie der porcinen Präparate wurde das Kriterium A bei dem Gebauer SL Mikrokeratom in einem Schnitt (Präparat Nr. 6) mit einer Höchstpunktzahl von zwei Punkten (Score 1,125) bewertet. Des Weiteren wurde in der Serie der mit dem TissueSurgeon FSL geschnittenen porcinen Präparate in zwei Schnitten eine Maximalpunktzahl von zwei Punkten (Score 1,25) vergeben. Bei den humanen Hornhäuten wurden in allen Präparaten Unebenheiten beobachtet. Deshalb wurde hier das Kriterium A lediglich mit einem Score-Wert von „1“ bewertet (vgl. **Tabelle 8**).

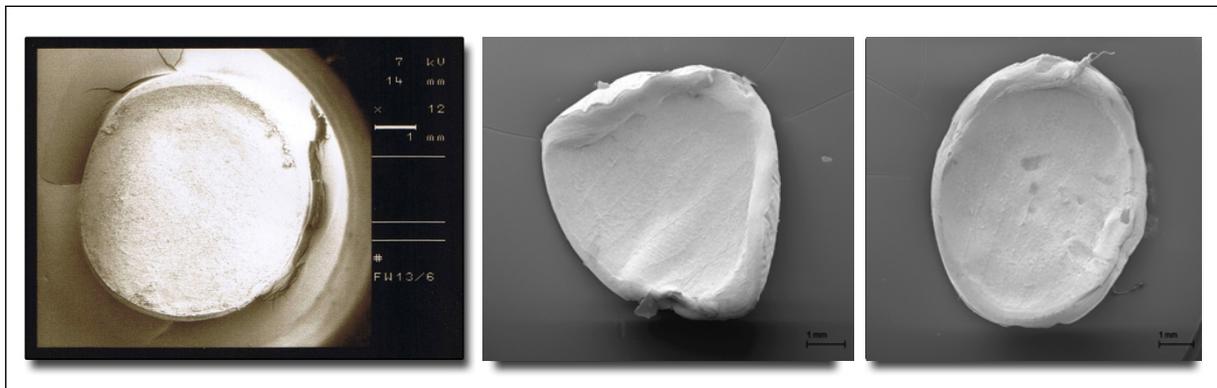


Abb. 25: Übersichtsaufnahmen in 10facher Vergrößerung. Links: Gebauer SL MK; Mitte und rechts: TissueSurgeon FSL, jeweils Score = 2 (Kriterium A).

Tab. 8: Gegenüberstellung der Ergebnisse für die verschiedenen Schneidsysteme an humanen und porcinen Hornhäuten

Schneidgeräte	Humane Hornhäute	Porcine Hornhäute
Gebauer SL Mikrokeratom	A Relief: 1 B Oberflächenbeschaffenheit: 1 Unregelmäßigkeiten: C Anteil: 1 D Lokalisation: 1 Regularitätsindex: 3 Gesamtscore: 4 Gesamtpunktzahl: 32 = 36 %	A Relief: 1,125 B Oberflächenbeschaffenheit: 1,5 Unregelmäßigkeiten: C Anteil: 1,5 D Lokalisation: 1,375 Regularitätsindex: 4,375 Gesamtscore: 5,5 Gesamtpunktzahl: 44 = 50 %
Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom	A Relief: 1 B Oberflächenbeschaffenheit: 1,125 Unregelmäßigkeiten: C Anteil: 1,125 D Lokalisation: 1 Regularitätsindex: 3,25 Gesamtscore: 4,25 Gesamtpunktzahl: 34 = 39 %	A Relief: 1 B Oberflächenbeschaffenheit: 1,25 Unregelmäßigkeiten: C Anteil: 1,25 D Lokalisation: 1 Regularitätsindex: 3,5 Gesamtscore: 4,5 Gesamtpunktzahl: 36 = 41 %
Moria CBm Mikrokeratom	A Relief: 1 B Oberflächenbeschaffenheit: 1,25 Unregelmäßigkeiten: C Anteil: 1,25 D Lokalisation: 1,125 Regularitätsindex: 3,625 Gesamtscore: 4,625 Gesamtpunktzahl: 37 = 42 %	A Relief: 1 B Oberflächenbeschaffenheit: 1 Unregelmäßigkeiten: C Anteil: 1 D Lokalisation: 1 Regularitätsindex: 3 Gesamtscore: 4 Gesamtpunktzahl: 32 = 36 %
TissueSurgeon FSL		A Relief: 1,25 B Oberflächenbeschaffenheit: 2 Unregelmäßigkeiten: C Anteil: 1,75 D Lokalisation: 1 Regularitätsindex: 4,75 Gesamtscore: 6 Gesamtpunktzahl: 48 = 55 %
VisuMax™ FSL	A Relief: 1 B Oberflächenbeschaffenheit: 1 Unregelmäßigkeiten: C Anteil: 1 D Lokalisation: 1 Regularitätsindex: 3 Gesamtscore: 4 Gesamtpunktzahl: 32 = 36 %	

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

In den vorliegenden Untersuchungen wurden humane und porcine Hornhäute bearbeitet. Das Schweineauge ist ein in Studien häufig eingesetztes Modell [66-68], da es ähnliche Eigenschaften wie die menschliche Hornhaut aufweist und es viele Analogien zwischen den beiden Spezies in Bezug auf die Anatomie und Physiologie gibt. **Tabelle 9** enthält eine Gegenüberstellung der Eigenschaften für die porcine und humane Hornhaut [69]. Die Schweinehornhaut ist nach den Untersuchungen von Sanchez et al. nahezu doppelt so dick wie die menschliche Hornhaut (Ultraschallpachymetrie Schweinehornhaut 877,6 μm , menschliche Hornhaut 520 μm). Außerdem fehlt bei den porcinen Hornhäuten die Bowman-Lamelle [70, 71]. Bartholomew vermutete nach sonographischen Aufnahmen das Vorliegen einer Bowman-Lamelle. Diese Aussage wurde jedoch von ihm in nachfolgenden histologischen Untersuchungen widerlegt [72]. Außerdem wurden an isolierten Schweineaugen bei längerer post Eukleationszeit erhöhte Werte in der Hornhautpachymetrie beobachtet [70]. Eine direkte Übertragung der Ergebnisse der Untersuchungen auf das menschliche Auge ist daher nur bedingt möglich. Ahearne und Mitarbeiter haben die mechanischen Eigenschaften porciner und humaner Hornhäute untersucht und festgestellt, dass die porcine Hornhaut im geladenen Zustand weniger stabil als die menschliche Hornhaut ist und eine größere lineare Antwort aufweist [73]. Elsheikh und Mitarbeiter konnten jedoch bei biomechanischen Untersuchungen an porcinen und humanen Hornhäuten keine wesentlichen Unterschiede finden [74]. Durch die größere Hornhautdicke und leichtere Verformbarkeit des Schweineauges aufgrund der fehlenden Bowman-Lamelle werden auch der Mikrokeratomschnitt und somit die Lentikeldicke beeinflusst. Die Lamellen fallen deshalb bei porcinen Hornhäuten dicker aus [68].

Tab.9: Vergleich der Parameter humaner und porciner Hornhäute nach Hara und Cooper [69]

	porcine Hornhaut	humane Hornhaut
Brechkraft (dpt)	40,4	43,0
Durchmesser (mm):		
Horizontal	14,9	11,7
Vertikal	12,4	10,6
Dicke (μm):		
Zentral	666	536
Peripher	714	593

Das zur Bewertung der Schnittflächenqualität eingesetzte Score-System ist ein in vorausgegangenen Studien etabliertes Verfahren, um semiquantitative Aussagen über die Ergebnisse treffen zu können [62-64, 75]. Bei der Bewertung der jeweiligen Kriterien (B-D) konnte eine Höchstpunktzahl von 3 Punkten und für das Kriterium A eine Höchstpunktzahl von 2 Punkten vergeben werden. Dies bedeutet, dass durch die geringe Spannbreite der zu vergebenen Punkte eine differenzierte Beurteilung möglicher Unterschiede zwischen den Präparaten in der Serie nicht erfasst werden konnte, was allerdings auch keinen Nachteil darstellt, da ein zu detailliertes Score-System die Bewertung der Ergebnisse unübersichtlicher und schlechter vergleichbar machen würde. Bei der Umwandlung eines Qualitätsmerkmals in eine Quantität besteht die Gefahr einer subjektiven Beeinflussung bei der Bewertung der Ergebnisse. Da die Punktzahl aber nur durch eine Person vergeben wurde, wirkt sich diese mögliche Fehlerquelle gleichermaßen auf alle Ergebnisse aus. Bei der Testung der Femtosekundenlaser konnten nicht für beide Geräte humane und porcine Hornhäute verwendet werden. Die Entscheidung für jeweils acht Präparate wurde durch die begrenzte Anzahl der Trocknungskammern, die für die Kritische-Punkt-Trocknung benötigt wurden, festgelegt. Der zeitliche Aufwand und die Kosten für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen hatten bei der Planung der Studie zu einer Limitierung für die Anzahl der geschnittenen Präparate geführt, welche eine Erklärung für den fixen Stichprobenumfang in dieser Arbeit darstellt.

4.2 Kritische Bewertung der verschiedenen Schneidsysteme

Die Ergebnisse der Schnittflächenbewertung haben gezeigt, dass ein hoher Grad an Reproduzierbarkeit innerhalb der jeweiligen Schnittserie vorlag. Die Mikrokeratome, deren Eigenschaften den Erfolg der refraktiven Hornhautchirurgie beeinflussen, haben sich in den letzten Jahrzehnten weiterentwickelt [76]. Aufgrund der zunehmenden Automatisierung der Mikrokeratome und dem dadurch fehlenden Einfluss des Anwenders wäre die erhöhte Reproduzierbarkeit erklärbar. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Eigenschaften der eingesetzten Mikrokeratome sowie durch den Oszillations-Vorschub-Quotienten die Qualität der Schnitte bestimmt wird [62, 77]. Man geht davon aus, dass infolge eines zu hohen Oszillations-Vorschub-Quotienten mehr Schneidebewegungen pro Weg zurückgelegt werden, das Gewebe komprimiert wird und dadurch eine Diskontinuität in den Schnitten resultiert [63]. Trotz gleicher Vorschubgeschwindigkeit und nahezu gleicher Oszillationsfrequenz wurden mit dem Gebauer SL Mikrokeratom und dem Amadeus II ZiemeRS Mikrokeratom unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Morphologie der Schnitte mit Score-Werten von 36 % bis 50 % von möglichen 88 Punkten erzielt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Oszillations-Vorschub-Quotient auf die Schnittflächenqualität in dieser Serie keinen wesentlichen Einfluss hat. Hamill und Kohlen haben festgestellt, dass bei hohen Oszillationsfrequenzen bessere Schnittqualitäten resultieren [77]. Dagegen konnten Therani und

Mitarbeiter bei festen Oszillationsfrequenzen und erhöhter Vorschubgeschwindigkeit vermehrte Unebenheiten der Schnittflächen feststellen. Jedoch wurden bei fester Vorschubgeschwindigkeit und höheren Oszillationsfrequenzen homogenere Schnittflächen erzielt [78].

In der Serie der mit dem TissueSurgeon FSL geschnittenen Schweinehornhäute zeigten sich parallelverlaufende wellenförmige Linien, wie sie auch in anderen Untersuchungen mit verschiedenen Mikrokeratomen beobachtet wurden [78]. Diese können nach Annahme von Stonecipher und Mitarbeitern durch Druckwellen infolge der Oszillation entstehen [78]. Eine weitere Erklärung für die wellenförmigen Linien liegt laut Draeger und Mitarbeiter in der ständigen Änderung der Schnittrichtung und der Vibrationsübertragung auf das Gewebe [63, 79, 80].

Bei den Präparaten des VisuMaxTM FSL fanden sich ungeordnet verlaufende Rillen über die gesamte Schnittfläche. In einer Studie von Kunert et al. wurde die Schnittflächenqualität humaner Lentikel nach Einsatz des VisuMaxTM FSL untersucht. Hier wurden 3 unterschiedliche Muster im stromalen Bett nachgewiesen. Zum Einen war eine gezackte Oberfläche, die durch Gewebebrücken entsteht, auffällig. Außerdem fanden sich ringförmige, z. T. konfluierende Vertiefungen. Diese wurden durch die Kavitationsblasen erklärt, die während des Schneidvorganges mit einem Femtosekundenlaser entstehen. Des Weiteren zeigten sich kreuz und quer verlaufende Rillen über die gesamte Schnittfläche, welche auch in unserer Serie nachgewiesen wurden [81]. Bei der Anwendung von Femtosekundenlasern entsteht ein Plasma, welches zu einem elektrischen Feld mit sehr hoher Intensität führt. Der Laserimpuls wird in dem Plasma absorbiert, welches expandiert und das Gewebe wird durch das Aneinanderreihen der Kavitationsblasen gespalten. Dieser Vorgang wird als Photodisruption beschrieben [82]. Das Entstehen unregelmäßiger Schnittflächen wird durch die Zunahme des Fokusbereichs mit höherem Energiebedarf für jeden Laserimpuls erklärt. In einer großen Studie der Arbeitsgruppe von Moshirfar et al. wurden intra- und postoperative Komplikationen nach Einsatz von Mikrokeratomen und Femtosekundenlasern bei der LASIK verglichen. Hier traten in der Mikrokeratom-Gruppe bedeutend mehr epitheliale Defekte und in der Femtosekundenlaser-Gruppe bedeutend mehr lamelläre Keratitiden auf. Wellenförmige Linien der Schnittflächen, welche auch in der Serie des TissueSurgeon Femtosekundenlasers sichtbar waren (vgl. **Abbildung 18**), wurden in der o. g. Arbeits-Gruppe von Moshirfar et al. nicht beschrieben [83].

In der Schnittserie des VisuMaxTM Femtosekundenlasers wurde konstant eine Energie von 180 nJ angewendet. Beim TissueSurgeon Femtosekundenlaser variierte die eingesetzte Energie zwischen 80 und 110 nJ. In verschiedenen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die Impulsenergie mit der Schnittflächenbeschaffenheit korreliert. Eine höhere Impulsenergie führt zur Abnahme des Regularitätsindex [81]. Beim Vergleich der Resultate der eingesetzten Femtosekundenlaser ist festzustellen, dass in der Serie des TissueSurgeon Femtosekundenlasers ein höherer Regularitätsindex (4,75) erzielt wird. Allerdings kann ein direkter Vergleich der Ergebnisse in der Serie der beiden Femtosekundenlaser nicht gestellt werden, da in beiden Serien jeweils nur Hornhäute einer Spezies geschnitten wurden.

4.3 Gegenüberstellung der Schnittflächen an humanen und porcinen Hornhäuten

Beim Vergleich der Resultate von Schnittflächen an humanen und porcinen Hornhäuten fällt auf, dass unter den getesteten 3 Mikrokeratomen das Gebauer SL Mikrokeratom mit 50 % und das Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom mit 41 % von möglichen 88 Punkten ein besseres Ergebnis als die humanen Präparate in der jeweiligen Serie aufweist. In den Schnittserien mit dem Moria CBm Mikrokeratom wurden jedoch für die humanen Hornhäute höhere Punktwerte (42 %) als für die porcinen Hornhäute vergeben. Zusammenfassend wurde beim Gebauer SL Mikrokeratom ein 14%iger Unterschied bezüglich der erreichten Punktzahl im Vergleich der Ergebnisse für die Schnittflächen porciner und humaner Hornhäute beobachtet. In der Serie der mit dem Moria CBm Mikrokeratom geschnittenen Hornhäute besteht im Vergleich zum Gebauer SL Mikrokeratom ein 6%iger Unterschied zugunsten der humanen Präparate. Für die mit dem Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom geschnittenen Präparate resultiert beim Vergleich von porcinen und humanen Hornhäuten hinsichtlich der erzielten Punktzahl nur eine 2%ige und damit nur eine sehr geringe Differenz. Der größte Unterschied zwischen den Schnittflächen humaner und porciner Hornhäute war bei der Verwendung des Gebauer SL Mikrokeratoms zu verzeichnen. Die Ergebnisse der getesteten Mikrokeratome in der Gruppe der humanen Hornhäute haben ähnliche Bewertungen mit 36 % bis 42 % von möglichen 88 Punkten. Dies bedeutet, dass innerhalb dieser Versuchsreihe keine großen Unterschiede vorliegen. Der VisuMaxTM FSL erzielt ebenfalls nur 36 % von der Gesamtpunktzahl und damit vergleichbare Ergebnisse wie die mechanisch schneidenden Geräte. In der Gruppe der porcinen Präparate wurden bei den untersuchten drei mechanischen Mikrokeratomen 36-50 % erzielt. Der TissueSurgon FSL erreichte sogar 55 % der Gesamtpunktzahl. Damit wurden insgesamt bessere Resultate in der Gruppe der porcinen Hornhäute beobachtet. Diese Resultate in der Serie der Schweinehornhäute sind am ehesten durch die Gewebeeigenschaften der porcinen Hornhäute zu erklären. Das Stroma der Schweinehornhaut enthält im Vergleich zum humanen Stroma einen größeren Anteil an Kollagen Typ I [70]. Da humane und porcine Hornhäute unterschiedliche Kollagentypen besitzen und bei den porcinen Hornhäuten die Bowman-Lamelle fehlt, verhält sich die Schweinehornhaut bei Mikrokeratomschnitten anders als humanes Gewebe. Die Arbeitsgruppe Sanaka et al. hat in einer Studie den Einfluss verschiedener Parameter von Mikrokeratomen bei der LASIK hinsichtlich der Interface-Qualität an humanen und porcinen Hornhäuten verglichen. Die Schnittflächen der humanen Hornhäute waren im Vergleich zu denen der porcinen viel rauer. Die Schweinehornhäute hatten statistisch signifikant glattere Stromabetten als menschliche Hornhäute. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Ergebnisse bezüglich der Schnittflächenbeschaffenheit des stromalen Bettes bei porcinen Hornhäuten nicht unkritisch auf humane Hornhäute übertragbar sind [84]. An den Schnittflächen der porcinen Hornhäute waren in der Serie der mit dem Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom geschnittenen Präparate, kreisrunde Erhabenheiten mit unterschiedlichem Durchmesser nachweisbar (vgl. **Abbildung 17**, Seite 29). Eine Erklärung dafür gibt es bisher nicht, jedoch ist zu vermuten, dass Druckschwankungen infolge der Oszillationen während des Schneidvorganges eine Rolle spielen.

4.4 Vergleich der Resultate mit anderen Studien

Aufgrund der rasanten Weiterentwicklung und Perfektionierung der mikrochirurgischen Techniken bei der Präparation von Hornhautlamellen werden derzeit sowohl Mikrokeratome als auch Femtosekundenlaser eingesetzt. Die posteriore lamelläre Hornhauttransplantation zur Behandlung endothelialer Hornhauterkrankungen stellt eine technisch anspruchsvolle Operation dar, die eine hohe Präzision erfordert. Bei der „Descemet stripping (automated) endothelial keratoplasty“ kann die Präparation der Spenderlamelle entweder manuell „Descemet stripping endothelial keratoplasty“ (DSEK) oder mittels eines Mikrokeratoms als „Descemet stripping automated endothelial keratoplasty“ (DSAEK) erfolgen [85]. Da bei der DSAEK mit dem Mikrokeratom die posterioren Hornhautlamellen nur in standardisierten Tiefen geschnitten werden können, ist eine genaue Determinierung der exakten Dicke der Spenderlamelle nicht planbar. Eine weitere Möglichkeit zur Präparation der Spenderlamelle stellt der Femtosekundenlaser dar (fs-DSAEK). Die fs-DSAEK wird zur Bereitstellung der Spenderlamelle zunehmend angewendet, weil man davon ausgeht, dass die visuellen Ergebnisse mit der Dicke der Spenderlamelle korrelieren (je dünner, um so besser) und mit dem FSL eine exakte Dicke der Spenderhornhaut eingestellt werden kann [57, 86-90]. Die histologischen Ergebnisse aus einer initialen Studie von Augen aus Hornhautbanken (University of Iowa Hospitals and Clinics) haben gezeigt, dass mit dem Mikrokeratom (Moria ALTK) geschnittene Hornhautlamellen eine insgesamt homogenere Oberflächenbeschaffenheit mit einer glatteren Kontur und dünneren endothelialen Lamellen aufweisen als die mit einem Femtosekundenlaser geschnittenen Hornhautlamellen [91]. Es ist bekannt, dass bei Gebrauch eines Femtosekundenlasers die Homogenität der Schnittfläche durch die Impulsenergie beeinflusst wird. Bei einer Zunahme der Impulsenergie wurde eine Abnahme des Regularitätsindex beobachtet [81]. In einer Studie, bei der ein Mikrokeratom mit einem Femtosekundenlaser an humanen Hornhäuten, die nicht für eine Transplantation geeignet waren, verglichen wurde, hat sich gezeigt, dass sowohl der 60 kHz IntraLase Femtosekundenlaser als auch das Zyoptix XP Mikrokeratom mit einem 120 µm Schneidkopf (neue Klinge pro Schnitt) sowohl qualitativ als auch quantitativ glatte und homogene Stromabett-Qualitäten produzieren. Es wurden jedoch signifikant bessere Ergebnisse für die Schnittfläche in der Serie der mit dem Femtosekundenlaser geschnittenen Präparate nachgewiesen. Der 60 kHz IntraLase Femtosekundenlaser erzeugt aufgrund der engen spot/line Trennung und niedrigen Energie glattere Stromflächen als die in vorherigen Studien getesteten Femtosekundenlaser. Vergleichbare Resultate wurden auch in einer anderen Studie, in der das Hansatome Mikrokeratom mit einem 160 µm Schneidkopf und der IntraLaser 15- und 30-kHz Femtosekundenlaser an humanen Hornhäuten eingesetzt wurden, publiziert [92, 93]. Andererseits haben weitere Untersuchungen gezeigt, dass das Zyoptix XP Mikrokeratom im Vergleich zum Femtec Femtosekundenlaser an Schweinehornhäuten deutlich homogenere Schnittresultate erzielt hat [94]. Sanka et al. haben festgestellt, dass humane und porcine Hornhäuten nicht vergleichbar sind. Die Autoren schlussfolgern daher, dass aufgrund der

morphologischen Unterschiede zwischen humanen und porcinen Hornhäuten (Bowman-Lamelle fehlt) zukünftige Studien nur an humanen Hornhäuten durchgeführt werden sollten [84].

4.5 Schlussfolgerung und Ausblicke

Die Durchführung von zahlreichen Studien an Hornhautlamellen nach Anfertigung lamellärer Schnitte demonstriert, dass die Beschaffenheit der Schnittflächen große Bedeutung für das postoperative Ergebnis hat. Diese liegt insbesondere in der Reproduzierbarkeit der Resultate. Hierbei spielt der Einsatz verschiedener Schneidgeräte bei der Präparation der Hornhautlamellen eine bedeutende Rolle. Bisher hatten die Mikrokeratome gegenüber der manuellen und der Femtosekundenlaser-gesteuerten Gewinnung der posterioren Hornhautlamellen dominiert [85]. Der Femtosekundenlaser, der mit der Einführung der LASIK bereits in der refraktiven Hornhautchirurgie etabliert ist, findet auch zunehmend Anwendung bei der Hornhauttransplantation. Allerdings ist es derzeit noch ein sehr „junges“ Verfahren. Der Laser bietet die Möglichkeit, in allen Schichten der Hornhaut exakte, auf wenige Mikrometer Dicke, genau definierte und damit reproduzierbare Schnitte anzufertigen [86]. Dadurch stellt die fs-DSAEK ein sicheres und präzises Verfahren bei der Präparation der Spenderlamelle dar, welches initial von Cheng und Mitarbeitern beschrieben wurde [39]. Es werden auch bessere klinische Resultate durch eine definierte Stromadicke, mitunter von äußerst dünnen Lamellen, möglich. Man geht davon aus, dass die visuellen Ergebnisse mit der Dicke der Spenderlamelle korrelieren. Das bedeutet, je dünner die Hornhautlamelle ist, umso besser ist der postoperativ erreichbare Visus. Bedingt ist dies wahrscheinlich durch die Minimierung der Irregularitäten im Interface, die nach einer DMEK erwartet wird [85].

Es ist nicht auszuschließen, dass bei Etablierung der Femtosekundenlaser zukünftig die Lamellen in den Hornhautbanken geschnitten werden und der Einsatz in den Kliniken als sogenannte „precut“-Präparate erfolgt. Aufgrund der damit entfallenden Anschaffungskosten für ein Mikrokeratom und durch die Vermeidung von Komplikationen bei der Anfertigung der Lamellen ist eine Entwicklung auch aus ökonomischen Gründen wahrscheinlich. Hinzu kommt, dass das Risiko im OP-Saal durch Anwendungsfehler mit dem Mikrokeratom ein lamelläres Präparat zu verlieren, entfällt. Dies ist besonders von Bedeutung, wenn die Operation dann deshalb abgebrochen werden muss und der Empfänger bereits in Vollnarkose liegt. Beispielsweise wurden in Mainz im Jahr 2010 von 278 Hornhauttransplantaten 51 Spenderlamellen als „precut-tissues“ für eine DSAEK verwendet (Jahresbericht 2010 der Hornhautbank Rheinland-Pfalz in Mainz). Beim Vergleich von bereits in Hornhautbanken vorgeschnittenen „precut-tissues“ mit Hornhautlamellen, die im OP angefertigt wurden, konnten in einer prospektiven, randomisierten Studie ähnliche Resultate hinsichtlich der Endothelzellzahl, der Sehschärfe und der Transplantatablösung beobachtet werden [95].

Andererseits wird durch die Verbreitung der DMEK (vgl. Seite 10) die Notwendigkeit, diese lamellären Transplantate zu schneiden, seltener. Die DMEK stellt jedoch im Vergleich zur DSAEK

ein technisch sehr anspruchsvolles Verfahren bezüglich der Präparation beim Spender als auch bei der Entfaltung des Transplantates in der Vorderkammer dar [96]. Bei einem neuen, noch in Erprobung befindlichen Hybridverfahren zwischen DSAEK und DMEK wird die zentrale Descemetmembran durch einen stromalen Ring im Randbereich verstärkt, wobei mit Hilfe des stabilisierenden Ringes die Entfaltung des lamellären Transplantates einfacher erfolgen soll [97]. Dieses Verfahren wird aber derzeit noch nicht routinemäßig eingesetzt. Es kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der Verbesserung sowie durch die Entwicklung hornhautchirurgischer Verfahren für die Patienten völlig neue Wege und Erfolgsaussichten bei der Behandlung mit Hornhauttransplantaten eröffnet werden.

4.6 Zusammenfassung

Aufgrund der ständigen Verbesserung und Weiterentwicklung der Operationstechniken hat in den letzten 10 Jahren der Anteil der lamellären Hornhauttransplantationen zugenommen und es kam zur Renaissance dieser Verfahren. Der Übergang wurde durch die DSAEK forciert. Dabei ist eines der bevorzugten Prozeduren die DSAEK mit dem Mikrokeratom. Trotz der zügigen visuellen Rehabilitation nach einer DSAEK, resultieren bei den posterioren lamellären Verfahren oft schlechtere visuelle Ergebnisse, für die das Interface verantwortlich gemacht wird. Dieser Kontakt von Empfänger und Spendergewebe wird durch die Schnittfläche gestaltet. Deshalb wurde in dieser Studie untersucht, inwieweit sich die Schnittflächen nach Einsatz verschiedener Schneidgeräte unterscheiden. Für diese Untersuchungen wurden als Probenmaterial frisch enukleierte Schweineaugen sowie humane Korneoskleralscheibchen aus der Hornhautbank verwendet. Die Gewinnung der posterioren Lamellen erfolgte mittels drei verschiedener Mikrokeratome (Gebauer SL, Moria CBm, Amadeus II ZiemerS) und zwei Femtosekundenlaser (VisuMaxTM Femtosekundenlaser und TissueSurgeon Lasermikrotom). Mit den Mikrokeratomen wurden jeweils acht humane und acht porcine Hornhäute geschnitten. In der Schnittserie der Femtosekundenlaser wurden mit dem VisuMaxTM Femtosekundenlaser ausschließlich acht humane Hornhäute und mit dem TissueSurgeon Lasermikrotom acht porcine Hornhäute geschnitten. Insgesamt wurden 64 Schnitte durchgeführt. Im Anschluss erfolgte anhand von REM-Bildern die Bewertung der Schnittflächenbeschaffenheit mittels eines semiquantitativen Score-Systems. In der Serie der porcinen Hornhäute erzielte der TissueSurgeon Femtosekundenlaser 55 %, das Gebauer SL Mikrokeratom 50 %, das Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom 41 % und das Moria CBm Mikrokeratom 36 % von möglichen 88 Punkten. In der Serie der humanen Hornhäute wurden für das Moria CBm Mikrokeratom 42 %, das Amadeus II ZiemerS Mikrokeratom 39 %, das Gebauer SL Mikrokeratom und den VisuMaxTM Femtosekundenlaser 36 % von erreichbaren 88 Punkten vergeben. Bei der Schnittflächenbewertung der Mikrokeratome wurden in der Serie der porcinen Hornhäute homogenere Resultate als bei den humanen Hornhäuten beobachtet, ausgenommen das Moria CBm Mikrokeratom. Hier waren bei den humanen Hornhäuten die Schnittflächen homogener. Auch bei den Femtosekundenlasern ist in der Serie der humanen Hornhäute im Vergleich zu den

Schweinehornhäuten eine unebenere und rauere Oberfläche sichtbar. Mit dem VisuMaxTM FSL wurden vergleichbare Ergebnisse wie bei den Mikrokeratomen erreicht. Der TissueSurgeon FSL erzielt unter den getesteten Schneidgeräten mit 55 % von möglichen 88 Punkten den höchsten Score-Wert. Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte bei den Femtosekundenlasern signifikante Unterschiede zwischen den humanen und porcinen Schnitten, wobei zu bemerken ist, dass es sich um verschiedene Laser handelt. Bei den Mikrokeratomen aber fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den humanen und porcinen Schnitten. In der Schnittserie der porcinen Hornhäute konnten signifikante Unterschiede zwischen den vier untersuchten Schneidgeräten nachgewiesen werden, wobei dies in der Serie humaner Präparate nicht der Fall war. Es ist festzustellen, dass sich unter Berücksichtigung der Ergebnisse Schweinehornhäute prinzipiell als Versuchsmodell zur Einschätzung von Mikrokeratomschnitten eignen.

Der Oszillations-Vorschub-Quotient hatte in der durchgeführten Studie in Bezug auf die Schnittflächenqualität keinen Einfluss. In verschiedenen Arbeiten wurde beschrieben, dass beim Einsatz des Femtosekundenlasers die Homogenität der Schnittfläche durch die Impulsenergie beeinflusst wird, was auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie korreliert. Der Regularitätsindex ist umso geringer, je höher die Impulsenergie ist [81]. Dieser Aspekt hat eine zunehmende Bedeutung für die Bereitstellung vorgeschchnittener Hornhautlamellen aus der Hornhautbank, da in Zukunft voraussichtlich der Bedarf an „precut“- Präparaten steigen wird.

4.7 Literaturverzeichnis

- 1 DelMonte DW, Kim T: Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 2011; 37:588-598.
- 2 Barraquer, J Rutllan, J: Bemerkungen zur Embryologie, Anatomie, Histologie und Pathophysiologie der Kornea; *Mikrochirurgie der Kornea ein Atlas und Textbuch*. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag, 1991, S. 19-51.
- 3 Funk RHW, Apple DJ und Naumann GOH: Embryologie, Anatomie und Untersuchungstechnik; *Pathologie des Auges*. Berlin Heidelberg New York, Springer, 1997, S. 1-90.
- 4 Stephen D Klyce and Roger W Beuerman: Part I Basic Science: 1. Structure and Function of the Cornea; Herbert E.Kaufmann BABMBM (ed): *The Cornena Second Edition*. USA, Butterworth-Heinemann, 1997, pp. 3-50.
- 5 Wollensak J: Morphologie, biochemische und physiologische Parameter der Hornhaut; Theo Seiler (ed): *Refraktive Chirurgie der Hornhaut*. Stuttgart, New York, Enke im Georg Thieme Verlag, 2000, S. 13-25.
- 6 Birnbaum F, Reinhard T: Corneatransplantation; Manfred G.Krukenmeyer, Arno E. Lison (eds): *Transplantationsmedizin Ein Leitfaden für den Praktiker*. Berlin, New York, de Gruyter, 2006, S. 273-287.
- 7 Zirm E: Eine erfolgreiche totale Keratoplastik.; *Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol*, 1906;580-593.
- 8 Ono SJ: The birth of transplantation immunology: the Billingham-Medawar experiments at Birmingham University and University College London. 1951. *J Exp Biol* 2004; 207:4013-4014.
- 9 Streilein JW, Masli S, Takeuchi M, Kezuka T: The eye's view of antigen presentation. *Hum Immunol* 2002; 63:435-443.
- 10 Brown DC, Ellison ED, Kaufman HE: Quantitative systemic corticosteroid effect on xenograft reaction. *Am J Ophthalmol* 1969; 67:896-899.

- 11 Alberth B: Verhinderung einer Vaskularisation der transplantierten Hornhaut mittels peroral verabreichten Prednisolons. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1961; 163:562-574.
- 12 Duncker GIW, Wilhelm FW: Kurzer Rückblick auf die Konservierung von Gewebe für die okuläre Transplantation: Wilhelm F.W. DGIWBT (ed): Augenbanken. Berlin, New York, de Gruyter, 2002, S. 3-8.
- 13 Seitz B GG: Lamellierende oder perforierende Keratoplastik? Das alterierende Dilemma. Ophthalmologe 2005;1126-1127.
- 14 Böhnke M, Draeger J, Winter R: Möglichkeiten und biologische Eigenschaften verschiedenartig angelegter Methoden zur Hornhautkonservierung. Klin Monbl Augenheilkd 1984; 185:91-94.
- 15 Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO: Changing indications for penetrating keratoplasty: histopathology of 1,250 corneal buttons. Cornea 1998; 17:468-470.
- 16 Hippel A: Eine neue Methode der Hornhauttransplantation.; Graefes Arch Ophthalmol, 1888;108.
- 17 Münchow W: Der definitive Weg: Ophthalmochirurgie; Karl Velhagen (ed): Der Augenarzt Geschichte der Augenheilkunde. Leipzig, VEB GEORG Thieme, 1983, S. 553-555.
- 18 Maier P, Reinhard T: Keratoplastik: Lamellieren oder perforieren? Teil 2: Lamelläre Keratoplastik. Ophthalmologe 2009; 106:649-662.
- 19 Cursiefen C, Heindl L M: Perspektiven der tiefen anterioren lamellären Keratoplastik. Ophthalmologe 2011; 108:833-839.
- 20 Melles GR, Remeijer L, Geerards AJ, Beekhuis WH: A quick surgical technique for deep, anterior lamellar keratoplasty using visco-dissection. Cornea 2000; 19:427-432.
- 21 Anwar M, Teichmann KD: Big-bubble technique to bare Descemet's membrane in anterior lamellar keratoplasty. J Cataract Refract Surg 2002; 28:398-403.
- 22 Krumeich JH, Knulle A, Krumeich BM: Tiefe lamelläre Keratoplastik vs. perforierende Keratoplastik: Klinische und statistische Analyse. Klin Monbl Augenheilkd 2008; 225:637-648.

- 23 Melles GR, Lander F, Rietveld FJ, Remeijer L, Beekhuis WH, Binder PS: A new surgical technique for deep stromal, anterior lamellar keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:327-333.
- 24 Wylegala E, Tarnawska D, Dobrowolski D: Deep lamellar keratoplasty for various corneal lesions. *Eur J Ophthalmol* 2004; 14:467-472.
- 25 Pakrou N, Fung S, Selva D, Chehade M, Leibovitch I: Deep lamellar keratoplasty in the treatment of keratoconus. *Ophthalmologica* 2006; 220:164-169.
- 26 Michieletto P, Balestrazzi A, Balestrazzi A, Mazzotta C, Occhipinti I, Rossi T: Factors predicting unsuccessful big bubble deep lamellar anterior keratoplasty. *Ophthalmologica* 2006; 220:379-382.
- 27 Sugita J, Kondo J: Deep lamellar keratoplasty with complete removal of pathological stroma for vision improvement. *Br J Ophthalmol* 1997; 81:184-188.
- 28 Melles GR, Eggink FA, Lander F, Pels E, Rietveld FJ, Beekhuis WH, Binder PS: A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 1998; 17:618-626.
- 29 Melles GR, Lander F, van Dooren BT, Pels E, Beekhuis WH: Preliminary clinical results of posterior lamellar keratoplasty through a sclerocorneal pocket incision. *Ophthalmology* 2000; 107:1850-1856.
- 30 Archila EA: Deep lamellar keratoplasty dissection of host tissue with intrastromal air injection. *Cornea* 1984; 3:217-218.
- 31 Price FW, Jr: Air lamellar keratoplasty. *Refract Corneal Surg* 1989; 5:240-243.
- 32 Terry MA, Ousley PJ: Replacing the endothelium without corneal surface incisions or sutures: the first United States clinical series using the deep lamellar endothelial keratoplasty procedure. *Ophthalmology* 2003; 110:755-764.
- 33 Terry MA, Ousley PJ: Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results. *Cornea* 2001; 20:239-243.
- 34 Terry MA, Wall JM, Hoar KL, Ousley PJ: A prospective study of endothelial cell loss during the 2 years after deep lamellar endothelial keratoplasty. *Ophthalmology* 2007; 114:631-639.
- 35 Melles GR, Wijdh RH, Nieuwendaal CP: A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea* 2004; 23:286-288.

- 36 Melles GR, Kamminga N: Techniken der posterioren lamellären Keratoplastik über einen skleralen Zugang. *Ophthalmologie* 2003; 100:689-695.
- 37 Price FW, Jr, Price MO: Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 50 eyes: a refractive neutral corneal transplant. *J Refract Surg* 2005; 21:339-345.
- 38 Gorovoy MS: Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2006; 25:886-889.
- 39 Cheng YY, Pels E, Nuijts RM: Femtosecond-laser-assisted Descemet's stripping endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33:152-155.
- 40 Nieuwendaal CP, Lapid-Gortzak R, van der Meulen IJ, Melles GJ: Posterior lamellar keratoplasty using descemetorhexis and organ-cultured donor corneal tissue (Melles technique). *Cornea* 2006; 25:933-936.
- 41 Cursiefen C, Kruse FE: Posteriore lamelläre Keratoplastik (DSAEK). *Ophthalmologie* 2008; 105:183-190.
- 42 Cursiefen C, Kruse FE: Posteriore lamelläre Keratoplastik (DSAEK). *Ophthalmologie* 2009; 106:939-952.
- 43 Covert DJ, Koenig SB: New triple procedure: Descemet's stripping and automated endothelial keratoplasty combined with phacoemulsification and intraocular lens implantation. *Ophthalmology* 2007; 114:1272-1277.
- 44 Price FW, Jr., Price MO: Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 200 eyes: Early challenges and techniques to enhance donor adherence. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32:411-418.
- 45 Terry MA, Ousley PJ: Deep lamellar endothelial keratoplasty: early complications and their management. *Cornea* 2006; 25:37-43.
- 46 Fang JP, Hamill MB: Descemet's stripping endothelial keratoplasty under topical anesthesia. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33:187-188.
- 47 Koenig SB, Covert DJ: Early results of small-incision Descemet's stripping and automated endothelial keratoplasty. *Ophthalmology* 2007; 114:221-226.
- 48 Ousley PJ, Terry MA: Stability of vision, topography, and endothelial cell density from 1 year to 2 years after deep lamellar endothelial keratoplasty surgery. *Ophthalmology* 2005; 112:50-57.

- 49 Bahar I, Kaiserman I, Sansanayudh W, Levinger E, Rootman DS: Busin Guide vs Forceps for the Insertion of the Donor Lenticule in Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2009; 147:220-226.
- 50 Busin M, Bhatt PR, Scorcia V: A modified technique for descemet membrane stripping automated endothelial keratoplasty to minimize endothelial cell loss. *Arch Ophthalmol* 2008; 126:1133-1137.
- 51 Melles GR, Ong TS, Ververs B, van der Wees J: Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea* 2006; 25:987-990.
- 52 Melles GR: Posterior lamellar keratoplasty: DLEK to DSEK to DMEK. *Cornea* 2006; 25:879-881.
- 53 Cursiefen C, Kruse FE: DMEK: posteriore lamelläre Keratoplastiktechnik. *Ophthalmologie* 2010; 107:370-376.
- 54 Ham L, Balachandran C, Verschoor CA, van der Wees J, Melles GR: Visual rehabilitation rate after isolated descemet membrane transplantation: descemet membrane endothelial keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 2009; 127:252-255.
- 55 Dapena I, Ham L, Melles GR: Endothelial keratoplasty: DSEK/DSEK or DMEK- the thinner the better? *Curr Opin Ophthalmol* 2009; 20:299-307.
- 56 Price MO, Price FW, Jr.: Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: comparative outcomes with microkeratome-dissected and manually dissected donor tissue. *Ophthalmology* 2006; 113:1936-1942.
- 57 Birnbaum F, Maier P, Reinhard T: Therapeutischer Einsatz des Femtosekundenlasers in der Hornhautchirurgie. *Ophthalmologie* 2010; 107:186-188.
- 58 Busin M., Arffa Robert C.: Equipment for Automated Lamellar Therapeutic Keratoplasty; Atlas of Microkeratome Assisted Lamellar Keratoplasty. USA, Slack Incorporated, 2006, pp. 14-20.
- 59) Blum M, Sekundo W: Femtosekunden-Lentikel-Extraktion (FLEx). *Ophthalmologie* 2010; 107:967-970.
- 60 Sekundo W, Kunert K, Russmann C, Gille A, Bissmann W, Stobrawa G, Sticker M, Bischoff M, Blum M: First efficacy and safety study of femtosecond lenticule extraction for the correction of myopia: six-month results. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34:1513-1520.

- 61 Blum M, Kunert K, Schroder M, Sekundo W: Femtosecond lenticule extraction for the correction of myopia: preliminary 6-month results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010; 248:1019-1027.
- 62 Hammer T, Hanschke R, Worner I, Wilhelm FW: Evaluation of four microkeratome models: quality and reproducibility of cut edge and cut surface as determined by scanning electron microscopy. *J Refract Surg* 2005; 21:454-462.
- 63 Wilhelm FW, Giessmann T, Hanschke R, Duncker GI, Wilhelm LH: Cut edges and surface characteristics produced by different microkeratomes. *J Refract Surg* 2000; 16:690-700.
- 64 Wilhelm F, Giessmann T, Hanschke R, Duncker G: Schnittkanten nach lamellarer Keratotomie mit verschiedenen Mikrokeratomen. *Klin Monbl Augenheilkd* 1998; 213:293-300.
- 65 Clauß G., Partzsch L., Partzsch L.: *Statistische Testtheorien; Statistik für Soziologen, Pädagogen und Mediziner - Grundlagen*. Frankfurt am Main, Harri Deutsch, 2004, S. 177-278.
- 66 Holzer MP, Rabsilber TM, Auffarth GU: Femtosecond laser-assisted corneal flap cuts: morphology, accuracy, and histopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:2828-2831.
- 67 Keuch RJ, Bleckmann H: Comparison of 3 microkeratomes used for keratomileusis in situ in a swine model. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25:24-31.
- 68 Wilmes C, Draeger J, Kohlhaas M: Lentikeldickenpräzision in Abhängigkeit von Gewebeausgangsdicken. *Ophthalmologie* 1992; 89:147-150.
- 69 Hara H, Cooper DK: Xenotransplantation-the future of corneal transplantation? *Cornea* 2011; 30:371-378.
- 70 Sanchez I, Martin R, Ussa F, Fernandez-Bueno I: The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011; 249:475-482.
- 71 Jay L, Brocas A, Singh K, Kieffer JC, Brunette I, Ozaki T: Determination of porcine corneal layers with high spatial resolution by simultaneous second and third harmonic generation microscopy. *Opt Express* 2008; 16:16284-16293.
- 72 Bartholomew LR, Pang DX, Sam DA, Cavender JC: Ultrasound biomicroscopy of globes from young adult pigs. *Am J Vet Res* 1997; 58:942-948.

- 73 Ahearne M, Yang Y, Then KY, Liu KK: An indentation technique to characterize the mechanical and viscoelastic properties of human and porcine corneas. *Ann Biomed Eng* 2007; 35:1608-1616.
- 74 Elsheikh A, Alhasso D, Rama P: Biomechanical properties of human and porcine corneas. *Exp Eye Res* 2008; 86:783-790.
- 75 Heichel J, Blum M, Duncker GI, Sietmann R, Kunert KS: Surface quality of porcine corneal lenticules after Femtosecond Lenticule Extraction. *Ophthalmic Res* 2011; 46:107-112.
- 76 Wilhelm F, Lindner H, Gießmann T: Mikrokeratome in Deutschland - ein aktueller Überblick. *Ophthalmo-Chirurgie* 1996; 8:71-80.
- 77 Hamill MB, Kohnen T: Scanning electron microscopic evaluation of the surface characteristics of 4 microkeratome systems in human corneas. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28:328-336.
- 78 Tehrani M, Schafer S, Dick HB: Evaluation of cut quality using the Amadeus microkeratome with different settings. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30:2415-2419.
- 79 Stonecipher KG, Parmley VC, Rowsey JJ, Fowler WC, Nguyen H, Terry M: Refractive corneal surgery with the Draeger rotary microkeratome in human cadaver eyes. *J Refract Corneal Surg* 1994; 10:49-55.
- 80 Draeger J, Bohnke M, Grabner G, Slezak H, Lang K: Neue Wege der refraktiven Hornhautchirurgie - Experimentelle Untersuchungen. *Klin Monbl Augenheilkd* 1988; 192:458-461.
- 81 Kunert KS, Blum M, Duncker GIW, Sietmann R, Heichel J: Surface quality of human corneal lenticules after femtosecond laser surgery for myopia comparing different laser parameters. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011; 249:1417-1424.
- 82 Lubatschowski H: Overview of commercially available femtosecond lasers in refractive surgery. *J Refract Surg* 2008; 24:102-107.
- 83 Moshirfar M, Gardiner JP, Schliesser JA, Espandar L, Feiz V, Mifflin MD, Chang JC: Laser in situ keratomileusis flap complications using mechanical microkeratome versus femtosecond laser: retrospective comparison. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36:1925-1933.

- 84 Sanka RK, Loft ES, Randleman JB: Effect of varying microkeratome parameters on laser in situ keratomileusis interface surfaces. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36:493-496.
- 85 Heinzlmann S, Maier P, Reinhard T: Perspektiven der hinteren lamellären Keratoplastik. Auf der Suche nach der perfekten Lamelle. *Ophthalmologe* 2011; 108:825-832.
- 86 Birnbaum F, Maier P, Reinhard T: Perspektiven der Femtosekundenlaser-assistierten Keratoplastik. *Ophthalmologe* 2011; 108:807-816.
- 87 Cheng YY, Schouten JS, Tahzib NG, Wijdh RJ, Pels E, van CH, Eggink CA, Rijneveld WJ, Nuijts RM: Efficacy and safety of femtosecond laser-assisted corneal endothelial keratoplasty: a randomized multicenter clinical trial. *Transplantation* 2009; 88:1294-1302.
- 88 Maier PC, Birnbaum F, Reinhard T: Therapeutischer Einsatz des Femtosekundenlasers in der Hornhautchirurgie. *Klin Monbl Augenheilkd* 2010; 227:453-459.
- 89 Monterosso C, Fasolo A, Caretti L, Monterosso G, Buratto L, Bohm E: Sixty-kilohertz femtosecond laser-assisted endothelial keratoplasty: clinical results and stromal bed quality evaluation. *Cornea* 2011; 30:189-193.
- 90 Mehta JS, Shilbayeh R, Por YM, Cajucom-Uy H, Beuerman RW, Tan DT: Femtosecond laser creation of donor cornea buttons for Descemet-stripping endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34:1970-1975.
- 91 Jones YJ, Goins KM, Sutphin JE, Mullins R, Skeie JM: Comparison of the femtosecond laser (IntraLase) versus manual microkeratome (Moria ALTK) in dissection of the donor in endothelial keratoplasty: initial study in eye bank eyes. *Cornea* 2008; 27:88-93.
- 92 Sarayba MA, Ignacio TS, Tran DB, Binder PS: A 60 kHz IntraLase femtosecond laser creates a smoother LASIK stromal bed surface compared to a Zyoptix XP mechanical microkeratome in human donor eyes. *J Refract Surg* 2007; 23:331-337.
- 93 Sarayba MA, Ignacio TS, Binder PS, Tran DB: Comparative study of stromal bed quality by using mechanical, IntraLase femtosecond laser 15- and 30-kHz microkeratomes. *Cornea* 2007; 26:446-451.

- 94 Heichel J, Hammer T, Sietmann R, Duncker GI, Wilhelm F: Vergleich des Femtec Femtosekundenlasers und des Zyoptix XP Mikrokeratoms. Rasterelektronenmikroskopische Gegenüberstellung lamellärer Keratotomien. *Ophthalmologie* 2010; 107:333-340.
- 95 Price MO, Baig KM, Brubaker JW, Price FW, Jr.: Randomized, prospective comparison of precut vs surgeon-dissected grafts for descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2008; 146:36-41.
- 96 Price MO, Giebel AW, Fairchild KM, Price FW, Jr.: Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective multicenter study of visual and refractive outcomes and endothelial survival. *Ophthalmology* 2009; 116:2361-2368.
- 97 McCauley MB, Price FW, Jr., Price MO: Descemet membrane automated endothelial keratoplasty: hybrid technique combining DSAEK stability with DMEK visual results. *J Cataract Refract Surg* 2009; 35:1659-1664.

Anlage 1: Zusammensetzung der Fixierlösung für die REM-Untersuchungen

	Puffer-Mix für Fixativ	
1	1 M HEPES pH 7,4 (EK: 0,1 M)	100 µl
2	1 M CaCl ₂ (EK: 1 mM)	1 µl
3	1 M MgCl ₂ (EK: 1 mM)	1 µl
4	2,5 M NaN ₃ (EK: 25 mM)	10 µl
5	Aqua bidestillata	768 µl
6	25 % Glutaraldehyd frisch dazu (EK: 3 %)	120 µl (2 h vor Verwendung zugefügt)
Gesamt		1 ml

Anlage 2: Verwendete Chemikalien für die Vorbereitung der Präparate zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung

Waschpuffer (WP)	0,2 M Cacodylat-Puffer, pH 7,4 2 mM CaCl ₂ 50 mM NaN ₃	200 µl 1 M Puffer 2 µl 1 M CaCl ₂ 20 µl 2,5 M NaN ₃ 778 µl A. bidest. 1000 µl WM
Waschmedium	0,2 M Hepes, pH 7,4 2 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 50 mM NaN ₃	200 µl 1 M Hepes 2 µl 1 M CaCl ₂ 2 µl 1 M MgCl ₂ 20 µl 2,5 M NaN ₃ 776 µl A. bidest.
2 % Tannin		500 µl 4 % Tannin 1000 µl WP
2 % Uranylacetat		500 µl 4 % Uranylacetat 500 µl 1,8 % NaCl
2 % Osmiumtetroxid		500 µl 4 % OsO ₄ 1000 µl WP

Anlage 3: Score-Bewertungen der Serie des Gebauer SL Mikrokeratoms humaner Schnittflächen

Humane Präparate						
Schnitt	A	B	C	D	P	
1	1	1	1	1	U	4
2	1	1	1	1	N	4
3	1	1	1	1	K	4
4	1	1	1	1	T	4
5	1	1	1	1	Z	4
6	1	1	1	1	A	4
7	1	1	1	1	H	4
8	1	1	1	1	L	4
-	1	1	1	1		
SD					32	88
Regularitätsindex	3		BCD		36	%
Gesamtscore	4					

Anlage 4: Score-Bewertungen der Serie des Gebauer SL Mikrokeratoms porciner Schnittflächen

Porcine Präparate						
Schnitt	A	B	C	D	P	
1	1	1	1	1	U	4
2	1	2	2	2	N	7
3	1	2	2	2	K	7
4	1	1	1	1	T	4
5	1	1	1	1	Z	4
6	2	3	3	2	A	10
7	1	1	1	1	H	4
8	1	1	1	1	L	4
-	1,125	1,5	1,5	1,375		
SD					44	88
Regularitätsindex	4,375		BCD		50	%
Gesamtscore	5,5					

Anlage 5: Score-Bewertungen der Serie des Moria CBm Mikrokeratoms humaner Schnittflächen

Humane Präparate						
Schnitt	A	B	C	D	P	
1	1	1	1	1	U	4
2	1	1	1	1	N	4
3	1	1	1	1	K	4
4	1	3	3	2	T	9
5	1	1	1	1	Z	4
6	1	1	1	1	A	4
7	1	1	1	1	H	4
8	1	1	1	1	L	4
-	1	1,25	1,25	1,125		
SD					37	88
Regularitätsindex	3,625		BCD		42	%
Gesamtscore	4,625					

Anlage 6: Score-Bewertungen des Serie des Moria CBm Mikrokeratoms porciner Schnittflächen

Porcine Präparate						
Schnitt	A	B	C	D	P	
1	1	1	1	1	U	4
2	1	1	1	1	N	4
3	1	1	1	1	K	4
4	1	1	1	1	T	4
5	1	1	1	1	Z	4
6	1	1	1	1	A	4
7	1	1	1	1	H	4
8	1	1	1	1	L	4
-	1	1	1	1		
SD					32	88
Regularitätsindex	3		BCD		36	%
Gesamtscore	4					

Anlage 7: Score-Bewertungen der Serie des Amadeus II ZiemerS Mikrokeratoms humaner Schnittflächen

Humane Präparate						
Schnitt	A	B	C	D	P	
1	1	1	1	1	U	4
2	1	1	1	1	N	4
3	1	1	1	1	K	4
4	1	1	1	1	T	4
5	1	1	1	1	Z	4
6	1	1	1	1	A	4
7	1	2	2	1	H	6
8	1	1	1	1	L	4
-	1	1,125	1,125	1		
SD					34	88
Regularitätsindex	3,25		BCD		39	%
Gesamtscore	4,25					

Anlage 8: Score-Bewertungen der Serie des Amadeus II ZiemerS Mikrokeratoms porciner Schnittflächen

Porcine Präparate						
Schnitt	A	B	C	D	P	
1	1	1	1	1	U	4
2	1	2	2	1	N	6
3	1	1	1	1	K	4
4	1	2	2	1	T	6
5	1	1	1	1	Z	4
6	1	1	1	1	A	4
7	1	1	1	1	H	4
8	1	1	1	1	L	4
-	1,00	1,25	1,250	1,00		
SD					36	88
Regularitätsindex	3,500		BCD		41	%
Gesamtscore	4,50					

Anlage 9: Score-Bewertungen der Serie des VisuMax™ Femtosekundenlasers humaner Schnittflächen

Humane Präparate						
Schnitt	A	B	C	D	P	
1	1	1	1	1	U	4
2	1	1	1	1	N	4
3	1	1	1	1	K	4
4	1	1	1	1	T	4
5	1	1	1	1	Z	4
6	1	1	1	1	A	4
7	1	1	1	1	H	4
8	1	1	1	1	L	4
-	1	1	1	1		
SD					32	88
Regularitätsindex	3		BCD		36	%
Gesamtscore	4					

Anlage 10: Score-Bewertungen der Serie des TissueSurgeon Femtosekundenlaser porciner Schnittflächen

Porcine Präparate						
Schnitt	A	B	C	D	P	
1	1	2	1	1	U	5
2	2	2	2	1	N	7
3	1	2	2	1	K	6
4	1	2	2	1	T	6
5	2	2	2	1	Z	7
6	1	2	2	1	A	6
7	1	2	1	1	H	5
8	1	2	2	1	L	6
-	1,25	2,00	1,75	1,00		
SD					48	88
Regularitätsindex	4,75		BCD		55	%
Gesamtscore	6,00					

Anlage 11: Tests auf Normalverteilung^{a,c,d,e,f,g} und Saphiro-Wilk–Test (p-Werte gelb markiert)

Technik			Shapiro-Wilk		
			Statistik	Df	Signifikanz
Punktzahl auf Schnittebene	FSL	Porcin	,849	8	,093
	Gebauer	Porcin	,724	8	,004
	Moria	Human	,418	8	,000
	Ziemer	Human	,418	8	,000
		Porcin	,566	8	,000
Regularitätskriterium auf Schnittebene	FSL	Porcin	,566	8	,000
	Gebauer	Porcin	,726	8	,004
	Moria	Human	,418	8	,000
	Ziemer	Human	,418	8	,000
		Porcin	,566	8	,000

- a. Punktzahl auf Schnittebene ist bei Technik = FSL, Spezies = human konstant und wurde weggelassen.
- b. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors
- c. Punktzahl auf Schnittebene ist bei Technik = Gebauer, Spezies = human konstant und wurde weggelassen.
- d. Punktzahl auf Schnittebene ist bei Technik = Moria, Spezies = porcin konstant und wurde weggelassen.
- e. Regularitätskriterium auf Schnittebene ist bei Technik = FSL, Spezies = human konstant und wurde weggelassen.
- f. Regularitätskriterium auf Schnittebene ist bei Technik = Gebauer, Spezies = human konstant und wurde weggelassen.
- g. Regularitätskriterium auf Schnittebene ist bei Technik = Moria, Spezies = porcin konstant und wurde weggelassen.

Für alle nicht konstanten Parameter wurde ein Test auf Normalverteilung durchgeführt. Es konnten signifikante Abweichungen von einer Normalverteilung nachgewiesen werden (**Saphiro-Wilk-Test**, p-Werte gelb markiert), so dass nicht-parametrisch getestet wurde.

12 Anlage: Ergebnisse des statistischen Vergleichs mittels Mann-Whitney-Test

Ränge					
Technik			N	Mittlerer Rang	Rangsumme
FSL	Punktzahl	Human	8	4,50	36,00
		Porcin	8	12,50	100,00
		Gesamt	16		
	Regularitätskriterium	Human	8	4,50	36,00
		Porcin	8	12,50	100,00
		Gesamt	16		
Gebauer	Punktzahl	Human	8	7,00	56,00
		Porcin	8	10,00	80,00
		Gesamt	16		
	Regularitätskriterium	Human	8	7,00	56,00
		Porcin	8	10,00	80,00
		Gesamt	16		
Moria	Punktzahl	Human	8	9,00	72,00
		Porcin	8	8,00	64,00
		Gesamt	16		
	Regularitätskriterium	Human	8	9,00	72,00
		Porcin	8	8,00	64,00
		Gesamt	16		
Ziemer	Punktzahl	Human	8	8,00	64,00
		Porcin	8	9,00	72,00
		Gesamt	16		
	Regularitätskriterium	Human	8	8,00	64,00
		Porcin	8	9,00	72,00
		Gesamt	16		

Anlage 13: Ergebnisse des U-Tests (Mann-Whitney) und Statistik für Test^a zum Vergleich der eingesetzten Schneidgeräte bei humanen und porcinen Hornhäuten

Statistik für Test ^a			
Technik		Punktzahl je Schnitt	Regularitätskriterium je Schnitt
FSL	Mann-Whitney-U	0,000	0,000
	Wilcoxon-W	36,000	36,000
	Z	-3,626	-3,626
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000
	Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,000^b	,000^b
Gebauer	Mann-Whitney-U	20,000	20,000
	Wilcoxon-W	56,000	56,000
	Z	-1,852	-1,852
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,064	,064
	Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,234^b	,234^b
Moria	Mann-Whitney-U	28,000	28,000
	Wilcoxon-W	64,000	64,000
	Z	-1,000	-1,000
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,317	,317
	Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,721^b	,721^b
Ziemer	Mann-Whitney-U	28,000	28,000
	Wilcoxon-W	64,000	64,000
	Z	-,620	-,620
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,535	,535
	Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,721^b	,721^b

a. Gruppenvariable: Spezies

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

In der Serie der Femtosekundenlaser wurden signifikante Unterschiede bezüglich Punktzahl und Regularitätskriterium zwischen humanen und porcinen Hornhäuten festgestellt (**Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,001$** , gelb markiert), bei den Mikrokeratomen waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (**Mann-Whitney-U-Test, p-Werte grau markiert**).

Anlage 14: Kruskal-Wallis-Tests

Ränge				
Spezies			N	Mittlerer Rang
Human	Punktzahl	FSL	8	15,50
		Gebauer	8	15,50
		Moria	8	17,56
		Ziemer	8	17,44
		Gesamt	32	
	Regularitätskriterium	FSL	8	15,50
		Gebauer	8	15,50
		Moria	8	17,56
		Ziemer	8	17,44
		Gesamt	32	
Porcin	Punktzahl	FSL	8	24,75
		Gebauer	8	17,63
		Moria	8	10,00
		Ziemer	8	13,63
		Gesamt	32	
	Regularitätskriterium	FSL	8	24,25
		Gebauer	8	17,88
		Moria	8	10,00
		Ziemer	8	13,88
		Gesamt	32	

Anlage 15: Ergebnisse der Statistik für Test^{a,b}

Spezies		Punktzahl je Schnitt	Regularitätskriterium je Schnitt
Human	Chi-Quadrat	2,069	2,069
	Df	3	3
	Asymptotische Signifikanz	,558	,558
Porcin	Chi-Quadrat	13,921	13,027
	Df	3	3
	Asymptotische Signifikanz	,003	,005

a. Kruskal-Wallis-Test

b. Gruppenvariable: Technik

Bei den humanen Hornhäuten konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Punktzahl oder Regularitätskriterium zwischen den Schneidgeräten nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test $p = 0,558$, grau markiert), jedoch waren bei den porcinen Hornhäute signifikante Unterschiede nachweisbar (**Kruskal-Wallis-Test** $p = 0,03$ für Punktzahl und $p = 0,05$ für Regularitätskriterium, gelb markiert).

Anlage 16-27: Posthoc Paarvergleiche für porcine Hornhäute mit dem Mann-Whitney-U-Test

Anlage 16: Mann-Whitney-U-Test: Vergleich mit dem Femtosekundenlaser und dem Gebauer SL Mikrokeratom in der Serie der porcinen Präparate

Ränge				
		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Technik	Punktzahl	8	9,75	78,00
	je Schnitt	8	7,25	58,00
	Gesamt	16		
Regularitätskriterium	FSL	8	9,50	76,00
	je Schnitt	8	7,50	60,00
	Gesamt	16		

Anlage 17: Ergebnisse der Statistik für Test^a

	Punktzahl je Schnitt	Regularitätskriterium je Schnitt
Mann-Whitney-U	22,000	24,000
Wilcoxon-W	58,000	60,000
Z	-1,083	-,878
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,279	,380
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,328 ^b	,442 ^b

a. Gruppenvariable: Technik

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

Im Vergleich mit dem Femtosekundenlaser und dem Gebauer SL Mikrokeratom wurden bei den porcinen Präparaten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Punktzahl und Regularitätskriterium festgestellt (**Mann-Whitney-U-Test**, p-Werte grau markiert).

Anlage 18: Mann-Whitney-U-Test: Vergleich mit dem Femtosekundenlaser und dem Moria CBm Mikrokeratom in der Serie der porcinen Präparate

Ränge				
Technik		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Punktzahl	FSL	8	12,50	100,00
	Moria	8	4,50	36,00
	Gesamt	16		
Regularitätskriterium	FSL	8	12,50	100,00
	Moria	8	4,50	36,00
	Gesamt	16		

Anlage 19: Ergebnisse der Statistik für Test^a

	Punktzahl je Schnitt	Regularitätskriterium je Schnitt	
Mann-Whitney-U	0,000	0,000	
Wilcoxon-W	36,000	36,000	
Z	-3,626	-3,626	
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,000 ^b	,000 ^b	p<0,001

a. Gruppenvariable: Technik

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

Im Vergleich mit dem Femtosekundenlaser und dem Moria CBm Mikrokeratom wurden bei den porcinen Präparaten signifikante Unterschiede hinsichtlich Punktzahl und Regularitätskriterium festgestellt (**Mann-Whitney-U-Test**, $p < 0,001$ gelb markiert).

Anlage 20: Mann-Whitney-U-Test: Vergleich mit dem Femtosekundenlaser und dem Amadues II ZiemerS Mikrokeratom in der Serie der porcinen Präparate

Ränge				
Technik		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Punktzahl	FSL	8	11,50	92,00
	Ziemer	8	5,50	44,00
	Gesamt	16		
Regularitätskriterium	FSL	8	11,25	90,00
	Ziemer	8	5,75	46,00
	Gesamt	16		

Anlage 21: Ergebnisse der Statistik für Test^a

	Punktzahl je Schnitt	Regularitätskriterium je Schnitt
Mann-Whitney-U	8,000	10,000
Wilcoxon-W	44,000	46,000
Z	-2,666	-2,546
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,008	,011
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,010 ^b	,021 ^b

a. Gruppenvariable: Technik

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

Im Vergleich mit dem Femtosekundenlaser und dem Amadues II ZiemerS Mikrokeratom wurden bei den porcinen Hornhäuten signifikante Unterschiede hinsichtlich Punktzahl und Regularitätskriterium festgestellt (**Mann-Whitney-U-Test**, $p = 0,010$ für Punktzahl und $p = 0,021$ für Regularitätskriterium, gelb markiert).

Anlage 22: Mann-Whitney-U-Test: Vergleich mit dem Gebauer SL und dem Moria CBm Mikrokeratom in der Serie der porcinen Präparate

Ränge				
Technik		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Punktzahl	Gebauer	8	10,00	80,00
	Moria	8	7,00	56,00
	Gesamt	16		
Regularitätskriterium	Gebauer	8	10,00	80,00
	Moria	8	7,00	56,00
	Gesamt	16		

Anlage 23: Ergebnisse der Statistik für Test^a

	Punktzahl je Schnitt	Regularitätskriterium je Schnitt
Mann-Whitney-U	20,000	20,000
Wilcoxon-W	56,000	56,000
Z	-1,852	-1,852
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,064	,064
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,234 ^b	,234 ^b

a. Gruppenvariable: Technik

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

Im Vergleich mit dem Gebauer SL und dem Moria CBm Mikrokeratom wurden bei den porcinen Präparaten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Punktzahl und Regularitätskriterium festgestellt (**Mann-Whitney-U-Test**, p-Werte grau markiert).

Anlage 24: Mann-Whitney-U-Test: Vergleich mit dem Gebauer SL und dem Amadues II ZiemerS Mikrokeratom in der Serie der porcinen Präparate

Ränge				
Technik		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Punktzahl	Gebauer	8	9,38	75,00
	Ziemer	8	7,63	61,00
	Gesamt	16		
Regularitätskriterium	Gebauer	8	9,38	75,00
	Ziemer	8	7,63	61,00
	Gesamt	16		

Anlage 25: Ergebnisse der Statistik für Test^a

	Punktzahl je Schnitt	Regularitätskriterium je Schnitt
Mann-Whitney-U	25,000	27,000
Wilcoxon-W	61,000	63,000
Z	-,896	-,896
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,370	,370
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,505 ^b	,505 ^b

a. Gruppenvariable: Technik

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

Im Vergleich mit dem Gebauer SL und dem Amadues II ZiemerS Mikrokeratom wurden bei den porcinen Präparaten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Punktzahl und Regularitätskriterium festgestellt (**Mann-Whitney-U-Test**, p-Werte grau markiert).

Anlage 26: Mann-Whitney-U-Test: Vergleich mit dem Moria CBm und dem Amadues II ZiemerS Mikrokeratom in der Serie der porcinen Präparate

Ränge				
Technik		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Punktzahl	Moria	8	7,50	60,00
	Ziemer	8	9,50	76,00
	Gesamt	16		
Regularitätskriterium	Moria	8	7,50	60,00
	Ziemer	8	9,50	76,00
	Gesamt	16		

Anlage 27: Ergebnisse der Statistik für Test^a

	Punktzahl je Schnitt	Regularitätskriterium je Schnitt
Mann-Whitney-U	24,000	24,000
Wilcoxon-W	60,000	60,000
Z	-1,464	-1,464
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,143	,143
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,442 ^b	,442 ^b

a. Gruppenvariable: Technik

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

Im Vergleich mit dem Moria CBm und dem Amadues II ZiemerS Mikrokeratom wurden bei den porcinen Präparaten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Punktzahl und Regularitätskriterium festgestellt (**Mann-Whitney-U-Test**, p-Werte grau markiert).

Anlage 28: Zusammenfassung der p-Werte aus den Anlagen 16-27

Porcine Hornhäute	p-Werte	
Vergleich der Schneidgeräte	Punktzahl je Schnitt	Regularitätskriterium je Schnitt
FSL-Gebauer SLMK	0,328	0,422
FSL-Moria CBm MK	0,000 ^b	0,000 ^b
FSL-Amadeus II MK	0,010	0,021
Gebauer SL-Moria CBm MK	0,234	0,234
Gebauer SL-Amadeus II MK	0,505	0,505
Moria CBm-Amadeus II MK	0,442	0,442

Thesen

1. Zur Behandlung endothelialer Hornhauterkrankungen hat sich die DSAEK als lamelläre Transplantationstechnik etabliert.
2. Die Gewinnung der posterioren Hornhautlamelle stellt eine technisch anspruchsvolle Methode dar, die eine hohe Präzision erfordert und das postoperative Ergebnis beeinflusst.
3. Neben dem mechanischen Mikrokeratom bei der Präparation der Hornhautlamelle findet der Femtosekundenlaser auch zunehmend Anwendung bei der Hornhauttransplantation. Er bietet die Möglichkeit, in allen Schichten der Hornhaut exakte, auf wenige Mikrometer Dicke, genau definierte und damit reproduzierbare Schnitte anzufertigen.
4. An humanen und porcinen Hornhautlamellen, die mit drei Mikrokeratomen (GebauerSL, Moria CBm, Amadeus II ZiemerS) und zwei Femtosekundenlasern (VisuMaxTM der Carl Zeiss Meditec AG, TissueSurgeon Lasermikrotom) gewonnen wurden, wurden die Ergebnisse anhand eines etablierten Score-Systems gegenübergestellt.
5. Anhand rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen erfolgte die Beurteilung der Schnittflächen aller Präparate. Insgesamt wurden bei den Mikrokeratomen jeweils acht humane und acht porcine Schnitte angefertigt. Mit dem VisuMaxTM Femtosekundenlaser wurden ausschließlich acht humane und mit dem TissueSurgeon Lasermikrotom acht porcine Hornhäute geschnitten.
6. Innerhalb der Schnittserie liegt ein hoher Grad an Reproduzierbarkeit vor, der aufgrund der zunehmenden Automatisierung der Mikrokeratome und dadurch fehlendem Einfluss des Anwenders erklärbar ist. Es ist bekannt, dass die Qualität der Schnitte durch die Eigenschaften der eingesetzten Mikrokeratome sowie durch den Oszillations-Vorschub-Quotienten bestimmt wird. Der Oszillations-Vorschub-Quotient hat in dieser Serie auf die Schnittflächenqualität keinen wesentlichen Einfluss.
7. Trotz der zügigen visuellen Rehabilitation nach einer DSAEK resultieren bei den hinteren lamellären Verfahren oft schlechtere visuelle Ergebnisse, für die das Interface verantwortlich gemacht wird. Dieser Kontakt zwischen Empfänger und Spendergewebe wird durch die Schnittfläche gestaltet. Mit der Gegenüberstellung der getesteten drei Mikrokeratome und zwei Femtosekundenlaser an humanen und porcinen Hornhäuten konnten Einflüsse auf die Schnittflächenbefunde nachgewiesen werden.
8. Bei den Femtosekundenlasern wird die Homogenität der Schnittfläche durch die Impulsenergie beeinflusst.

- 9.** Die Schnittbefunde porciner Hornhäute weisen in der Serie der Mikrokeratome im Vergleich zu den humanen Hornhäuten homogenere Resultate auf, ausgenommen das Moria CBm Mikrokeratom. Hier waren bei den humanen Hornhäuten die Schnittflächen homogener. Es fanden sich jedoch bei den Mikrokeratomen keine signifikanten Unterschiede zwischen den humanen und porcinen Präparaten.
- 10.** Bei den Femtosekundenlasern ist in der Serie der humanen Hornhäute verglichen mit den Schweinehornhäuten eine unebene und raue Oberfläche sichtbar. Es waren hier signifikante Unterschiede zwischen den humanen und porcinen Präparaten nachweisbar.
- 11.** In der Schnittserie porciner Hornhäute zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den 4 untersuchten Schneidgeräten, was in der Serie humaner Präparate nicht der Fall war.
- 12.** Der TissueSurgeon FSL erzielt unter den getesteten Schneidgeräten mit 55 % von möglichen 88 Punkten den höchsten Score-Wert. Mit dem VisuMaxTM FSL wurden vergleichbare Ergebnisse wie bei den Mikrokeratomen erreicht.
- 13.** Sowohl Mikrokeratome als auch Femtosekundenlaser eignen sich zur Gewinnung lamellärer Hornhäute.
- 14.** Bei allen Einschränkungen für die Übertragbarkeit der Resultate ist das Schweineauge prinzipiell als Versuchsmodell geeignet.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erstellt habe, sowie wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Hamburg, den

Sümeyra Ayik

Erklärung für frühere Promotionsverfahren

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich erstmalig einem Promotionsverfahren stelle und keine früheren Versuche weder im Inland noch im Ausland stattgefunden haben.

Hamburg, den

Sümeyra Ayik

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Ayik
Vorname: Sümeyra
Geburtsdatum/ -ort: 17.02.1981, Hamburg
Anschrift: Krausestraße Nr.79
22049 Hamburg

Familienstand: ledig

Schulbildung

07.1987-06.1991 Grundschule Lämmersieth in Hamburg
08.1991-06.2000 Gymnasium Matthias-Claudius in Hamburg
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

10.2000-07.2007 Studium der Humanmedizin an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
Abschluss: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Staatsexamen 10/2007

Hauptberufliche Tätigkeiten

06.2008-12.2012 Assistenzärztin in der Augenklinik der HELIOS Kliniken Schwerin
Seit 01.2013 Assistenzärztin in der Augenklinik und Augenarztpraxis/Farmsen

Hamburg, den

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. F. Wilhelm, insbesondere für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit zu promovieren. Er hat mich vom ersten Moment an moralisch unterstützt und durch fachliche Anregungen sowie wertvollen Hinweisen mir bei der Erstellung dieser Arbeit jederzeit zur Seite gestanden.

Außerdem möchte ich allen danken, die an dem Zustandekommen dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei unseren Kollegen der Hornhautbank, Frau Bruhns, Frau Tank und Frau DM L. Tietz.

Frau Dr. R. Schlüter danke ich für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Präparate und Beratung beim Schreiben des Methodik-Abschnittes.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. med. K. Kunert und Herrn Prof. Dr. med. M. Blum (HELIOS Kliniken Erfurt) sowie Herrn Dr. med. L. Blomberg und Herrn Dr. F. Will (Medizinische Hochschule Hannover) für die Bereitstellung der mit den Femtosekundenlasern geschnittenen Präparate.

Frau Dr. M. Vossen der medistat GmbH danke ich für die wertvolle und kompetente Hilfe bei der statistischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. med. C. Werschnik und Herrn Dr. med. T. Wermund für die Korrekturlesung und Ermunterung bei der Erstellung dieser Arbeit.

