

Aus der Universitätsaugenklinik Rostock

der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. Rudolf Guthoff

Morphologie und Morphometrie der Keratozytensubpopulationen bei bullöser Keratopathie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Universität Rostock

Vorgelegt 2014 von
Dr. med. dent. Gabriel Dorn
geboren in Männedorf, Schweiz

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Rudolf Guthoff, Universität Rostock, Universitäts-Augenklinik, Doberaner Straße 140, 18055 Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Karl-Heinz Emmerich, Klinikum Darmstadt, Heidelberger Landstraße 379, 64297 Darmstadt-Eberstadt
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Frank Tost, Universitätsmedizin Greifswald, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Fleischmannstraße 8, 17475 Greifswald

Datum der Einreichung: 01.04.2014

Datum der Verteidigung: 09.12.2015

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
1.1.	Problemdarstellung der Untersuchung	3
1.2.	Anatomische und physiologische Aspekte der Kornea	4
1.3.	Entwicklung von Untersuchungsmethoden der Keratozytenmorphologie	7
1.4.	Bullöse Keratopathie	9
2.	Ziel der Arbeit	12
3.	Verwendete humane Hornhäute	13
4.	Material und Methode	14
4.1.	Präparation der Kornea	14
4.2.	Methode der vitalen Doppel-Fluoreszenz-Färbung	15
4.3.	Fluoreszenz-Mikroskopie	17
4.4.	Konfokale Laserscanning Fluoreszenz Mikroskopie	19
4.5.	Dreidimensionale Rekonstruktion des Keratozytennetzwerkes	22
4.6.	Analyse des Keratozytennetzwerkes	23
5.	Ergebnisse	25
5.1.	Humane Hornhautrepanate	25
5.2.	Fluoreszenzmikroskopie als Nachweis der Hornhaut-Vitalität	25
5.3.	Zellmorphologie bei bullöser Keratopathie in der Fluoreszenzmikroskopie	26
5.3.1.	Anteriores Stroma	26
5.3.2.	Zentrales Stroma	27
5.3.3.	Posteriores Stroma	28
5.4.	Zellmorphologie bei konfokaler Lasercanning-Fluoreszenz-Mikroskopie	28
5.4.1.	Anteriores Stroma	29
5.4.2.	Zentrales Stroma	30
5.4.3.	Posteriores Stroma	30
5.5.	Morphometrischer Vergleich der bullösen Keratopathie nach Fuchs'scher Endotheldystrophie versus postoperativer Entstehung	32
5.5.1.	Zelllänge	33

5.5.2.	Zellbreite	34
5.5.3.	Zellformfaktor	34
5.5.4.	Zellvolumen	35
5.5.5.	Volumendichte	36
5.5.6.	Zelloberfläche	37
5.5.7.	Zelldichte	38
6.	Diskussion	40
6.1.	Vorteile der vitalen Doppelfärbung und der konfokalen Mikroskopie/ Diskussion der Methodik	40
6.2.	Vergleich der Keratozytensubpopulationen in den unterschiedlichen Stromaschichten	42
6.3.	Morphologischer Vergleich zwischen bullöser Keratopathie und gesunder Hornhaut	43
6.4.	Morphometrischer Vergleich zur gesunden Kornea	45
6.4.1.	Zelloberfläche	50
6.4.2.	Zellformfaktor	51
6.5.	Modelle zur Erklärung der Stromopathologie	52
6.6.	Mögliche Einflüsse verschiedener Faktoren auf die experimentelle Untersuchung	55
6.7.	Überlegungen zur klinischen Anwendung der konfokalen Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskopie in der Ophthalmologie	56
7.	Zusammenfassung	58
8.	Literaturverzeichnis	59
9.	Abbildungsverzeichnis	64
10.	Tabellenverzeichnis	66
11.	Anhang	67
11.1.	Notation	67
11.2.	Abkürzungen	67
11.3.	Statistische Berechnungen	68
12.	Danksagungen	73
13.	Lebenslauf	74
14.	Selbständigkeitserklärung	75

1. Einleitung

1.1. Problemdarstellung der Untersuchung

Die bullöse Keratopathie ist der klinische und morphologische Ausdruck unterschiedlicher Hornhautschädigungen, in deren Folge es zur Bildung von Bullae kommt. Da das Hornhautendothel nach der Geburt praktisch nicht mehr teilungsfähig ist, führt der Zellverlust zur Dauerschädigung der Kornea. Aus der Trübung der Hornhaut resultiert eine Visusminderung bis hin zur Notwendigkeit der Hornhauttransplantation.

Das klinische Erscheinungsbild der bullösen Keratopathie an der Spaltlampe lässt keinen eindeutigen Rückschluss auf die zugrunde liegende korneale Grunderkrankung zu, sondern beschreibt lediglich die pathologischen strukturellen Veränderungen. Beispiele für die unterschiedlichen Ätiologien der Hornhautschädigungen sind zum Beispiel die postoperativ aufgetretene degenerative Endothelschädigung, Fuchs'sche Endotheldystrophie oder eine Cornea guttata anderer Genese.

Derzeit existieren keine umfassenden deskriptiven Publikationen zur humanen Keratozytenmorphologie in vitalem Korneagewebe bei bullöser Keratopathie. Eine *in vivo* Vitalfärbung aller Korneaschichten zur mikroskopischen Darstellung der zellulären und interzellulären Bestandteile ist bisher nicht bekannt. Deshalb fehlen die Möglichkeiten, die bullöse Keratopathie im präklinischen Stadium zu diagnostizieren. Die Konsequenz ist die Diagnose der Erkrankung zu einem Zeitpunkt, an dem der Endothelzellverlust mit folgender ödematöser Verquellung des Stromas fortgeschritten ist. Die ödematöse Stromaveränderung, beziehungsweise die Bildung von Bullae als Konsequenz einer Hornhautdekompensation, führen infolge der Trübung der Kornea zu einer Visusminderung. Aufgrund der Exposition der sensiblen Nervenendigungen nach Ruptur der Epithelbullae kann eine begleitende Schmerzsymptomatik auftreten (Naumann 1996). Eine Therapiemöglichkeit der bullösen Keratopathie mit dem Endothelzellverlust ist zur Zeit nicht bekannt, so dass nach weiterer Progredienz der Hornhautdekompensation nur die penetrierende Hornhauttransplantation als ultima ratio zur Verfügung steht.

Es existieren zahlreiche Publikationen, die das gesunde Keratozytennetzwerk morphologisch beschreiben (Böhnke, Masters 1999, Rao et al. 2000). Bei der bullösen Keratopathie

wurden dagegen von den meisten Forschungsgruppen die Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene untersucht (Ljubimov et al. 1996, Akhtar et al. 2001). Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit, die krankheitsspezifischen Veränderungen der vitalen Keratozytensubpopulationen bei der bullösen Keratopathie in humanen Hornhäuten morphologisch und morphometrisch zu charakterisieren.

1.2. Anatomische und physiologische Aspekte der Kornea

Die Kornea hat eine optische und eine protektive Funktion. Mit ca. 70 % hat sie den höchsten Anteil an der Gesamtbrechkraft des refraktiven Systems. Die Hornhautbrechkraft steht in direkter Beziehung zum Krümmungsradius.

Die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Kornea wird im anterioren Anteil über den Tränenfilm, von posteriorer Seite durch das Kammerwasser und limbal vom Randschlinnengennetz (Gefäßnetz der Aa. ciliares anteriores) gewährleistet (Kaufman et al. 1998).

Die Hornhaut ist normalerweise gefäßfrei. Sie besteht aus reichlich mukoproteider Grundsubstanz (Matrix), die ein Kollagenfasergerüst umhüllt und Wasser binden kann (Møller-Pedersen 2004). Die wichtigsten Proteoglykane der Hornhaut sind die Glykosaminoglykane wie Keratosulfat, Lumican (Kao, Liu 2002, Michelacci 2003), Keratocan und Mimecan sowie das Dermatansulfat Decorin (Michelacci 2003). Gegenüber entzündlichen Prozessen ist diese „Glashaut“ besonders widerstandsfähig.

Voraussetzung für die optische Leistungsfähigkeit der Hornhaut ist ihre Transparenz. Durch ein komplexes System zwischen Hydratation und Dehydratation der Kornea wird die Transparenz und eine konstante Hornhautdicke garantiert (Møller-Pedersen 2004).

Eine stabile Aufrechterhaltung dieser kornealen Parameter ist durch folgende Faktoren gewährleistet beziehungsweise beeinflussbar:

- Ein funktionsfähiges, pumpfähiges Endothel, welches das Wasser aktiv der stromalen Grundsubstanz entzieht (Joyce 2003, Fischbarg 2003).
- Die Verdunstung des präkornealen Tränenfilms.
- Ein physiologischer Augeninnendruck (Fischbarg 2003) (Abbildung 1-1).

Das pathologische Ungleichgewicht dieser Faktoren führt zur kornealen Quellung. Durch das Stromaödem weichen die physiologischerweise regelmäßig angeordneten Kollagenfasern auseinander. Dadurch verändert sich die Lichtbrechung, was zu einer Herabsetzung der kornealen Transparenz mit Minderung der Sehschärfe führt (Bonanno 2003).

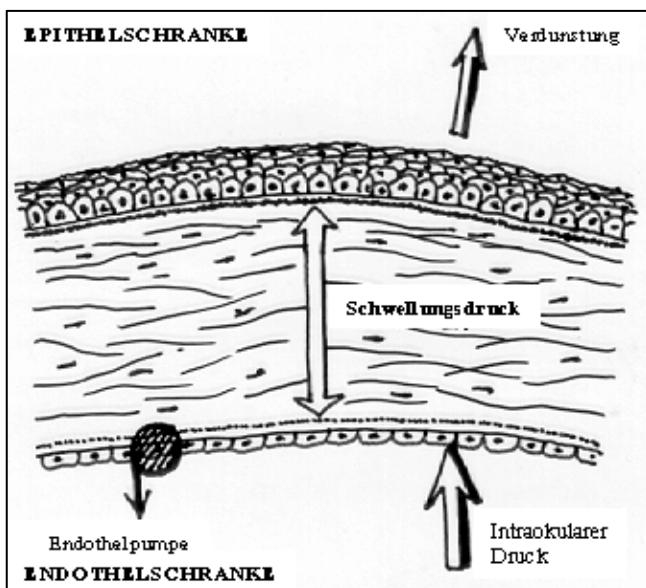


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des physiologischen Gleichgewichtes der Kornea (eigene schematische Darstellung).

Die korneale Grenze zur Vorderkammer bildet das Endothel, das neuroepithelialer Herkunft ist. Diese einlagige Schicht besteht aus regelmäßigen hexagonalen Zellen. Die Verbindungen der Endothelzellen untereinander bilden keine durchgehende Barriere wie im Hornhautepithel. Das Kammerwasser aus der Vorderkammer des Auges kann somit in das Stroma eindringen. Durch eine Erhöhung des intraokularen Druckes verstärkt sich die

Tendenz der stromalen Wasseraufnahme. Die Endothelzellen wirken diesem Mechanismus durch den aktiven Transport von Bikarbonat und Chlorid aus dem extrazellulären Raum des Stromas in das Kammerwasser entgegen. Dem Anionentransport folgen die Kationen, überwiegend Natrium, woraus ein sekundärer Flüssigkeitstransport aus dem Stroma resultiert (Rauz et al. 2003, Bonanno 2003). Für diesen aktiven Ionentransport und die Proteinsynthese sind die Endothelzellen reich an Organellen, besonders an Mitochondrien, an Golgi-Systemen und an endoplasmatischem Retikulum (Riley, Peters 1981). Durch den osmotischen Gradienten wird das Stroma kontinuierlich dehydriert. Idealerweise steht die Verdunstung im Gleichgewicht zur stromalen Wasseraufnahme (Abbildung 1-1).

Bei der Geburt beträgt die Zelldichte beim gesunden Endothel zwischen 2000 und 4000 Zellen pro mm^2 (Sangeetha et al. 2002). Bei dekompensierten Hornhäuten hingegen finden sich bei den Patienten Endothelzellzahlen zwischen 400 und 600 Zellen pro mm^2 (Neubauer 1983). Beim Verlust von Endothelzellen versuchen die Nachbarzellen den Defekt auszufüllen. Sie dehnen sich, um Kontakt mit den benachbarten, noch intakten Zellen aufzunehmen. Dabei entsteht ein unregelmäßiges Muster großer und kleiner Zellen.

Die Descemet-Membran begrenzt das Endothel zum Hornhautstroma. Diese besteht aus feinen Kollagenfibrillen und besitzt einen hohen Gehalt an Mukoproteinen (Spencer 1996).

Das Hornhautstroma nimmt etwa 90 % der gesamten Korneadieke ein (Michelacci 2003). Es enthält verschiedene stark wasserbindende, saure Mukoproteine. Mitunter entsteht dadurch ein hoher Flüssigkeitsgehalt der extrazellulären Matrix. Die in der extrazellulären Matrix befindlichen Keratozyten sind dünn und flach mit langen Fibroblastenausläufern, die mit den Keratozyten der gleichen Zellschicht in Kontakt treten. Durch den strengen Aufbau des Keratozytennetzwerkes sowie der regelmäßigen Anordnung der heterotopischen Kollagenfasern (vor allem Typ I und V Kollagene) erreicht das Stroma einen einheitlichen Brechungsindex (Michelacci 2003). Dieser entspricht fast genau dem der Grundsubstanz selbst. Das korneale Stroma lässt sich in drei Bereiche differenzieren: in einen anterioren, einen zentralen, sowie in einen posterioren Bereich, mit den jeweiligen charakteristischen Keratozytensubpopulationen (Hahnel et al. 2000).

Die Bowman-Membran ist eine azelluläre Schicht von 10 bis 16 μm Dicke (Masters, Böhnke 2001). Diese Membran ist aus filzartig verflochtenen, kollagenen Fasern aufge-

baut, die sehr dünn und locker in der reichlich vorhandenen Grundsubstanz verteilt sind (Wilson, Hong 2000).

Das Korneaepithel ist sehr regelmäßig gebaut und besteht aus nichtverhorndem Plattenepithel. Diese 5 – 6 Zellschichten begrenzen die Hornhaut nach außen und sind aus Basal-, Intermediär- und Superfizialzellen aufgebaut (Kühnel, Mendoza 1987). Zellverbindungen (Tight-Junctions) zwischen den Superfizialzellen bilden eine wichtige Permeabilitätsbarriere und verhindern das Übertreten von Substanzen vom Tränenfilm in die Hornhaut und umgekehrt (Kaufman et al. 1992). Die Regeneration des Epithels geht von den zylindrischen Basalzellen aus.

1.3. Entwicklung von Untersuchungsmethoden der Keratozytenmorphologie

Die Keratozytenmorphologie wurde erstmals 1950 histologisch mit Hilfe der Silberimprägnierung beschrieben (Sverdlick 1954, Scharenberg 1955). Später erweiterte die Elektronenmikroskopie die Möglichkeiten, strukturelle Details sichtbar zu machen (Nishida et al. 1988). Die Untersuchungen von kultivierten Keratozyten in einem dreidimensionalen Kollagengitter zeigen, dass die Keratozyten große, flache Zellen sind, die zahlreiche zytoplasmatische Ausläufer besitzen. Diese treten über Zellverbindungen („gap junctions“) miteinander in Verbindung und bilden ein ausgedehntes Netzwerk (Assouline et al. 1992, Masters 1998).

Diese Untersuchungsmethoden waren immer invasiv und hatten eine Verletzung der Zellbeziehungsweise Gewebestruktur zur Folge. Die Fixierung der Kornea und die konsekutive Betrachtung wurden *ex vivo* durchgeführt. Durch die Weiterentwicklung von nicht invasiven beziehungsweise dynamischen Darstellungsmöglichkeiten wurde eine neue Ära der Untersuchung des lebenden Keratozytennetzwerkes eingeleitet. Die Entwicklung der konfokalen *in vivo* Mikroskopie, wie Tandem Scanning Confocal Microscopy (TSCM) und Scanning Slit Confocal Microscopy (SSCM) und des Hochfrequenz-Ultraschall-Mikroskops machte die Darstellung der zellulären Strukturen der Kornea in drei bezie-

hungsweise vier Dimensionen möglich, also auch in Bezug zur Aufnahmgeschwindigkeit (x,y,z,t) (Cavanagh et al. 2000).

Eine Modifizierung des konfokalen Mikroskops (Mikrophthal) ermöglichte die Dichtemessung der Keratozyten direkt am Patienten (Stave et al. 1998), jedoch keine detaillierte Darstellung des Keratozytennetzwerkes.

Die konfokale Mikroskopie schaffte die Voraussetzung für die Visualisierung von zellulären Strukturen in vitalem Gewebe ohne Fixierung und Artefaktbildung. Diese Methodik wurde daher in zahlreichen Studien für die *in vivo* Untersuchung der Kornea eingesetzt, beispielsweise für die Messung der Hornhautdicke (Li et al. 1997), die dreidimensionale Darstellung des Keratozytennetzwerkes (Møller-Pedersen, Ehlers 1995, Hahnel et al. 2000, Masters, Böhnke 2001, Masters, Thaer 1994) und die Untersuchung des Hornhautepithels (Tomii, Kinoshita 1994). Der Einsatz des konfokalen Mikroskops für *in vivo* Studien der Kornea erlaubt die Aufzeichnung von Sequenzen optischer Schnitte bei kornealen Dystrophien (Somodi et al. 1997a, Hahnel et al. 1997c, Sherif et al. 1999).

Im Gegensatz zur Scanning Slit Confocal Microscopy und der konventionellen Biomikroskopie können mit Hilfe der Tandem Scanning Confocal Microscopy dünne optische Schnitte mit hoher Auflösung generiert werden. Die genannten Untersuchungsmethoden wurden in mehreren Publikationen angewandt. Dabei zeigten sich korrelierende morphologische Veränderungen der Kornea bei der bullösen Keratopathie (Böhnke, Masters 1999, Sherif et al. 1999, Morishige et al. 2012).

Poole et al. gelang es, mit Hilfe eines so genannten LIVE/DEAD[®]-Kits vitale und avitale Keratozyten in lebender Hornhaut zu differenzieren (Poole et al. 1993). Dieser Kit enthält das fluorogene Substrat Calcein AM, welches durch die Esterasen in den vitalen Keratozyten in einen fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt wird. Als zweites Substrat wirkt das Fluorochrom Ethisdium-Homodimer-1, welches sich bei avitalem Zellen an die DNA bindet. Durch die Kombination der konfokalen Mikroskopie mit dieser Doppelfluoreszenzfärbung ist es möglich, das lebende Korneagewebe innerhalb eines definierten Zeitfensters unverstört zu untersuchen. Eine detaillierte Visualisierung der Keratozytensubpopulationen und deren Netzwerk wird dadurch ermöglicht (Hahnel et al. 2000).

Neben den beschriebenen morphologischen Untersuchungen wurden auch verschiedene

morphometrische Studien durchgeführt. Møller-Pedersen et al. zogen erstmals 1994 indirekt Rückschlüsse auf die Keratozytendichte in humaner Kornea aufgrund der Messung der stromalen DNA und Quantifizierung mit Hilfe der Kernfluoreszenz (Møller-Pedersen et al. 1994). Die direkte Quantifizierung der Keratozytendichte in vivo mit Hilfe des konfokalen Mikroskops wurde von verschiedenen Studiengruppen beschrieben (Mustonen et al. 1998, Patel et al. 1999, Schrems-Hoesl et al. 2013). Prydal und Mitarbeiter untersuchten mit dem konfokalen Mikroskop die Dichte, Größe sowie die Verteilung gesunder Keratozyten der humanen Hornhaut. Die größte Zelldichte wurde direkt unter der Bowmanschen Membran nachgewiesen (Prydal et al. 1995). Die Zelldichte ist nach posterior kontinuierlich abnehmend. Schrems-Hoesl und Mitarbeiter (Schrems-Hoesl et al. 2013) konnten mit dieser Untersuchungsmethode bei der Fuchs'schen Endotheldystrophie signifikante Veränderungen der Endothelzelldichte, sowie im posterioren Stromabereich bei der Keratozytendichte, nachweisen.

1.4. Bullöse Keratopathie

Die bullöse Keratopathie ist ein pathologischer Zustand der Kornea (Abbildung 1-2), welcher bei unterschiedlichen Krankheitsbildern in Erscheinung treten kann.

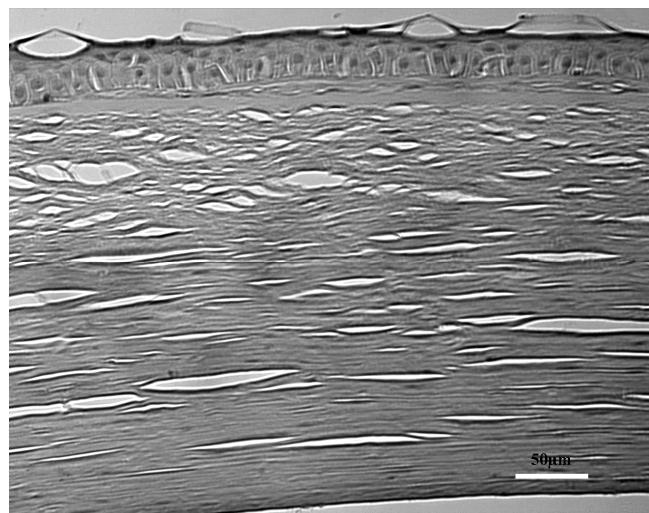


Abbildung 1-2: Pathohistologischer Schnitt einer pathologisch veränderter Kornea bei bullöser Keratopathie (mit freundlicher Genehmigung vom Institut für Pathologie Universität Rostock).

Am häufigsten entsteht eine bullöse Keratopathie als Folge intraokularer Eingriffe im Bereich der Vorderkammer. Das Operationstrauma oder postoperativ entstandene entzündliche Vorgänge verursachen eine Endothelrarefizierung beziehungsweise -schädigung. Bei bestehender funktioneller Endotheldekompensation kann es zur Ausprägung der bullösen Keratopathie führen (Akhtar et al. 2001).

Neben den sekundären Ursachen des Hornhautödems, wie zum Beispiel bei der postoperativen, traumatischen oder entzündlichen Pathogenese, gibt es Manifestationsformen mit primären Endotheldystrophien. Progredienz der Erkrankung führt ebenfalls zu einer funktionellen Endotheldekompensation mit Entwicklung des gleichen klinischen Krankheitsbildes. Die Fuchs'sche Endotheldystrophie gehört hingegen zu den vererbten Endotheldystrophien (Chiou et al. 1999).

Bei Endotheldekompensationen unterschiedlicher Pathogenese kommt es zur ödematösen Aufquellung der Kornea, welche ein- oder doppelseitig auftreten kann (Bonanno 2003). Für dieses Hornhautödem ist ein vermehrter Wassereinstrom verantwortlich. Dies wird durch einen Defekt oder ein Versagen des endothelialen Pumpmechanismus durch Endothelrarefizierung verursacht (Joyce 2003).

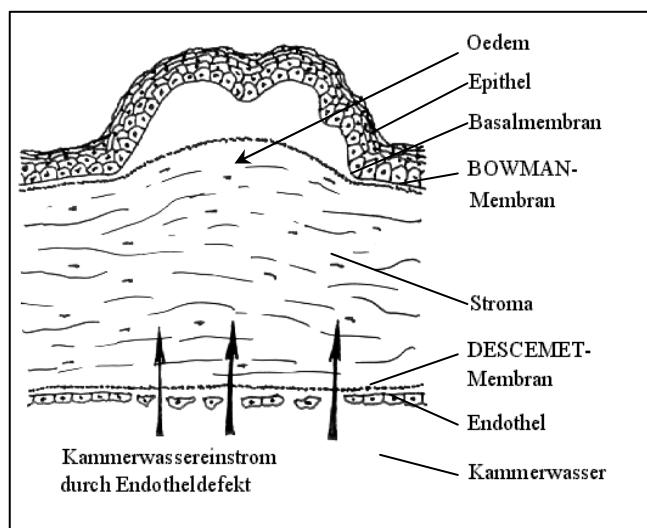


Abbildung 1-3: Darstellung eines Endotheldefektes mit konsekutiver ödematöser Verquellung des kornealen Stromas bei bullöser Keratopathie (eigene Darstellung).

In Abbildung 1-3 wird dieser Defekt schematisch dargestellt. Auch bei der bullösen Keratopathie spielt vor allem das Endothel eine entscheidende Rolle, welches als Kammerwasserschranke gegenüber der Kornea dient. Bricht seine Funktion zusammen, kommt es zum Wassereinstrom und zur Quellung. Im fortgeschrittenen Stadium kann es zur opaken Trübung des Stromas führen. Auch die Ausprägung von epithelialen Bullae ist eine Folge des Stromaödems (Naumann 1996). Diese Flüssigkeitsansammlungen im Epithel bilden zystische Räume, die nach außen rupturieren können, Epitheldefekte verursachen und durch frei liegende sensible Nervenendigungen eine Schmerzsymptomatik hervorrufen.

Entsprechend dem feingeweblichen Aufbau der Hornhaut werden epitheliale, stromale (einschließlich Bowman-Membran) und endotheliale (einschließlich Descemet Membran) Degenerationen unterschieden. Diese Veränderungen können in den verschiedenen Geweben entweder mit einem Zell- bzw. Gewebeschwund und/oder Verlust der normalen Struktur, aber auch mit überschießender Proliferation und Produktion pathologischer Gewebebestandteilen oder mit der Einlagerung von Stoffwechselprodukten verbunden sein.

2. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, vitale humane Hornhäute mit dem Erscheinungsbild der bullösen Keratopathie mit Hilfe des konfokalen Mikroskops morphologisch und morphometrisch zu untersuchen und zu beschreiben.

Dabei sollten Vergleiche der Keratozytensubpopulationen im anterioren, zentralen und posterioren Stroma der Kornea bezüglich Morphologie und morphometrischer Parameter (Zelldichte, Zellgröße, Zellvolumen, Zelloberfläche, Volumendichte, Zellformfaktor) dargestellt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die gewonnenen Daten mit den Ergebnissen der Voruntersuchungen gesunder menschlicher Hornhäute verglichen. Als Datengrundlage für diese Voruntersuchungen dienten die Messergebnisse von Somodi et al. 1995 und Hahnel et al. 1997. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls mittels konfokaler *in vivo* Mikroskopie morphologisch und morphometrisch an gesunden humanen sowie an porcinen Hornhäuten durchgeführt.

Mit diesen Ergebnissen sollen Rückschlüsse auf krankheitsspezifische Veränderungen bei der bullösen Keratopathie gezogen werden können. Dadurch kann die Erkennung der Erkrankung in einem frühen Stadium ermöglicht werden.

3. Verwendete humane Hornhäute

Für die konfokale mikroskopische Untersuchung der humanen Korneae wurden zwölf Hornhauttrepanate mit dem klinisch pathologischen Bild einer bullösen Keratopathie verwendet. Die Trepanate wurden jeweils den Patienten vor einer Hornhauttransplantation entnommen.

Entsprechend der retrospektiv durchgeführten Auswertung der Patientendaten anhand der Krankenakten und der Spaltlampenuntersuchungen lagen bei drei der zwölf untersuchten Hornhäute eine Fuchs'sche Endotheldystrophie als korneale Grunderkrankung vor. 9 Hornhauttrepanate wiesen keine primäre korneale Grunderkrankung auf. In dieser Gruppe war die bullöse Keratopathie als Folge einer Kataraktextraktion postoperativ entstanden.

In der untersuchten Patientengruppe waren keine Kontaktlinsenträger vertreten.

4. Material und Methode

4.1. Präparation der Kornea

Die Hornhäute wurden innerhalb von 24 Stunden nach der Trepanation untersucht. Durch konnte die Hornhautquellung minimiert und die Vitalität des Gewebes durch eine kurze Kulturdauer unverändert untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurden die humanen Korneae unmittelbar nach Trepanation für maximal 24 Stunden bei 37 °C in Earle Minimal Essential Medium (MEM) bei pH 7,2 kultiviert. Die Lösung enthielt 200 mM L-Glutamin, 12,5 ml/l 1 M Hepes, 29,3 ml/l NaH-CO 7,5 %, 2 % FCS (foetales Kälberserum), sowie Penicillin-Streptomycin und Amphotericin B. Am Ende der Korneakultivierung wurden die Trepanate 5 Stunden im gleichen Medium mit Zusatz von 6 % Dextran entquollen.

Aus dem Zentrum der Hornhäute wurden jeweils Gewebeblöcke mit einer Länge von 5 mm und einer Breite von 2 mm präpariert.

Diese Hornhautblöcke wurden mit Hilfe eines Mikrokeratoms nach Draeger (Fa. Stortz) tangential zur Hornhautkrümmung geschnitten. Die einzelnen Lamellen aus dem anterioren, dem zentralen sowie dem posterioren Stroma wurden entsprechend der Vorgehensweise von Somodi und Mitarbeitern gewonnen (Somodi et al. 1997a).

Diese Gewebelamellen wurden zunächst mit der Doppelfluoreszenz-Technik (siehe Kapitel 4.3) angefärbt. Anschließend erfolgte die Beurteilung mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops, um vitale und avitale Zellen zu differenzieren. In einem zweiten Arbeitsschritt wurden Schnittbilder mit einer Schnittdicke von 0.5 – 2 µm mit dem konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

4.2. Methode der vitalen Doppel-Fluoreszenz-Färbung

Die Hornhautschnitte wurden mit dem LIVE/DEAD®-Kit (Molecular Probes Inc., Eugene OR) angefärbt. Diese Färbung basiert auf einer etablierten Fluoreszenzfärbmethode (Poo-
le et al. 1993), die die Darstellung des Zytoplasmas einschließlich der feinen Zellverzweigungen und Zellkontakte ermöglicht. Der Kit enthält zwei Substanzen: Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM) und Ethidium-Homodimer-1. Diese beiden Farbstoffe erlauben die simultane Kennzeichnung und Unterscheidung vitaler und toter Zellen. Mit diesen Farbstoffen werden zwei Parameter der Zellvitalität bestimmt: die intrazelluläre Esteraseaktivität (Calcein-AM) und die Integrität der Zellmembran (Ethidium-Homodimer-1) (Herman 1998).

Das fluorogene Substrat Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM) ist ein elektrisch neutrales Molekül, das sehr gut lipidlöslich ist. Es besitzt nur wenig Eigenfluoreszenz. Das Substrat penetriert schnell durch die intakte Zellmembran lebender Zellen und fluoresziert selbst praktisch nicht. Im Zytosol wird es von intrazellulären unspezifischen Esterasen durch Spaltung der Esterbindung in das hydrophile, fluoreszierende Calcein hydrolysiert. Dadurch kann die Esteraseaktivität bei lebenden Zellen nachgewiesen werden. Das polyanionische Calcein ist nicht zytotoxisch. Es besitzt bei pH 7 sechs negative und zwei positive Ladungen und wird in der Zelle akkumuliert. Dadurch kommt es bei vitalen Zellen zu einer intensiven grünen Fluoreszenz mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 530 nm (Holló et al. 1994). Durch die Hydrophilität des Calceins verteilt sich der Farbstoff gleichmäßig im gesamten Zytosol bis in die feinen Zellfortsätze. Dadurch wird die Morphologie der lebenden Zellen bis ins Detail deutlich sichtbar.

Der zweite Farbstoff, das Ethidium-Homodimer-1 besitzt eine hohe Affinität zur DNA und leuchtet bei spezifischer Anregung rot fluoreszierend. Dieses Fluorochrom kann nur defekte Zellmembranen passieren. Dabei bindet ein Molekül Ethidium-Homodimer an 4 Basenpaare der Doppelstrang-DNA des Zellkerns, wobei die Bindung nicht sequenzspezifisch ist. Bei diesem Vorgang erfährt der Farbstoff eine etwa 40-fache Verstärkung seiner Leuchtintensität. Es wird eine rote Kernfluoreszenz der geschädigten oder toten Zellen mit einem Emissionsmaximum bei ca. 600 nm sichtbar. Die intakten Zellmembranen lebender

Keratozyten sind impermeabel für das Ethidium-Homodimer-1. Deshalb werden die vitalen Keratozyten nicht mit diesem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt.

Sowohl das Calcein als auch das Ethidium-Homodimer können unter Nutzung eines konventionellen Fluorescein-Anregungsfilters (für Calcein: 485 ± 11 nm und für Ethidium-Homodimer-1: 569 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Abbildung 4-1 verdeutlicht die Fluoreszenzcharakteristika (Emission) beider Fluorochrome. Mit einem Fluorescein-Long-Pass-Emissionsfilter ist die simultane Betrachtung der Fluoreszenzemission beider Fluorochrome möglich.

Durch die gleichzeitige Darstellung lebender und toter Keratozyten unter Ausnutzung ihrer spezifischen Fluoreszenz kann die Gewebeschädigung quantifiziert werden.

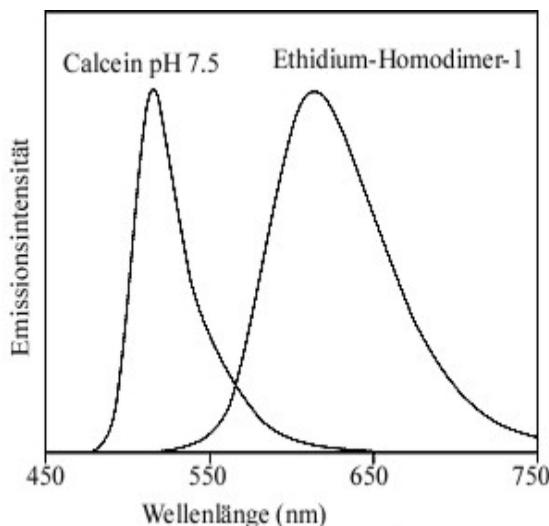


Abbildung 4-1: Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Calcein und DNA-gebundenem Ethidium-Homodimer-1 zeigt die unterschiedlichen Emissionskurven von lebenden und toten Eukaryontenzellen (Molecular Probes Inc., Eugene OR).

Zur Durchführung der vitalen Doppel-Fluoreszenzfärbung wurden die Gewebeproben in einer Zellkulturplatte in 250 μ M D-PBS (Dulbecco´s phosphate-buffered saline) unter Zusatz von 2 μ M Calcein AM und 4 μ M Ethidium-Homodimer für 40 Minuten bei Raumtemperatur, unter sterilen Bedingungen und Lichtausschluss inkubiert.

Um ein Austrocknen der Hornhautproben zu vermeiden, wurden die angefärbten Hornhautlamellen anschließend zwischen zwei Deckgläser gebracht. Dieses Vorgehen ermög-

lichte die korneale Gewebsuntersuchung von beiden Seiten ohne mechanischen Druck auf die Präparate. Während der konfokalen Mikroskopieuntersuchung wurden einzelne Zellen jedes Präparates hinsichtlich eventueller Veränderungen ihrer Morphologie und Vitalität beurteilt. Während eines Untersuchungszeitraumes von 20 Minuten traten keine sichtbaren morphologischen Veränderungen auf.

4.3. Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Fluoreszenz ist das Ergebnis eines Drei-Stufen-Prozesses, bei dem Fluorochrome (polyyaromatische Hydrokarbonsäuren oder Heterozyklen, wie beispielsweise Calcein-AM und Ethidium-Homodimer-1) zur Emission von sichtbarem Licht angeregt werden. Dabei werden Fluoreszenzfarbstoffe durch einen spezifischen Stimulus aus dem energetischen Grundzustand angeregt. Beim Zurückspringen vom energiereichen Zustand in den Grundzustand geben diese ihre Energie in Form von sichtbarem Licht mit geringer Wellenlänge ab.

Die Energiezustandsänderung der Fluorochrome wird in Abbildung 4-2 dargestellt. In der ersten Energiestufe S_0 wird vom Fluorochrom ein Photon mit der Energie $h\nu_{EX}$ absorbiert. Zur Untersuchung der Hornhäute in der vorliegenden Arbeit wurde die Energie durch den Argon-Krypton-Laser des Laserscanning-Fluoreszenzmikroskops zugeführt. Das Fluorochrom erfährt dadurch einen Quantensprung in ein höheres Energie-Niveau (S_1'). Die Schwingungsenergie molekularer Oszillatoren kann nur diskrete Energiezustände annehmen, die als Quantensprünge bezeichnet werden. Die diskreten Energiezustände eines Fluorochroms werden in der vertikalen Energie-Skala in Abbildung 4-2 dargestellt (S_0 , S_1' , S_1).

S_1' beschreibt den angeregten Zustand, welcher eine bestimmte Zeit existiert (für die Fluoreszenz normalerweise $1-10 \times 10^{-9}$ Sekunden). Während dieser Zeit erfährt das Fluorochrom einen Konformationswechsel und ist so Gegenstand einer großen Anzahl von möglichen Interaktionen. Die Energie von S_1' wird teilweise in Form von Licht abgegeben ②, so dass ein entspannter, energieärmerer Zustand (S_1) entsteht.

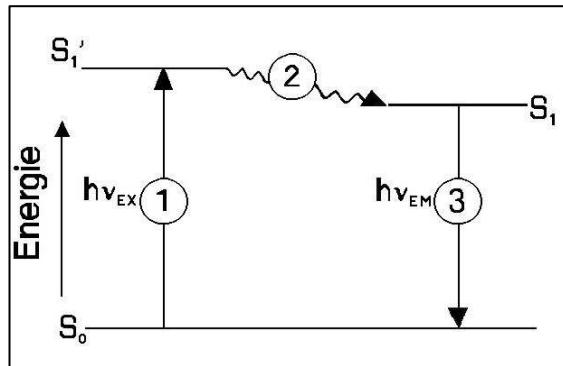


Abbildung 4-2: Energiezustandsänderung der Fluorochrome bei der Fluoreszenz.

Das Photon mit der Energie $h\nu_{EM}$ kehrt in den Grundzustand (S_0) zurück ③. Die Photonenergie ist schwächer und hat eine größere Wellenlänge als das erregte Photon $h\nu_{EX}$. Die Differenz der Energie oder der Wellenlänge ($h\nu_{EX} - h\nu_{EM}$) ist wichtig für die Empfindlichkeit der Fluoreszenztechnik. Sie ermöglicht, emittierte Photonen gegen einen schwach fluoreszierenden Hintergrund, isoliert von erregten Photonen, zu messen.

Die Hornhautlamellen wurden nach entsprechender Doppelfluoreszenz-Färbung mit Calcein-AM und Ethidium-Homodimer-1 unter dem senkrecht zum Objekttisch montierten Fluoreszenzmikroskop H 500 AFL 50 (Fa. Hund, Wetzlar) untersucht. Das Fluoreszenzmikroskop ist mit einer 50 Watt Quecksilber-Höchstdrucklampe zur Anregung der Fluoreszenz, einem konventionellen Fluorescein-Filterset und einem 20x/0,4 NA Fluoreszenzobjektiv ausgerüstet.

Die simultane Darstellung vitaler und avitaler Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte es, avitale Gewebebereiche von der weiteren Untersuchung mit dem konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop auszuschließen (siehe auch Kapitel 4.2. und 4.4.). Bis auf eine Ausnahme waren nur an den Schnittflächen der Hornhautrepanate ge-

schädigte Zellen mittels Ethidium-Homodimer-1-Färbung erkennbar. Eine Ethidium-Homodimer-1-positive Darstellung im zentralen Bereich wurde nicht in die Analyse und Auswertung des Keratozytennetzwerkes einbezogen.

4.4. Konfokale Laserscanning Fluoreszenz Mikroskopie

Die gefärbten Hornhautlamellen wurden (nach dem Vitalitätsnachweis mittels Fluoreszenz-Mikroskopie) mit dem schnellen konfokalen Laserscanning-Fluoreszenz-Mikroskop Diaphot 300 Odyssey XL (Fa. Nikon), das mit einem Argon-Krypton-Laser (Fa. Noran) ausgerüstet war, untersucht (Abbildung 4-3).



Abbildung 4-3: Konfokales Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop Diaphot 300 Odyssey XL (Nikon) im IZT (Institut für Zelltechnologie e.V. Rostock-Warnemünde).

Der Strahlengang im konfokalen Laserscanning-Fluoreszenz-Mikroskop wird in Abbildung 4-4 dargestellt: Das Laserlicht fällt durch eine konfokale Blende S1 auf die Objektivlinse L1 und wird dadurch auf eine Stromaebene des Hornhautpräparates P1 fokussiert. Mit Hilfe der Lochblende in der Fokusebene wird die Streustrahlung im Präparat minimiert und somit eine optisch schärfere Abbildung in der gewünschten Gewebeschicht erzielt. Nur die Strahlen aus der fokussierten Ebene treten durch die Blende S2 des konfokalen Detektors hindurch und werden von einem „Photomultiplier“ erfasst. Die Fluoreszenzemissionsstrahlen aus Regionen ober- oder unterhalb der fokussierten Ebene haben unterschiedliche primäre Bildbrennpunkte und werden von der Blende S2 abgedeckt. So wird das resultierende konfokale Bild durch diese Streustrahlung nicht verunschärft (Masters, Böhnke 2001).

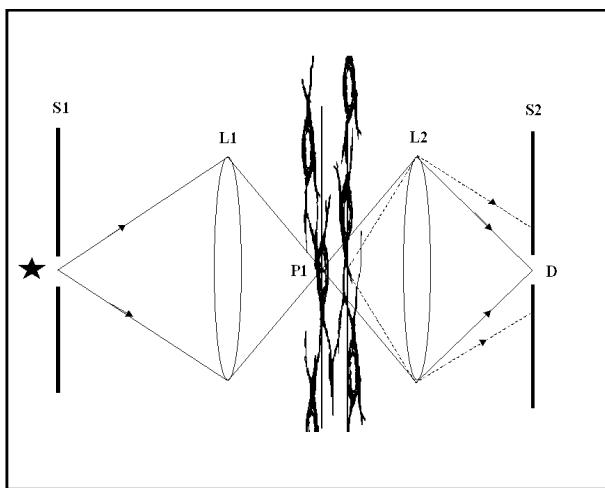


Abbildung 4-4: Schematische Darstellung des Strahlenganges des konfokalen Mikroskops.

S1 und S2: konfokale Blenden. L1 und L2: Linsen, P1: Stromabereich, der von S1 beleuchtet und von L1 fokussiert wird, P1 wird von der Linse L2 abgebildet an S2 und vom Detektor D registriert (nach Masters und Böhnke 2001).

Für die Übersichtsdarstellung des Keratozytennetzwerkes wurde ein 20x/0,45 NA Planapochromat-Objektiv von Nikon benutzt. Die Scan-Tiefe betrug bis zu 150 µm, wobei in der z-Achse (anteroposteriore Scan-Richtung) unterschiedliche Auflösungen gewählt wurden. Die optischen Schnitte wurden in Intervallen von 0,5 µm bis 2 µm aufgenommen.

Markante Details wurden mit dem 60x/1,2 NA Wasserimmersionsobjektiv von Nikon untersucht. Damit wurde auch in der z-Achse eine hohe Auflösung gewährleistet. Hier betragen die Intervalle der optische Schnitte 0,5 μm bis 1,0 μm .

Die optischen Schnitte wurden für die qualitativen Vergleiche mit dem konfokalen Laser-scanning-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und „real time“ Datensätze für die dreidimensionale Rekonstruktion des Keratozytennetzwerkes erstellt. Dadurch wurde die Be- trachtung der Zellen in allen drei Achsen (x, y, z) ermöglicht (Abbildung 4-5).

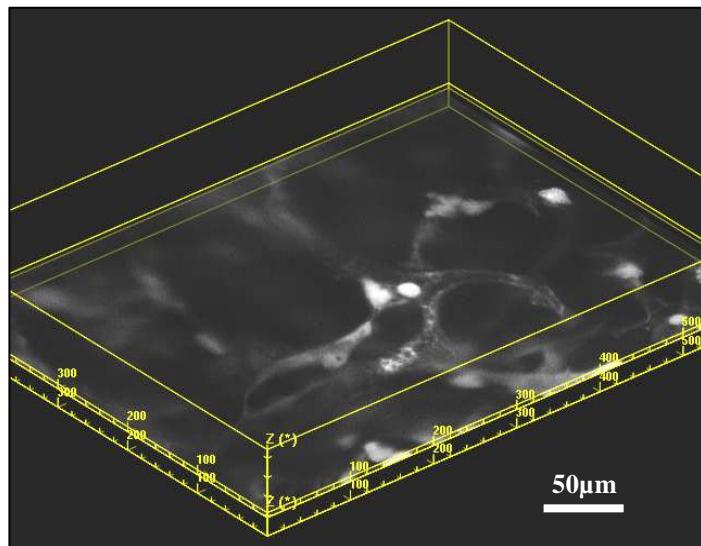


Abbildung 4-5: Dreidimensionale Darstellung eines ausgewählten Hornhautbereiches mit Hilfe der Software Voxel View[®]

Das konfokale Laserscanning-Mikroskop und die Datenverarbeitung wurden mit der InterVision[®]-Software von Noran gesteuert, die die anschließende Datenberechnung und Rekonstruktion der Schnittbilder ermöglichte. Durch die Echtzeitmittelung aus ursprünglich 8 auf 4 Einzelbilder wurde die Qualität der optischen Schnitte durch die „Rauschunterdrückung“ zusätzlich verbessert.

4.5. Dreidimensionale Rekonstruktion des Keratozytennetzwerkes

Die zweidimensionalen Abbildungen einzelner Stromabbereiche der untersuchten Hornhäute wurden mittels der InterVision®-Software von Noran in dreidimensionale Darstellungen weiterverarbeitet. Um die Darstellungsqualität der 3D-Rekonstruktion zu verbessern, wurden die registrierten optischen Schnitte zunächst mit einem 2D-Modul digital bearbeitet. Danach wurde für die Volumenwiedergabe und räumliche Orientierung der Keratozyten der gesamte Datensatz mit einem 3D-Software-Modul rekonstruiert. Anhand der definierten Schnitttiefe und der Anzahl der gescannten Zellebenen (bei bekannter Grundfläche) konnte das jeweilige Gesamtvolumen der untersuchten Kornea berechnet werden. Um die Dokumentation der 3D-rekonstruierten Datensätze visuell besser zu veranschaulichen, wurde die Rot/Grün-Stereodarstellung gewählt. Dazu wurde der Datensatz in der y-Achse mit Hilfe der Tilted-View-Technik um einen Winkel $\varphi = +/- 5^\circ$ gedreht, um den Augenabstand vom linken zum rechten Auge zu simulieren (siehe Abbildung 4-6). Die beiden unterschiedlichen Bilder wurden Rot/Grün-farbkodiert und übereinander gelagert. Bei Be trachtung dieser Stereodarstellungen mit einer Rot/Grün-Brille wird von jedem Auge nur das entsprechende Farbbild wahrgenommen, wodurch ein dreidimensionaler Eindruck entsteht.

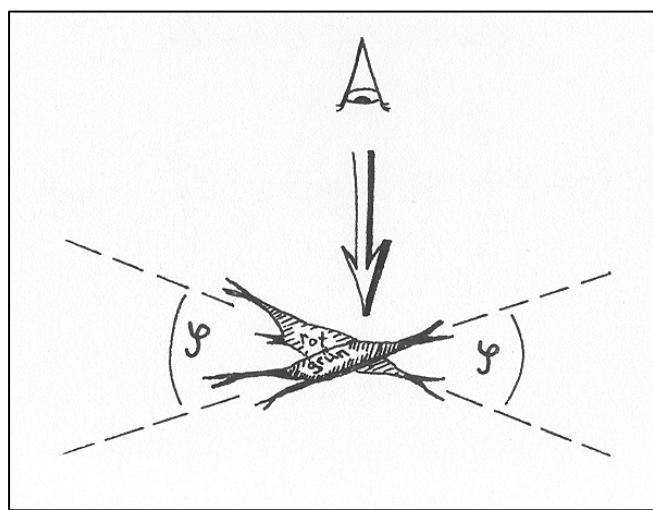


Abbildung 4-6: Graphische Darstellung der Tilted-View-Technik zur dreidimensionalen Rekonstruktion des Keratozytennetzwerkes (eigene Darstellung).

4.6. Analyse des Keratozytennetzwerkes

Von den gewonnenen Datensätzen wurden mit den Computerprogrammen Voxel-View® und Intervision® (Noran Instruments, Middleton, WI) aus den konfokalen Schnitten der einzelnen Hornhautbereichen ein dreidimensionales Keratozytennetzwerk rekonstruiert. Anhand der morphologischen und morphometrischen Analyse konnten die Veränderungen von Keratozytensubpopulationen bei bullöser Keratopathie mit den Daten von gesunden Hornhautrepanaten verglichen werden.

Die Keratozytenparameter (Zelldichte, Zellgröße, Zellvolumen, Zelloberfläche, Volumendichte, Zellformfaktor) wurden mit dem Programm Voxel-Math® (Noran Instruments) mit Hilfe des Computers Indigo 2 high impact (Silicon Graphics Inc.) berechnet. Anhand der morphometrischen Parameter konnten Veränderungen in der anterioren, zentralen und posterioren Keratozytensubpopulation dargestellt und verglichen werden.

In der quantitativen Analyse wurden folgende Messparameter berücksichtigt: Zellvolumen (= mittleres Keratozytenvolumen im gescannten Hornhautgewebe unter Berücksichtigung der Zellausläufer), Zelloberfläche (= mittlere gemessene Keratozytenoberfläche im gescannten Korneagewebe), Zelldichte (= manuell ausgezählte Keratozytenzellzahl im gescannten Hornhautgewebe) sowie Volumendichte (= Verhältnis von Zellvolumen zu gescanntem Hornhautvolumen in Prozent). Als weiterer Vergleichsparameter diente der Quotient aus Länge und Breite des Zellkörpers, welcher als „Zellformfaktor“ (= shape factor) definiert wurde. Dieser Faktor erlaubte es, einen Messparameter für die Größenausdehnung sowie auch ein Maß für die Zellform zu erhalten.

Die statistische Auswertung der Messdaten wurde mit dem Programm SPSS® (Version 14.0) durchgeführt. Die Normalverteilung der einzelnen Parameter eines Keratozytenkollektivs wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft.

Die gewonnenen Messdaten bei der bullösen Keratopathie wurden mit den Daten von gesunder Hornhaut verglichen. Dabei dienten die Ergebnisse der Untersuchung von Hahnel et al. 2000 als gesunde Kontrollgruppe. Zum Vergleich von Größe und Volumen kranker und gesunder Zellen wurde der Z-Test bzw. T-Test auf die Messdaten angewendet. Für die Messreihen der gesunden sowie der kranken Zellen wurden für die Messungen analoge

Methoden verwendet. Für die Teststatistik wird somit von gleichen Fehlerquellen ausgegangen. Für die Fehlerabweichung wurde daher die Normalverteilungsannahme mit gleicher Varianz für gesunde und kranke Zellen getroffen.

5. Ergebnisse

5.1. Humane Hornhauttrepanate

Von 12 Patienten mit dem klinischen Erscheinungsbild der bullösen Keratopathie wurden die Hornhäute untersucht. Anschließend wurde die morphologische sowie morphometrische Analyse mit den Ergebnissen der gesunden Hornhaut gegenüber gestellt.

5.2. Fluoreszenzmikroskopie als Nachweis der Hornhaut-Vitalität

Die Fluoreszenzmikroskopie dient als Nachweis für die Vitalität von untersuchtem kornealem Gewebe. Durch die Zytosplasmafärbung mittels Calcein erscheinen die vitalen Keratzyten mit den entsprechenden Zellausläufern grün. Avitale Zellen weisen eine rote Kernfluoreszenz auf, welche durch Anfärbung der Kern-DNA durch das Ethidium-Homodimer-1 hervorgerufen wird (Abbildung 5-1).

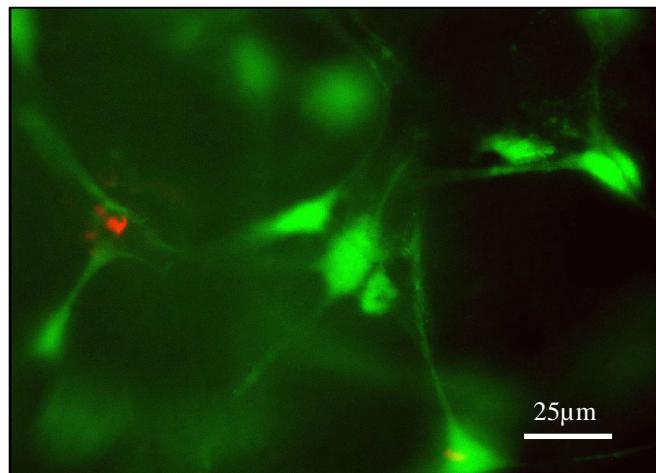


Abbildung 5-1: Darstellung von vitalen (grüne Fluoreszenz) und avitalem Keratzyten (rote Fluoreszenz) im posterioren Stroma (Wasserimmersionsobjektiv 40x/1,2 NA)

Durch diese Vitalitätsprüfung konnte nur in einem Fall eine Ethidium-Homodimer-1-positive Darstellung (entsprechend avitalem Gewebe) dokumentiert werden. Dieser Einzelfall wurde nicht in die weitere Analyse des Keratzytennetzwerkes einbezogen.

5.3. Zellmorphologie bei bullöser Keratopathie in der Fluoreszenzmikroskopie

Wie bei der Untersuchung der gesunden Hornhaut (Hahnel et al. 2000) konnten auch bei den Hornhautrepanaten mit bullöser Keratopathie eindeutig drei korneale Stromabereiche differenziert werden: ein anteriorer, zentraler sowie posteriorer Bereich mit den jeweiligen charakteristischen Keratozytensubpopulationen. Zwischen diesen drei Stromaanteilen stellten sich Übergangszonen dar, in denen die Zellmorphologie der Keratozyten von der einen Subpopulation in die benachbarte überging. Eindeutige Grenzen zwischen den drei Stomaschichten konnten nicht definiert werden.

Die folgende Ausführungen bezieht sich auf die charakteristischen Zellbereiche der verschiedenen Stomaschichten von Hornhäuten mit bullöser Keratopathie.

5.3.1. Anteriores Stroma

Das anteriore Stroma wird durch die Bowman-Membran vom Hornhautepithel abgegrenzt. Diese Keratozytensubpopulation besteht morphologisch aus einem dichten Keratozytennetzwerk mit irregulär geformten Zellen. Diese weisen zahlreiche, zum Teil weit ausladende Fortsätze auf. Häufig teilen sich diese Zellen noch vor dem Kontakt mit den benachbarten Zellausläufern und verbinden die Keratozyten miteinander (Abbildung 5-2). Bei einigen Präparaten war nur im Bereich der Epithelzellschicht und an den Schnitträndern eine intensiv rote Kernfluoreszenz infolge der Ethidium-Homodimer-1-Färbung sichtbar. Diese Gewebebereiche entsprechen geschädigtem Keratozytennetzwerk. In den weiter untersuchten stromalen Anteilen konnten keine avitalen Keratozyten nachgewiesen werden.

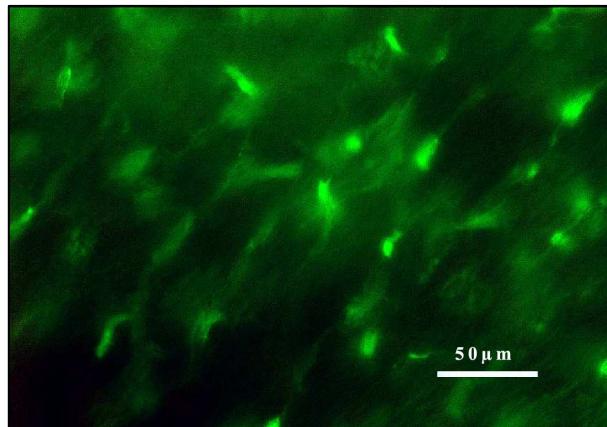


Abbildung 5-2: Darstellung der Keratozytensubpopulation im anterioren Stroma (Fluoreszenzobjektiv 20x/0,4 NA).

5.3.2. Zentrales Stroma

Im zentralen Stroma, einem Bereich zwischen 200 μm bis 400 μm vom Epithelium entfernt, konnten außer im Randschnittbereich keine avitale Keratozyten gefunden werden. Die deutlich sichtbaren langen Zellausläufer der Keratozyten verzweigen sich kaum und sind in ihrer Form gleichartig (Abbildung 5-3).

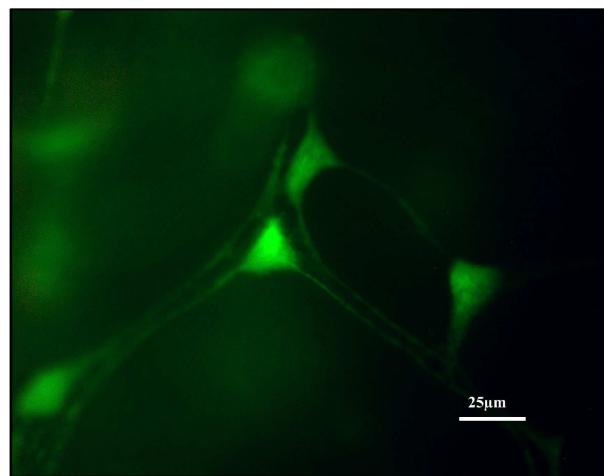


Abbildung 5-3: Darstellung vitaler Keratozyten im zentralen Stroma (Wasserimmersionsobjektiv 40x/1,2 NA)

5.3.3. Posteriore Stroma

Im posterioren Stromabereich wurden zentral ebenfalls keine avitale Keratozyten nachgewiesen. Lediglich an den Schnitträndern der Präparate waren avitale Keratozyten sichtbar. Die posteriore Keratozytensubpopulation wies einen kompakten, elliptischen Zellkörper mit langen, meist unverzweigten Fortsätzen auf (Abbildung 5-4). Wenige Zelllagen von der Descemet-Membran entfernt konnten parallel angeordnete, „mikadoartige“ Zellfortsätze gefunden werden (Abbildung 5-5).

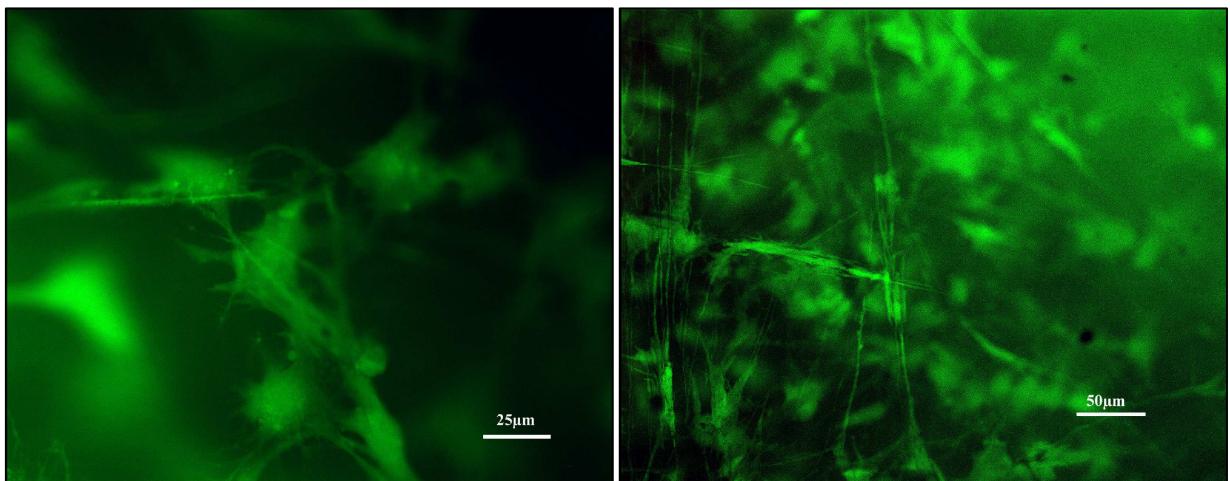


Abbildung 5-4: Darstellung vitaler Keratozyten im posterioren Stroma (Wasserimmersionsobjektiv 40x/1,2 NA)

Abbildung 5-5: Posteriore Keratozytensubpopulation nur wenige Zelllagen von der Descemet-Membran entfernt (Wasserimmersionsobjektiv 20x/0,4 NA)

5.4. Zellmorphologie bei konfokaler Lasercanning-Fluoreszenz-Mikroskopie

Durch die „einfache“ Fluoreszenz-Mikroskopie (siehe Kapitel 5.2, 5.3) werden fluoreszierende Zellen dargestellt, die je nach Stärke der Fluoreszenz der einzelnen Zelle andere Zellen bzw. Zellschichten überstrahlen und so Summationseffekte auslösen können. Im Gegensatz dazu ermöglicht die konfokale Lasercanning-Fluoreszenz-Mikroskopie die genaue Betrachtung der verschiedenen Stromaschichten des Keratozytennetzwerkes, da die Intensität der Fluoreszenz bei dieser Darstellung unabhängig von der Stromatiefte gleichbleibend ist.

Das konfokale Laserscanning-Fluoreszenz-Mikroskop erlaubte hochauflösende, detaillierte Aufnahmen, die für eine genaue Betrachtung der Keratozytensubpopulationen bei bullöser Keratopathie und Beurteilung der Morphologie der Zellen in den einzelnen Stomaschichten erforderlich ist.

5.4.1. Anteriores Stroma

Die Keratozyten im anterioren Stroma bilden ein charakteristisches Netzwerk von irregular geformten Zellen. Diese wiesen multiple, sich verzweigende Fortsätze auf.

Durch die intensive Fluoreszenz sowie die ödematöse Verquellung der Kornea bei der bullösen Keratopathie konnten die Zellgrenzen bei dieser Keratozytensubpopulation nicht immer sicher definiert werden (Abbildung 5-6). In Abbildung 5-7 wird ein charakteristischer Keratozyt aus dem anterioren Stromabereich schematisch dargestellt.

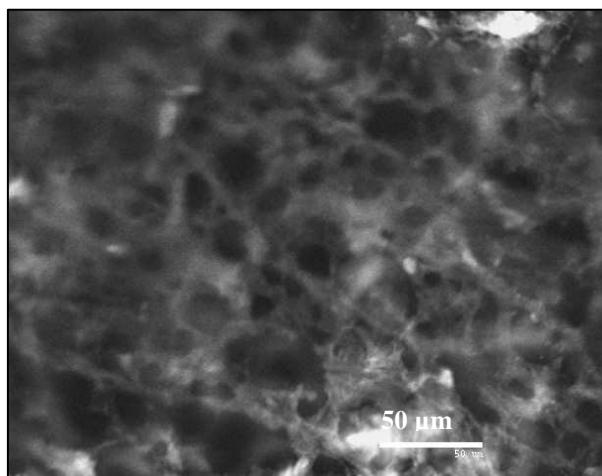


Abbildung 5-6: Darstellung des Keratozytennetzwerkes im anterioren Stroma (Wasserimmersionsobjektiv 20x/1,2 NA. Der Messbalken entspricht 50 μm).

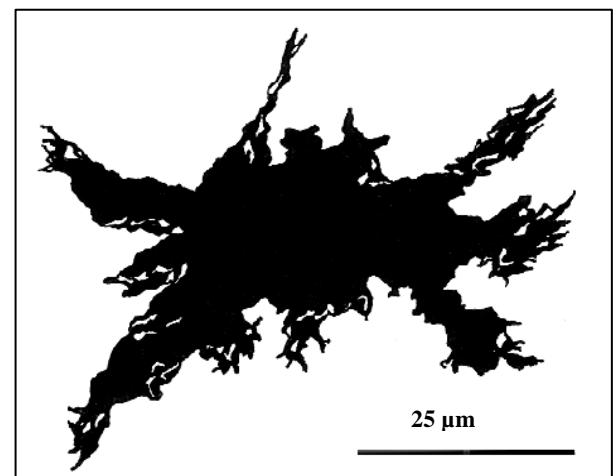


Abbildung 5-7: Graphische Darstellung eines Keratozyten im anterioren Stroma bei bullöser

5.4.2. Zentrales Stroma

Den größten Volumenanteil des Stromas nehmen die charakteristischen triangulär geformten Keratozyten im zentralen Stromabereich ein. Die pyramidenförmigen Zellkörper grenzen sich von der umgebenden Matrix kontrastreich ab. Diese Keratozytensubpopulation weist lange, sehr dünne Zellausläufer auf, die meist unverzweigt die Nachbarzellen berühren (Abbildung 5-8).

In Abbildung 5-9 wird ein einzelner, charakteristischer Keratozyt aus dem zentralen Stromabereich dargestellt.

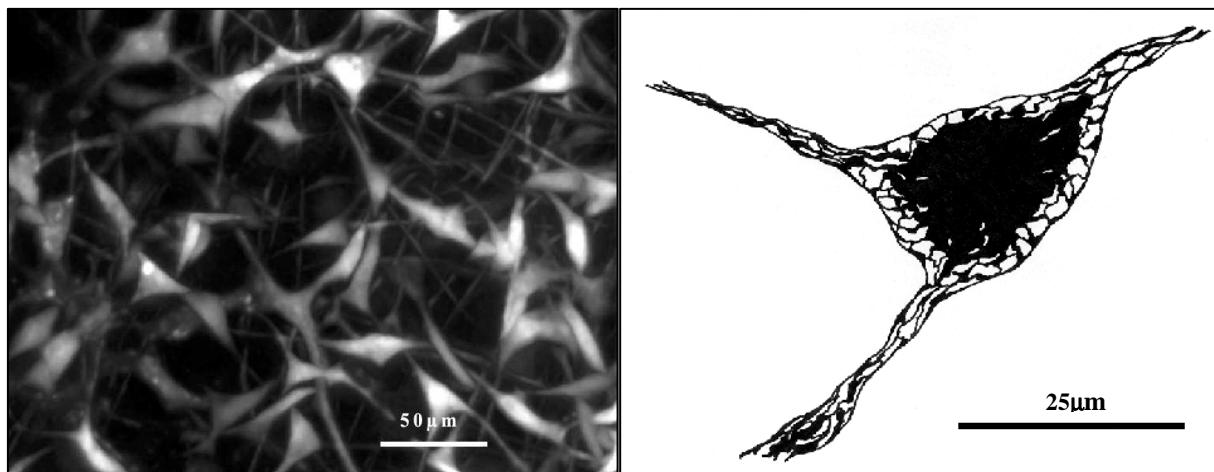


Abbildung 5-8: Darstellung der Keratozytensubpopulation im zentralen Stroma. (Wasserimmersionsobjektiv 20x/1,2 NA. Der Messbalken entspricht 50 μ m).

Abbildung 5-9: Graphische Darstellung eines typischen Keratozyten im zentralen Stroma bei bullöser Keratopathie. Der Messbalken entspricht 25 μ m.

5.4.3. Posteriore Stroma

Einige Zelllagen von der Descemet-Membran entfernt ließ sich im posterioren Stroma ein Keratozytennetzwerk von homogen fluoreszierenden Zellen darstellen. Die Zelldichte erschien hier geringer als im anterioren und zentralen Stroma. Bei dieser Keratozytensubpopulation erkennt man irregulär geformte, elliptische Zellen, die einen kompakten Zellkörper aufweisen (Abbildung 5-10).

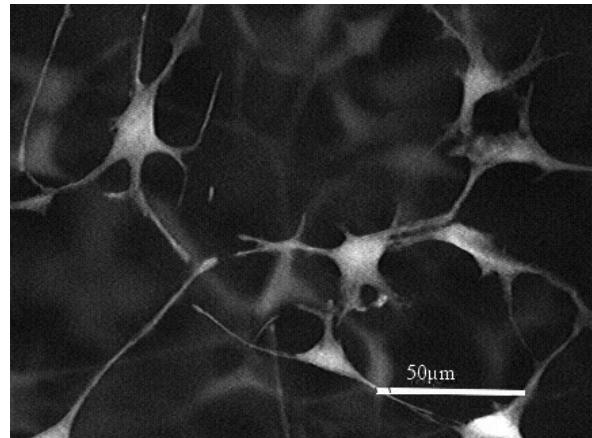


Abbildung 5-10: Darstellung der Keratozytensubpopulation im posterioren Stroma. (Wasserimmersionsobjektiv 60x/1,2 NA)

Die langen, dünnen Zellausläufer sind meist unverzweigt und bilden ein lockeres Netzwerk. In den ersten Zelllagen dicht an der Descemet-Membran sind die Zellausläufer zum Teil parallel angeordnet und erscheinen „mikadoartig“ (Abbildung 5-11).

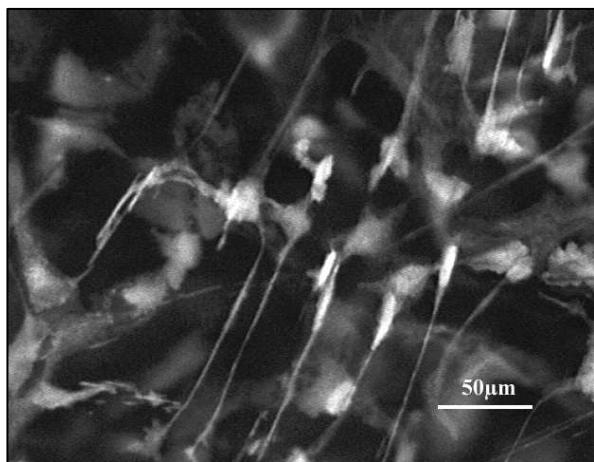


Abbildung 5-11: Darstellung der posterioren Keratozytensubpopulation wenige Zelllagen von der Descemet-Membran entfernt. (Wasserimmersionsobjektiv 60x/1,2 NA)

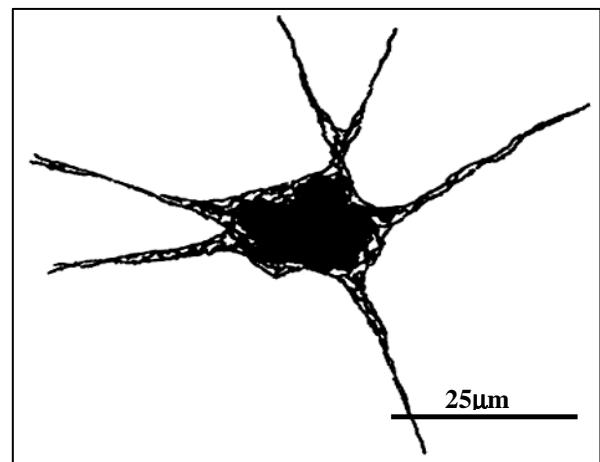


Abbildung 5-12: Graphische Darstellung eines Keratozyten im posterioren Stroma bei bullöser Keratopathie mit den deutlich erkennbaren, dünnen, meist unverzweigten Zellausläufern.

Die schematische Darstellung eines charakteristischen Keratozyten aus dem posterioren Stromabereich ist in (Abbildung 5-12) dargestellt.

5.5. Morphometrischer Vergleich der bullösen Keratopathie nach Fuchs'scher Endotheldystrophie versus postoperativer Entstehung

Es wurde überprüft, ob die zwei unterschiedlichen pathogenetischen Vorgänge, die zum Erscheinungsbild der bullösen Keratopathie führen, strukturelle beziehungsweise morphometrische Unterschiede der Keratozyten aufweisen. Dazu wurde das Patientenkollektiv mit der Fuchs'schen Endotheldystrophie als Grunderkrankung mit einer Patientengruppe verglichen, deren bullöse Keratopathie nach Kataraktoperation entstanden war (Tabelle 5-1).

Um die deskriptive Morphologie quantitativ zu erfassen, wurde die Längen- und Breitenausdehnung der Keratozyten bei bullöser Keratopathie nach Kataraktoperation und bei Fuchs'schen Endotheldystrophie gemessen und verglichen. Die Zellzahlen in den gemessenen Korneabereichen wurden manuell ausgezählt. Als weiterer Vergleichsparameter diente der Quotient aus Zelllänge und -breite, welcher als „Zellformfaktor“ (= Shape factor) bezeichnet wird. Um möglichst vergleichbare Daten zu erhalten, wurde die Vorgehensweise der Zellvermessung analog zu den Zellmessungen von Hahnel et al. 2000 gewählt.

In Tabelle 5-1 werden die entsprechenden Messwerte zusammengefasst:

Tabelle 5-1 Längen- und Breitenausdehnung der Keratozyten bei der bullösen Keratopathie nach Kataraktoperation und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den verschiedenen Stromaschichten.

Anteriores Stroma		Zentrales Stroma		Posteriores Stroma	
Kat.OP (n = 45)	Fuchs (n = 38)	Kat.OP (n = 118)	Fuchs (n = 26)	Kat.OP (n = 167)	Fuchs (n = 125)
Länge [µm]	21,8 ± 2,8	21,0 ± 2,4	26,0 ± 3,3	25,2 ± 3,3	27,6 ± 4,7
Signifikanz	p = 0,06		p = 0,06		p ≤ 0,05
Breite [µm]	10,9 ± 1,7	11,0 ± 1,7	11,9 ± 2,5	11,8 ± 2,0	12,3 ± 2,1
Signifikanz	p = 0,88		p = 0,64		p = 0,27
Shape	2,1 ± 0,6	2,1 ± 0,7	2,4 ± 0,7	2,5 ± 1,0	2,3 ± 0,6
Signifikanz	p = 0,23		p = 0,61		p = 0,93

„Shape“ steht für den Zellformfaktor, der sich aus dem Quotienten aus Längen- und Breitenausdehnung berechnet.
(n = Anzahl vermessener Keratozyten)

Bei der Unterscheidung bezüglich der pathogenetisch unterschiedlichen bullösen Keratopathien konnten keine signifikanten morphometrischen Unterschiede gefunden werden. Die Berechnungen wurden für den Breiten- und den Zellformvergleich in allen drei Stroma- schichten mit Hilfe des Z-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt (SPSS 14,0 für Windows). Die Werte der einzelnen statistischen Berechnungen dazu werden im Anhang dargestellt (Tabelle 11-1 bis 11-6).

Auch morphologisch konnten keine Unterschiede zwischen diesen zwei Populationen gefunden werden. Daher werden im Folgenden diese Krankheitsbilder in einer Gruppe „bulöse Keratopathie“ zusammengefasst. Zu einem späteren Zeitpunkt wird diese pathologische Gruppe mit Hornhäuten eines gesunden Patientenkollektivs verglichen.

5.5.1. Zelllänge

Die mittlere Zelllänge der Keratozyten bei den untersuchten Proben nahm kontinuierlich von anterior über zentral nach posterior zu (anterior: $21,8 \mu\text{m} \pm 4,2 \mu\text{m}$; zentral: $25,4 \mu\text{m} \pm 5,4 \mu\text{m}$; posterior: $27,1 \mu\text{m} \pm 4,8 \mu\text{m}$). In Bezug zum anterioren Stroma entsprach die Längenzunahme im posterioren Stroma + 24,2 % ($p = 0,06$). Zur zentralen Keratozyten- subpopulation war nur eine weitere Zunahme der Länge um + 7,8 % ($p = 0,19$) zu verzeichnen (Abbildung 5-13).

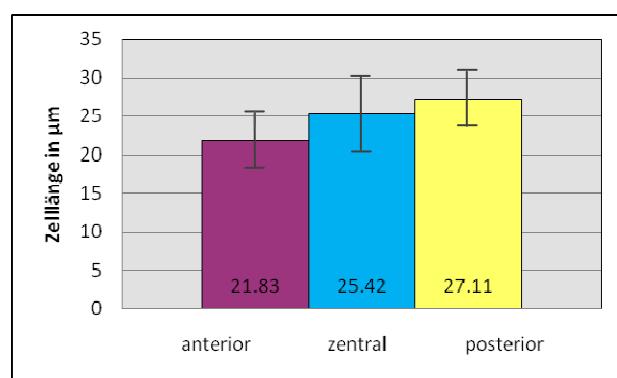


Abbildung 5-13: Mittlere Zelllängen der Keratozyten in den drei Keratozytensubpopulationen.

5.5.2. Zellbreite

Auch die Zellbreite nahm von anterior nach posterior stetig zu (anterior: $11,0 \mu\text{m} \pm 2,5 \mu\text{m}$; zentral: $11,6 \mu\text{m} \pm 2,7 \mu\text{m}$; posterior: $12,2 \mu\text{m} \pm 2,2 \mu\text{m}$). Im Vergleich zum anterioren Stroma betrug die Breitenzunahme der zentralen Stromazellen 5,5 % ($p = 0,01$). Die posteriore Keratozytensubpopulation nahm um 11,5 % ($p = 0,57$) im Vergleich zum anterioren Stroma zu (Abbildung 5-14).

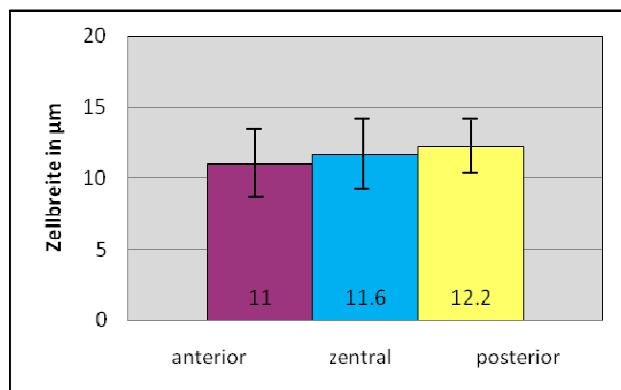


Abbildung 5-14: Mittlere Zellbreite vom anterioren zum posterioren Stroma.

5.5.3. Zellformfaktor

Der Zellformfaktor (Länge/Breite) war im anterioren Stromabereich mit dem Quotient 2,1 $\pm 0,6$ ($n = 81$) am geringsten. Im zentralen Stromabereich nahm der Faktor auf $2,4 \pm 0,8$ ($n = 142$) zu. Dies entspricht einem Anstieg um 13,9 % ($p = 0,15$) gegenüber dem anterioren Stroma. Das bedeutet, dass in diesem Stromabereich die Keratozyten im Verhältnis zu den Keratozytenpopulationen im anterioren Stroma länglicher waren.

Im posterioren Stroma ergab sich für die Quantifizierung der Zellform ein Faktor von $2,3 \pm 0,6$ ($n = 290$). Dies entsprach einer Zunahme um 9,6 % ($p = 0,54$) im Vergleich zu den Keratozyten des anterioren Stromas, jedoch einer Abnahme des Zellformfaktors zur zentralen Zellpopulation um 3,8 % ($p = 0,01$). Die Zellform war im posterioren Stroma im Vergleich zur anterioren Keratozytensubpopulation mehr in die Länge gezogen, jedoch in Be-

zug zu den Keratozyten im zentralen Stroma in der Längsachse etwas gestauchter (Abbildung 5-15).

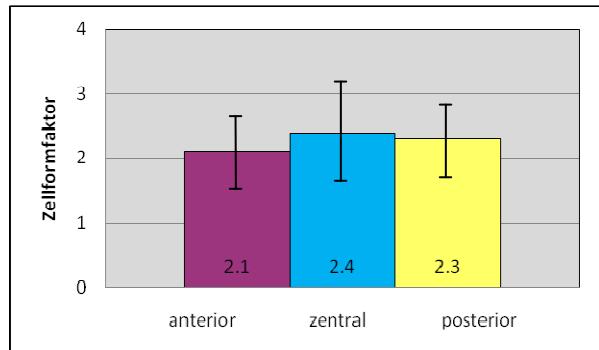


Abbildung 5-15: Darstellung des Zellformfaktors der drei Keratozytensubpopulationen.

5.5.4. Zellvolumen

Im anterioren Stroma wurde ein mittleres Zellvolumen der einzelnen Keratozyten von $5,5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ ($\pm 1,3 \times 10^3 \mu\text{m}^3$) bestimmt ($n = 191$) (Abbildung 5-16).

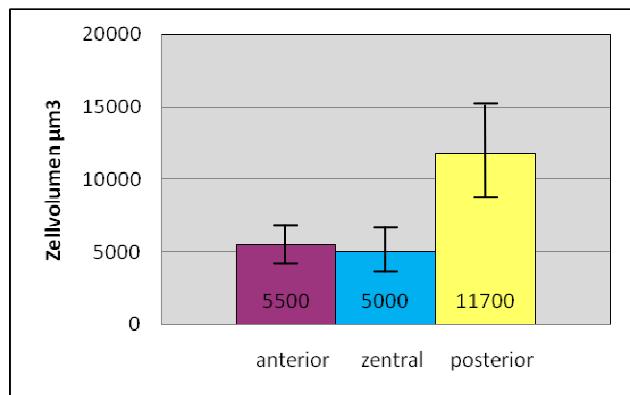


Abbildung 5-16: Darstellung des mittleren Zellvolumens eines Keratozyten im entsprechenden Stroma.

Bei der zentralen Keratozytensubpopulation war das geringste Zellvolumen zu messen. Dieses betrug lediglich $5,0 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ (Mittelwert der Zellvolumina; $SD \pm 1,5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$; $n = 260$) (Abbildung 5-16). Dies entspricht einer Reduktion um 8,8 % ($p = 0,1$) im Vergleich zur anterioren Zellpopulation.

Nach einer leichten Reduktion des Zellvolumens von anterior nach zentral nahm dieses im posterioren Stroma stark zu. Das Volumen betrug $11,7 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ ($SD \pm 3,5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$; $n = 277$) und war somit das größte gemessene Zellvolumen der drei Keratozytensubpopulationen (Abbildung 5-16). Daraus ergab sich im posterioren Stromabereich eine Zellvolumenvergrößerung um 12,1 % ($p \leq 0,001$) zum anterioren Stroma.

5.5.5. Volumendichte

Im anterioren Stroma wurde ein mittleres Zellvolumen des einzelnen Keratozyten von $5,5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ ($SD \pm 1,3 \times 10^3 \mu\text{m}^3$; $n = 191$) bestimmt (Abbildung 5-16). Daraus ergab sich eine Volumendichte von $9,9 \pm 2,6 \%$ pro $10^6 \mu\text{m}^3$ Hornhautvolumen (Abbildung 5-17).

Zentral war eine durchschnittliche Volumendichte von $8,6 \pm 2,4 \%$ ($n = 260$) zu messen. Die Volumendichte in diesem Stromabereich war am geringsten. Diese war um 13,9 % ($p = 0,89$) geringer als im anterioren Stroma (Abbildung 5-17).

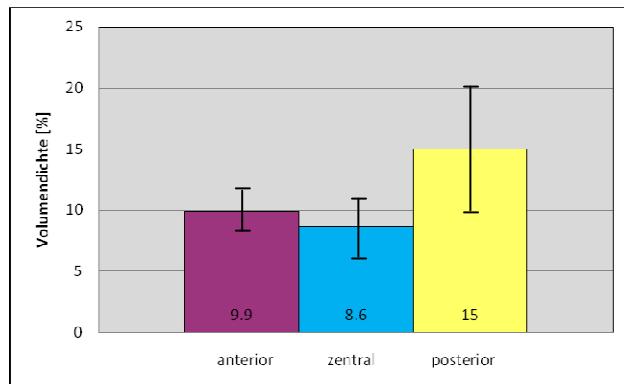


Abbildung 5-17: Darstellung der Summe der Zellvolumina pro $10^6 \mu\text{m}^3$ Hornhaut (in Prozenten).

Bei der Zellpopulation im posterioren Stromabereich war die Volumendichte am größten und betrug $15,0 \pm 5,6 \%$ pro $10^6 \mu\text{m}^3$ Hornhaut (Abbildung 5-17). Das entspricht einer Dichteerhöhung um 50,9 % ($p \leq 0,001$) im Vergleich zum anterioren Stroma und zur zentralen Volumendichte um 79,8 % ($p = \leq 0,001$).

5.5.6. Zelloberfläche

Die gemessene Zelloberfläche betrug im anterioren Stromabereich $6,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ mit einer Standardabweichung von $\pm 1,7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ($n = 191$) (Abbildung 5-18).

Im zentralen Stromabereich betrug die mittlere Zelloberfläche $4,1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ($SD \pm 1,6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; $n = 260$) (Abbildung 5-18). In Relation zur anterioren Keratozytensubpopulation entsprach dieser Wert einer signifikanten Reduktion um 36,4 % ($p < 0,001$).

In der posterioren Keratozytensubpopulation betrug die Keratozytenoberfläche $6,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ($SD \pm 2,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; $n = 277$) (Abbildung 5-18). Dies entspricht einer geringen Zunahme der Zelloberfläche von 1,1 % ($p = 0,7$) im Vergleich zur anterioren Hornhautschicht und einer Zunahme von 37,5 % ($p \leq 0,001$) zum zentralen Stroma.

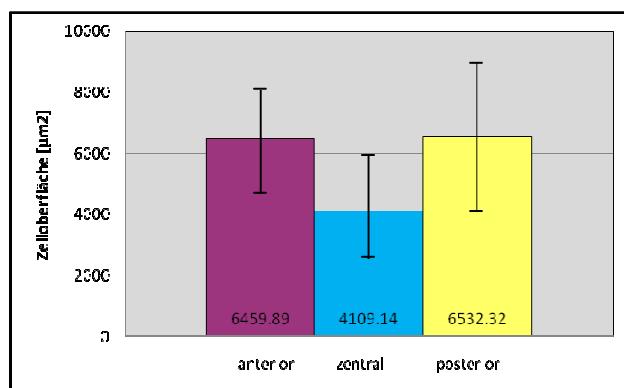


Abbildung 5-18: Darstellung der mittleren Zelloberflächen der drei Keratozytensubpopulationen.

5.5.7. Zelldichte

Die Zelldichte nimmt stetig von anterior nach posterior ab und war somit bei der anterioren Keratozytensubpopulation am dichtesten zu messen. Im subepithelialen Bereich, also im anterioren Stroma, betrug die Keratozytendichte 18,1 Zellen pro $10^6 \mu\text{m}^3$ ($\text{SD} \pm 2,4$; $n = 191$) (Abbildung 5-19).

Gegenüber dem anterioren Stroma entspricht die Reduktion der zentralen Keratozytendichte 5 % ($p = 0,06$). Die Keratozytendichte vom anterioren zum posterioren Bereich nimmt sogar um 26,1 % ($p \leq 0,001$) ab. Die Zelldichte nimmt von der zentralen zur posterioren Keratozytensubpopulation um 22,4 % ($p = \leq 0,001$) ab und beträgt noch 13,4 Zellen pro $10^6 \mu\text{m}^3$ Hornhaut ($\text{SD} \pm 3,7$; $n = 277$). Im zentralen Stroma war die Zelldichte nur um 4,8 % ($p = 0,06$) geringer als im anterioren Stromabereich zu messen und betrug 17,2 Zellen pro $10^6 \mu\text{m}^3$ ($\text{SD} \pm 2,5$; $n = 260$) (Abbildung 5-19).

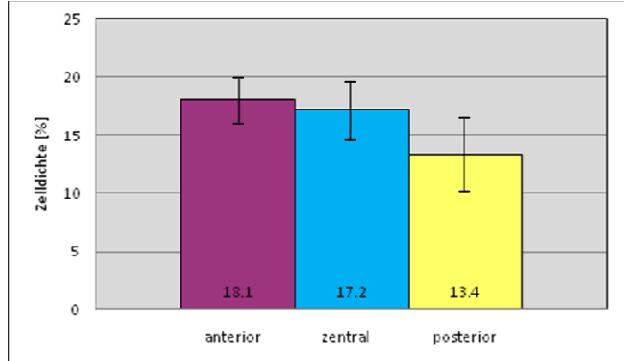


Abbildung 5-19: Darstellung der mittleren Zelldichten (Anzahl Zellen pro $10^6 \mu\text{m}^3$ Hornhaut) in den drei Keratozytensubpopulationen.

Die Differenzen zwischen den oben genannten Zelldichten und Volumendichten bei der bullösen Keratopathie spiegeln die Unterschiede der Keratozytenmorphologie zwischen den drei Stromaschichten wieder.

Die Zelldichte vermindert sich bei der bullösen Keratopathie stetig in der z-Achse von anterior über die zentrale zur posterioren Keratozytensubpopulation. Als Ausgangswerte werden die Zell- und Volumendichte im anterioren Stromabereich auf 100 % normiert. Die Zelldichte im zentralen Bereich nimmt um 5 % ($p = 0,06$) auf 95 % ab. Vom zentralen zum posterioren Bereich reduziert sich die Zelldichte um weitere 22,4 % ($p \leq 0,001$) auf 74 % des Ausgangswertes (Abbildung 5-20).

Die Volumendichte nahm von anterior (ebenfalls mit 100 % angegeben) zum zentralen Stroma auf 87 % ($p = 0,89$) ab. Weiter in Richtung der Descemet Membran, also im posterioren Stromabereich, nahm die Volumendichte um über fünfzig Prozent zu, bis zu 152 % ($p \leq 0,001$) des anterioren Stromas (Abbildung 5-20).

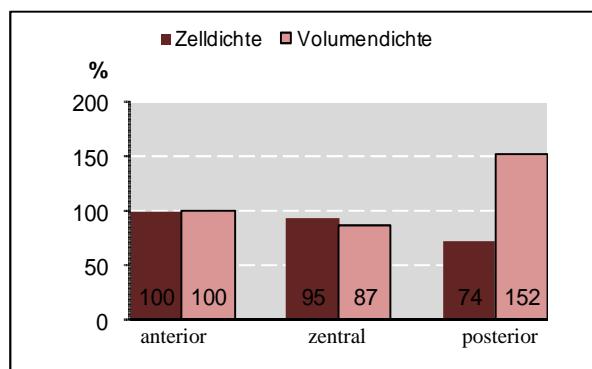


Abbildung 5-20: Vergleich der Zelldichte (Anzahl Keratozyten / gescanntes Volumen) und Volumendichte (Zellvolumen / gescanntes Volumen in den drei Stomaschichten; anteriores Stroma = 100 %).

6. Diskussion

6.1. Vorteile der vitalen Doppelfärbung und der konfokalen Mikroskopie/ Diskussion der Methodik

Zur Visualisierung der Keratozyten wurde der LIVE/DEAD®-Kit benutzt, ein Vitalfarbstoff-Assay von Molecular Probes (Poole CA et al. 1993). Die Anwendung der simultanen Applikation von Calcein-AM und Ethidium-Homodimer-1 bei Raumtemperatur ermöglichte eine Differenzierung von vitalen und avitalen Zellen. Die beiden Substanzen können durch die unterschiedlichen Wellenlängen der Emission eindeutig voneinander unterschieden werden (siehe Kapitel 4.2.).

Die Hintergrundfluoreszenz von Calcein-AM ist sehr gering, da der Vitalfarbstoff erst in Wechselwirkung mit den Esterasen der Zellen fluoresziert. Ein weiterer Vorteil von Calcein ist die pH-Unabhängigkeit. Nach Hydrolyse des Calceins durch unspezifische intrazelluläre Esterasen ist das entstandene Polyanion nicht mehr membrangängig, so dass ein Austreten des nun fluoreszierenden Calceins aus der Zelle ausgeschlossen ist. Dieses etablierte Fluoreszenz-Verfahren ermöglicht die Untersuchung von vitalem Gewebe. Dadurch lässt sich eine Artefaktbildung der Netzwerkstruktur vermeiden, welche durch die histologische Präparation bedingt sein kann. Die Intensität der Fluoreszenz sowie deren invasive Verteilung ermöglicht die Echtzeitanalyse von vitalem Gewebe (Hahnel et al. 1997).

Die softwaregesteuerte konfokale Laserscanning Fluoreszenzmikroskopie gewährleistet eine dreidimensionale Rekonstruktion des untersuchten Keratozytennetzwerkes (Somodi, Slowik, Guthoff 1995, Hahnel et al. 1997, Somodi et al. 1997). Diese Visualisierungsme thode hat den Vorteil, dass die Zellen nicht nur zweidimensional betrachtet, sondern beliebig räumlich gedreht werden können. Die Untersuchungen wurden mit unterschiedlichen Varianten von Mikroskopen durchgeführt. Die Vorteile der dreidimensionalen Darstellung des Keratozytennetzwerkes wurde in anderen Publikationen beschrieben (Morishige et al. 2012, Schrems-Hoesl et al. 2013, Morishige et al. 2013).

Die angewendete, hoch entwickelte konfokale in vivo Mikroskopie (Nikon Diaphot 300, Noran Odyssey XL) ermöglichte eine reduzierte Streustrahlung im Fokusbereich und damit eine gegenüber normaler Fluoreszenzmikroskopie deutlich höhere optische Auflösung. Durch die Anwendung dieser Vorgehensweise konnten die durch histologische Präparation bedingten Veränderungen und Artefakte der untersuchten Gewebe vermieden werden.

Die Verwendung von großen Hornhautgewebeblöcken, welche zur besseren mikroskopischen Darstellung in Lamellen geschnitten wurden, ermöglichte die Untersuchung ausgedehnter intakter Bereiche des Keratozytennetzwerkes.

Corbett und Mitarbeiter wiesen jedoch auf zwei Punkte bei der histologischen Analyse mit dem konfokalen Mikroskop hin: Einerseits die Gefahr, Artefakte bei der digitalen Bildbearbeitung zu erhalten, andererseits die Schwierigkeit bei der Interpretation von Bildern mit komplexen zellulären und extrazellulären Prozessen bei einer kornealen Wundheilung (Corbett et al. 1996).

6.2. Vergleich der Keratozytensubpopulationen in den unterschiedlichen Stromaschichten

Ziel dieser Arbeit war, die Bestimmung der Morphologie sowie der Morphometrie des humanen Keratozytennetzwerkes bei bullöser Keratopathie, um anschließend einen Vergleich mit dem gesunden Keratozytennetzwerk zu ermöglichen.

Der morphometrische Vergleich der pathologisch veränderten Zellen bei Fuchs'scher Endotheldystrophie versus postoperativ entstandener bullöser Keratopathie zeigte keine Unterschiede (Tabelle 5-1). Deshalb wurden die Korneae wie auch in anderen Publikationen als ein Patientenkollektiv zusammengefasst (Brunette 2011).

Zur Beurteilung der vitalen Keratozytenmorphologie unter größtmöglicher Vermeidung von artifiziellen Veränderungen, wurde die Fluoreszenzmikroskopie sowie die konfokale Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Daran anschließend erfolgte eine dreidimensionale Rekonstruktion des Keratozytennetzwerkes (Becker et al. 1999, Dorn et al. 2000).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Somodi et al. 1997b, Becker et al. 1998 und Hahnel et al. 2000 konnten auch bei der bullösen Keratopathie im Stroma der Kornea drei morphologisch differenzierte Keratozytensubpopulationen beschrieben werden. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Morphologien könnte der Gradient des Sauerstoffgehaltes vom Epithel zum Endothel (Leung et al. 2011, Takatori et al. 2012) und somit in den korrespondierenden Stromaschichten sein. Diese Sauerstoffversorgung der Hornhaut wird durch Diffusion über den Tränenfilm von epithelialer Seite gewährleistet und nimmt nach posterior ab. Von endothelialer Seite, also vom Kammerwasser her sowie vom limbalen Gefäßkranz, gelangt nur ein geringerer Sauerstoffanteil in die Kornea (Sauerstoffpartialdruck 30-40 mmHg) (Klyce und Beuerman 1988).

Möglicherweise spielt auch die Kollagenbildung der extrazellulären Matrix (Michelacci 2003) eine Rolle bei der Differenzierung der Keratozyten. Sie besitzt eine aktive und komplexe Funktion bei der Regulation der Zellen, indem sie deren Entwicklung, Migration, Proliferation, metabolische Funktion und Gestalt beeinflusst (Jain und Azar 1994).

6.3. Morphologischer Vergleich zwischen bullöser Keratopathie und gesunder Hornhaut

Trotz der Stromatrübung in den nativen Hornhautrepanaten konnten bei der konfokalen Untersuchung der bullösen Keratopathie bei den Gewebeproben im anterioren und zentralen Stroma keine Keratozytenveränderungen dokumentiert werden. Ein Verlust der Abbildungsschärfe in den pathologischen Präparaten konnte ebenfalls nicht verzeichnet werden.

Bei der bullösen Keratopathie bilden die Keratozyten des anterioren Stromas direkt unter der Bowmanschen Membran ein dichtes Netzwerk bis zu einer Hornhauttiefe von etwa 150 µm. Diese Hornhautzellen sind morphologisch gleich zur Gruppe der gesunden Kornea: unregelmäßig geformte Zellkörper mit vielen Fortsätzen, welche breitbasig am Zellkörper ansetzen. Diese Zellausläufer verzweigen sich zum Teil über weite Distanzen. Strukturelle Unterschiede der Keratozyten zur gesunden Hornhaut konnten nicht festgestellt werden.

Im zentralen Stromabereich der pathologisch veränderten Präparate, welche in einer Hornhauttiefe von 150 µm bis 350 µm von der Bowmanschen Membran entfernt in der z-Achse gemessen wurden, weisen die Keratozyten lange, feine Ausläufer auf. Diese sind nur selten verzweigt. Die Zellkörper sind charakteristisch triangulär geformt. Zusammenfassend ist für das zentrale Stroma zu dokumentieren, dass bei der Erkrankung der bullösen Keratopathie in diesem Stromaabschnitt keine morphologischen Keratozytenveränderungen zur gesunden Kornea nachgewiesen werden konnten.

Hingegen sind im posterioren Stroma ausgeprägte morphologische zelluläre Veränderungen zu sehen. Im Gegensatz zu der in dieser Keratozytensubpopulation beschriebenen triangulären Zellkörpern bei gesunder Kornea (Somodi et al. 1997b, Hahnel et al. 2000), sind bei der bullösen Keratopathie überwiegend irreguläre, meist elliptisch geformte Keratozyten registriert (siehe Kapitel 5.4.3.). Es zeigen sich keine dicht verzweigten netzartigen Strukturen der Zellausläufer, wie es bei der gesunden Hornhaut beschrieben wurde (Hahnel et al. 2000), sondern nur noch rarefizierte lange und dünne, meist unverzweigte Zellausläufer (Dorn et al. 2000). Dicht an die Descemet Membran angrenzende Zellschichten weisen teils lange, dünne, teilweise parallel verlaufende Zellausläufer auf. Diese Strukturen wer-

den von Morishige und Mitarbeiter 2012 als lange parallele Kollagenfasern interpretiert. Mit den hochauflösenden optischen Schnitten des konfokalen Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskops konnte deutlich gezeigt werden, dass im Gegensatz zur gesunden Kornea (Hahnel C et al. 2000), eine deutliche Rarefizierung der netzartigen Verzweigungen zu verzeichnen war.

Eine mögliche Erklärung, warum die morphologischen Veränderungen ausschließlich im posterioren Stroma auftreten, kann bei der primären Degeneration / Dekompensation des anatomisch angrenzenden Endothels zu finden sein. Auf dieses Erklärungsmodell wird detailliert in Kapitel 6.4. eingegangen. Schrems-Hoesl und Mitarbeiter konnten 2013 zeigen, dass bei diesem pathologisch veränderten Korneae die Endothelzelldichte signifikant abnimmt und konsekutiv auch eine Änderung der Keratozytendichte im posterioren Stromaebereich zu messen ist.

6.4. Morphometrischer Vergleich zur gesunden Kornea

Bei den pathologisch veränderten Keratozyten zeigten sich starke Unterschiede im Bezug auf das Zellvolumen von gesunden Zellen. Diese subjektiv festgestellte Abweichung wurde anhand der ausgewerteten Daten auf statistische Signifikanz überprüft. Dazu wurde der Z-Test bzw. der ungepaarte T-Test auf die Messdaten angewendet. Für die Messungen der pathologisch veränderten Keratozyten wurden analoge Methoden wie bei der gesunden Kornea angewendet. Dadurch konnte eine gute Vergleichbarkeit der Messungen geschaffen werden. Die Testvoraussetzungen bezüglich den untersuchten Daten, unter anderem die Normalverteilung der Grundgesamtheiten, wurden mit dem Programm SPSS überprüft.

Um die morphometrischen Vergleiche mit den Daten der Keratozytensubpopulationen von gesunden Hornhäuten durchzuführen, wurden die Daten von Hahnel et al. 2000 verwendet. Bei der quantitativen Analyse des mittleren Zellvolumens im anterioren Stroma pro Kubikmikrometer Hornhautvolumen, zeigte sich mit $5503 \mu\text{m}^3$ kein signifikanter Unterschied ($p = 0.3$) zum Keratozytenvolumen des gesunden Patientenkollektives ($5400 \mu\text{m}^3$). Diese geringfügige Volumenzunahme entspricht lediglich einer Größenzunahme von 1.9 % im Vergleich zur gesunden Hornhaut. Die Balkendiagramme der erkrankten Zellen bei bullöser Keratopathie werden homogen einfarbig dargestellt. Die Darstellung der gesunden Hornhaut zeigen die schraffierten Balken (Abbildung 6-1). Die Vergleichswerte der gesunden Kornea wurden von der Arbeit von Hahnel et al. (2000) übernommen.

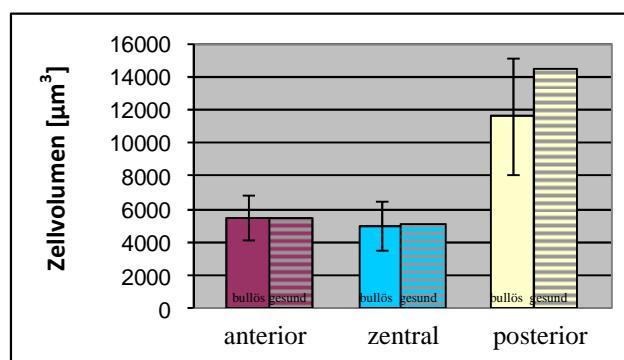


Abbildung 6-1: Darstellung des mittleren Zellvolumens der drei Keratozytensubpopulationen bei bullöser Keratopathie (homogene Einfärbung) und gesunder Hornhaut (schraffierte Einfärbung).

Die Keratozytensubpopulationen des zentralen Stromabereichs unterschieden sich im mittleren Zellvolumen ebenfalls nicht signifikant von der gesunden Hornhaut (zentral: $p = 0.4$). Das durchschnittliche Zellvolumen nahm nach zentral in Bezug zum anterioren Stroma ab und entsprach den Messdaten der gesunden Kornea (0.4 % größer als das zentrale Keratozytvolumen bei gesunder Hornhaut). Eine mögliche Erklärung, warum die Zellvolumina bei diesen Keratozytensubpopulationen im anterioren sowie im zentralen Stroma zur gesunden Kornea konstant bleiben, könnte aus der nur geringgradigen Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes in den anterioren Korneabereichen resultieren (Leung et al. 2011).

Im posterioren Stroma hingegen war ein hoch signifikanter Volumenzuwachs im Vergleich zur anterioren und zentralen Keratozytensubpopulation zu messen ($p < 0.001$). Dieser mittlere Zellvolumenanstieg war jedoch im Vergleich zur gesunden Hornhaut geringer ausgeprägt. Das Zellvolumen im posterioren Stroma betrug bei bullöser Keratopathie $11670 \mu\text{m}^3$. Im Vergleich zum gesunden Patientenkollektiv entsprach dies einer Reduktion des Zellvolumens um 19 % (Abbildung 6-1).

Eine Erklärung für die Abnahme des Zellvolumens ist die Rarefizierung der Zellausläufer. Ebenfalls wird die Verkleinerung des Zellkörpers durch die Reduktion des durchschnittlichen Zellvolumens im posterioren Stroma verursacht, wie sie genauer in Kapitel 5.3.3. und Kapitel 5.4.3. beschrieben wird.

Bei der quantitativen Analyse der Zelldichte zeigte sich, dass diese von anterior nach posterior abnimmt. Sie verringerte sich jedoch bei der bullösen Keratopathie nicht in dem Ausmaß, wie bei der gesunden Hornhaut (Hahnel et al. 2000). Die höchste Zelldichte wurde wenige Zelllagen von der Bowmanschen Membran entfernt gemessen (18.1 Zellen/ $10^6 \mu\text{m}^3$, Abbildung 6-2). In den tieferen Stomaschichten nimmt die Zelldichte stetig über zentral (17.2 Zellen/ $10^6 \mu\text{m}^3$, Abbildung 6-2) nach posterior (13.4 Zellen/ $10^6 \mu\text{m}^3$, Abbildung 6-2) ab. Die größte Differenz der Zelldichte von der pathologisch veränderten Hornhaut zum gesunden Patientenkollektiv trat im anterioren Stromabereich auf. Ursache für die unterschiedlichen Zelldichten können die physikalischen Kräfte oder eine Hornhautdehydratation sein (Reim 1992). Bei der bullösen Keratopathie tritt eine Stromaquehlung, also Hydratation auf und verursacht dadurch eine relative Reduktion der Zelldichte. Møller-Pedersen und Ehlers (1995) berechneten die Keratozytendichte in Stromaproben

verschiedener gesunder humaner Hornhäuten mit Hilfe des DNA-Gehaltes. Dabei fanden sie subendothelial eine etwa 30 % geringere Zelldichte als in den subepithelialen Stroma-bereichen. Diese Resultate konnten auch von anderen Arbeitsgruppen mittels anderen Untersuchungsverfahren bestätigt werden (Prydal et al. 1998, Hahnel 2000, Schrems-Hoel et al. 2013). Bei der bullösen Keratopathie zeigte sich korrespondierend eine kontinuierliche Abnahme der Keratozytendichte im anteroposterioren Verlauf um 26 % von der anterioren zur posterioren Keratozytensubpopulation.

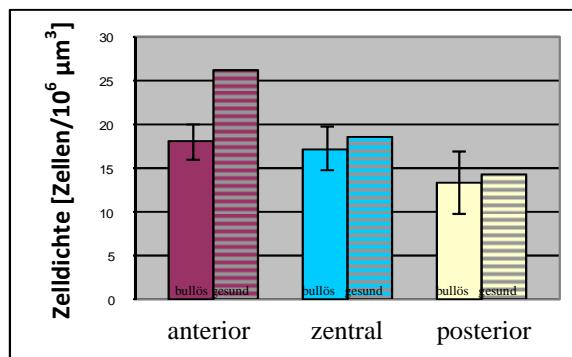


Abbildung 6-2: Darstellung der Zelldichte (Anzahl Zellen pro $10^6 \mu\text{m}^3$ Hornhaut) in der anterioren, zentralen und posterioren Stomaschicht. (Vergleich von bullöser Keratopathie = homogene Farbe und gesunder Hornhaut = schraffierte Balken).

Werden die Zelldichten in den einzelnen Stomaschichten isoliert betrachtet, so zeigt sich bezügliche der gesunden Kornea in allen Keratozytensubpopulationen eine Reduktion der Zelldichte (Abbildung 6-2). Wie auch Ljubimov et al. 1998 gezeigt haben, wird von uns bei der bullösen Keratopathie im Vergleich zur gesunden Hornhaut eine verminderte Zellzahl registriert. Die größte Reduktion der Zelldichte ist im Bereich der anterioren Keratozytensubpopulation mit 31.6 % pro $10^6 \mu\text{m}^3$ ($p < 0.001$) zu verzeichnen (Abbildung 6-2). Im zentralen Stroma der bullösen Keratopathie beträgt die Reduktion der Zelldichte 6.8 % und nahe der Descemet Membran 5.1 %. Die stärkere Abnahme der Zelldichte im anterioren Stroma bei der bullösen Keratopathie kann durch eine ausgeprägtere ödematöse Verquellung in diesem Stromabereich verursacht sein. Die Gründe hierfür könnten in den Unterschieden der interzellulären Ultrastruktur der einzelnen Stomaschichten liegen (Akhtar et al. 2001). Bei der bullösen Keratopathie konnte gezeigt werden, dass im anterioren

Stromabereich die Struktur der Kollagenlamellen am ausgeprägtesten verändert sind (Morishige et al. 2013). Dies kann ebenfalls resultierend einen Einfluss auf die Zelldichte in diesem Hornhautbereich haben.

Da in allen drei Stomaschichten nur vitale Areale untersucht wurden, kann die zelluläre Dichtereduktion infolge eines möglichen Zelluntergangs nach Trepanatentnahme ausgeschlossen werden.

Ein Erklärungsmodell für die effektive stromale Keratozytenreduktion bei bullöser Keratopathie könnte ein allmählicher Zelluntergang während der Progression dieser Erkrankung sein. Im Widerspruch zu einer Kausalität der Degeneration der Keratozyten wäre, dass in unseren Untersuchungen eingehend darauf geachtet wurde, mit der vitalen Tandem-Färbung nur vitale Korneabereiche zu erfassen.

Um mehr über die morphologischen Veränderungen der einzelnen Keratozyten aussagen zu können, haben wir ergänzend zur Zelldichte die Berechnung der Volumendichte vorgenommen. Durch die Volumendichte wird der ergänzende Faktor der Zellform mitberücksichtigt.

Bei der bullösen Keratopathie nimmt die Volumendichte, also das gesamte Zellvolumen im Vergleich zum Hornhautvolumen (Zellvolumen pro $10^6 \mu\text{m}^3$ Hornhaut), vom anterioren zum zentralen Stromabereich ab. Wenn die Volumendichte vom anterioren Stroma als Referenzwert mit 100 % definiert wird, entspricht das einer Reduktion um 14 % ($p = 0,9$) (Abbildung 6-3). Weiter zu den posterioren Korneaarealen nimmt die Volumendichte wieder zu mit einer Signifikanz von $p < 0.001$. Wenn diese Volumendichte wieder mit dem anterioren Bereich als 100 % verglichen wird, entspricht das einer Zunahme um 51 % ($p \leq 0,001$).

Die Veränderung der Volumendichte der bullösen Keratopathie im Vergleich mit der gesunden Kornea, entspricht einer Abnahme der Volumendichte im anterioren Stroma um 2.6 %. Im zentralen Stroma ist die Volumendichte im Vergleich zur gesunden Hornhaut um signifikante 8.2 % ($p = 0.002$) vermindert und bei der posterioren Keratozytensubpopulation um signifikante 12.1 % ($p = 0.022$) geringer (Abbildung 6-3).

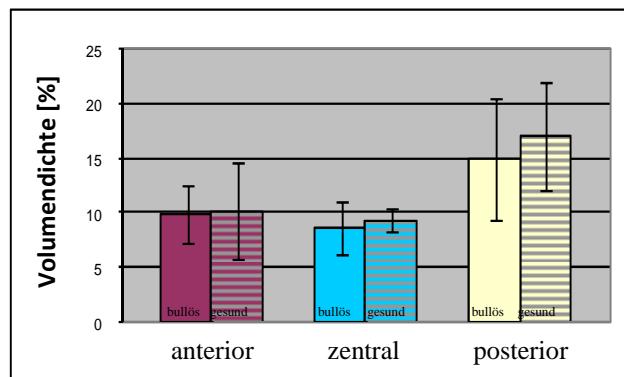


Abbildung 6-3: Darstellung der Volumendichte (gemessenes Zellvolumen pro $10^6 \mu\text{m}^3$ Hornhaut) in den drei Stromaschichten (Homogene Farbmarkierung = bullöse Keratopahtie, schraffiert = gesunde Hornhaut).

6.4.1. Zelloberfläche

Die durchschnittlich gemessenen Zelloberflächen im anterioren sowie im zentralen Stroma der bullösen Keratopathie unterscheiden sich nicht signifikant von den Keratozytenoberflächen einer gesunden Hornhaut (anterior: $p = 0.4$, zentral $p = 0.39$). Im anterioren Stromabereich wurde eine durchschnittliche Oberfläche von $6459.9 \mu\text{m}^2$ bei bullöser Keratopathie gemessen. Dies entspricht einer Flächenzunahme von 0.94 % im Vergleich zum gesunden Kollektiv (Abbildung 6-4). Bei der zentralen Keratozytensubpopulation wurde eine durchschnittliche Zelloberfläche von $4109.1 \mu\text{m}^2$ gemessen. Dies entspricht einer Oberflächenvergrößerung um 2.73 %. Im posterioren Stroma, in der Nähe der Descemetschen Membran, war die Zelloberfläche bei der bullösen Keratopathie um signifikante 58.56 % zur gesunden Hornhaut vermindert ($p < 0.001$). Diese betrug in diesem Stromabereich noch $6532.3 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 6-4). Diese ausgeprägte Reduktion der pathologisch veränderten Keratozytenoberfläche resultiert aus der Rarefizierung der netzartigen Zellulärfortsätze, die nur noch vereinzelt als dünne Zellausläufer zu dokumentieren waren (siehe Kapitel 5.3.3).

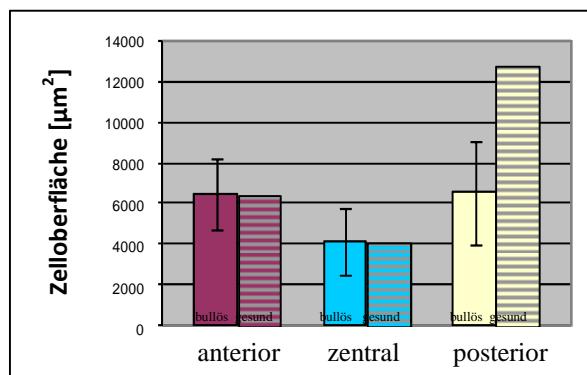


Abbildung 6-4: Darstellung der mittleren Zelloberfläche [μm^2] der drei Keratozytensubpopulationen. (Homogene Farbmarkierung = bullöse Keratopathie, schraffiert = gesunde Hornhaut)

6.4.2. Zellformfaktor

Um die morphologischen Veränderungen der Keratozyten quantitativ in Bezug zur gesunden Kornea vergleichen zu können, wurde für die deskriptive Analyse der Zellformfaktor benutzt. Dieser entspricht dem Quotienten aus der Längenachse (größte Längenausdehnung einer Zelle ohne Zellausläufer) zur senkrecht dazu verlaufenden Breitenachse.

Die signifikante Veränderung des Zellformfaktors von kranken und gesunden Zellen wurde mit dem Z-Test überprüft. Dabei konnte weder für die anteriore ($p = 0.39$) noch für die posteriore ($p = 0.3$) Keratozytensubpopulation ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Einzig im zentralen Stromabereich wurde für den Zellformfaktor eine geringe signifikante Abnahme gemessen ($p = 0.08$). Dieses Resultat zeigt kürzere Zellausmaße in diesem Bereich im Vergleich zur gesunden Hornhaut.

Die Tatsache, warum im posterioren Stroma keine signifikanten Veränderungen des Zellformfaktors gemessen wurden, obwohl dort die deutlichsten morphologischen Unterschiede erkannt wurden, lässt sich einfach erklären. Die Veränderungen zeigen annähernd proportionale Längen- und Breitenverminderung der Keratozyten. Beide Parameter nehmen bei der posterioren Keratozytensubpopulation signifikant zum gesunden Keratozytennetzwerk ab. Die Länge um 11.89 % ($p < 0.02$), die Breite um 6.58 % ($p = 0.035$).

Bei den zentralen Keratozyten verringert sich einzig die Zelllänge signifikant ($p = 0.035$). Der Zellformfaktor nimmt in Bezug zur gesunden Hornhaut schwach signifikant ab ($p = 0.08$). Im anterioren Stromabereich nimmt die Zelllänge um 3.57 % ($p = 0.29$) sowie die Zellbreite um 1.67 % ($p = 0.37$) geringfügig ab. Auch hier nimmt die Längen- sowie die Breitenausdehnung fast proportional zueinander ab. Daher bleibt der Zellformfaktor praktisch identisch.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mindestens einer der beiden Zellausmaße (Zelllänge, Zellbreite) der Keratozyten in allen Stromaschichten bei bullöser Keratopathie abnimmt. Die ausgeprägteste Größenabnahme findet mit signifikanter Reduktion in der posterioren kornealen Subpopulation statt.

6.5. Modelle zur Erklärung der Stromopathologie

- Physikalische Kräfte oder eine Hornhautdehydratation können Ursachen für unterschiedliche Zellmorphologien und -dichten sein. Diese Varianten wurden schon früher von Reim beschrieben (Reim 1992). Dies könnte ein Erklärungsmodell bei Stromaquellung (Hydratation) bei bullöser Keratopathie sein.
- Die unterschiedliche Sauerstoffkonzentration in den differenzierten Stomaschichten kann eine weitere mögliche Erklärung für die Existenz von 3 unterschiedlichen Keratozytensubpopulationen sein. Diese drei Stromabereiche besitzen unterschiedliche Zelldichten und unterschiedliche metabolische Aktivitäten. Untersuchungen haben gezeigt, dass die markante Reduktion der mitochondrialen Volumendichte mit der kornealen Dicke und Distanz von der Sauerstoffquelle korreliert (Stockwell 1991). Untersuchungen des Sauerstoffgehaltes in der Kornea konnten zeigen, dass bei der bullösen Keratopathie der geringste Sauerstoffgehalt bei verschiedenen Hornhauterkrankungen zu messen war (Morris, Ruben 1981). Das könnte ein weiteres Indiz für eine O₂-bedingte pathologische Veränderung der Keratozytenmorphologie sein. Auch neuere Untersuchungen belegen den Sauerstoffgradienten beim Hornhautödem (Leung et al. 2011).
- Ein anderer Ansatzpunkt der morphologischen Veränderungen könnte die Einwirkung der aktivierten Makrophagen oder Myofibroblasten auf das Keratozytennetzwerk sein. Bei der bullösen Keratopathie konnten Kenney und Mitarbeiter (2001) verstärkt CD68-positive Zellen im Stroma und den subepithelialen Schichten nachweisen. Diese Tatsache könnte die morphologischen Veränderungen im Stroma erklären. Bei der bullösen Keratopathie konnten neben den Myofibroblasten im anterioren Stroma Fibroblasten nachgewiesen werden (Morishige et al. 2012, Morishige et al. 2013).

Das Glykoprotein CD14, welches sich vor allem auf Makrophagen, Monozyten und Langerhanszellen exprimiert, ist bei der bullösen Keratopathie positiv (Kenney et al. 2001). Diese signifikante Ansammlung von Entzündungszellen könnte ebenfalls

ein Faktor für strukturelle Veränderungen der Keratozyten und des Netzwerkes sein. Dies erklärt jedoch nicht, warum die morphologischen Veränderungen in unserer Studie der bullösen Keratopathie am ausgeprägtesten bei der posterioren Keratozytensubpopulation sind. Auch andere Untersuchungen konnten bei der bullösen Keratopathie morphologische Veränderungen vor allem im anterioren und posterioren Stromabereich feststellen (Morishige et al. 2012). Diese resultierten allerdings durch die veränderten Kollagenlamellen.

- Akhtar und Mitarbeiter (2001) untersuchten die ultrastrukturelle Morphologie und Expression von bestimmten Faktoren bei der bullösen Keratopathie. Im Stroma fanden sie einen vergrößerten interfibrillären Kollagenraum. Dieser hatte ein sehr feines Netzwerk von Filamenten und anormal großen Proteoglykanen, dessen Hemidesmosomen fehlten. Die Descemetsche Membran wies Räume mit kleinen Filamenten auf. In der posterioren Kollagenschicht waren zahlreiche Mikrofilamente mit weitlumigen Kollagenfasern vorhanden. Große Mengen von anormal kleinen Proteoglykanen wurden im zentralen sowie im posterioren Stroma sowie an der endothelialen Seite der posterioren Kollagenschicht registriert. All diese von Akhtar und Mitarbeitern publizierten Ergebnisse könnten den Rückschluss zulassen, dass die von uns dokumentierten reduzierten Volumen- und Zelldichten bei bullöser Keratopathie aufgrund der Volumenzunahme der Interzellulärsubstanz zustande kommen.
- Reine et al. (1998) beschrieben die Zelldichte der einzelnen Stromaschichten sowie des Endothels und Epithels bei gesunder Kornea in Abhängigkeit vom Alter. Møller-Pedersen (1997) und Rao et al. (2000) bestätigten, dass bei älteren Patienten die endothiale Zelldichte signifikant abnahm. In den übrigen Hornhautschichten war ebenfalls eine Zellreduktion vorhanden, jedoch nicht signifikant (Raine et al. 1998). Eine endothiale Zelldichtereduktion könnte eine Prädisposition zur pathologischen Veränderung des primär subendothelialen Keratozytennetzwerkes sein. In Bezug auf die Zelldichte war in unserer wissenschaftlichen Studie keine Prädominanz bei der Reduktion der posterioren Keratozytensubpopulation zu messen. Schrems-Hoesl und Mitarbeiter (2013) zeigten ebenfalls eine Reduktion der Endo-

thelzellen und einen signifikanten Anstieg der Keratozytendichte im posterioren Stromabereich.

- In unserer Arbeit konnten wir bei der bullösen Keratopathie eine signifikante Reduktion der Zelldichte im anterioren Stroma nachweisen. Wilson und Hong (2000) beschrieben, dass die Bowmansche Membran die Zytokin verursachten Interaktionen wie Chemotaxis und Apoptose beeinflusst (Wilson und Hong 2000). Dadurch könnte dieser Membran ein Einfluss auf die darunter liegenden stromalen Schichten zugeschrieben werden. Diese Hypothese könnte als Erklärung für unsere ausgeprägte Reduktion der Zelldichte im anterioren Stroma bei bullöser Keratopathie dienen. Diese Theorie wird durch die Untersuchungen von Wilson (1996, 1998) unterstrichen. Er wies die Defekte der Bowmanschen Membran bei fortgeschrittener bullöser Keratopathie sowie bei Fuchs'sche Endotheldystrophie (Wilson 1988) nach.

Diese wissenschaftlichen Fakten bieten den Ansatz für unterschiedliche Erklärungsmodelle der Keratozytenpathologie bei bullöser Keratopathie. Vermutlich handelt es sich bei dieser Pathogenese um einen multifaktoriellen Prozess. Um letztendlich schlüssige kausale Zusammenhänge aufzeigen zu können, noch weitere detaillierte Erforschungen notwendig wären.

6.6. Mögliche Einflüsse verschiedener Faktoren auf die experimentelle Untersuchung

Das Trepanat im Kulturmedium zeigt nach kurzer Zeit ödematöse Verquellungen. Zur Vermeidung dieser Veränderung wurde die Hornhaut innerhalb von 24 Stunden postoperativ untersucht. Zusätzlich wurden die Präparate mit Dextran entquollen.

Als qualitative Vitalitätskontrolle der Keratozyten wurde die Fluoreszenzfärbung mit dem LIVE/DEAD®-Assay angewendet. Diese Methode erlaubte es, Gewebeareale mit avitalen Zellen von den Messungen auszuschließen.

Die Zellen wurden mit dem konfokalen Mikroskop untersucht. Mit dieser Wahl konnte die Qualität der Aufnahmen optimiert und das Streulicht minimiert werden.

Die Grauwertmessungen beeinflussen die Berechnungen, welche mit den Programmen Intervision® und Voxel Math® durchgeführt werden. Durch die subjektive Einstellung der Grauwerte können Abweichungen bei den gemessenen Daten entstehen. Zur Vermeidung solcher Unschärfen in den Messdaten wurde die Datenerhebung mit der gleichen Einstellung durchgeführt.

6.7. Überlegungen zur klinischen Anwendung der konfokalen Laser

Scanning Fluoreszenz Mikroskopie in der Ophthalmologie

Zur Zeit wird in der klinischen Ophthalmologie *in vivo* mit dem konfokalen Slit Scanning Mikroskop untersucht. Damit können nur die Zellkerne, nicht jedoch die Ausläufer mit den feinsten Zellulärfortsätzen oder die interzelluläre Matrix dargestellt werden. Außerdem ist eine Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Keratozyten nicht möglich.

Um das konfokale Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskop am Patienten einsetzen zu können, müsste zuerst ein geeigneter, atoxischer Fluoreszenzfarbstoff entwickelt und für die klinische Anwendung freigegeben werden. Zur Zeit ist gemäß unserem Erkenntnisstand kein *in vivo* Farbstoff zur Vitalitätsprüfung der Keratozyten oder der (inter-) zellulären Strukturdarstellung bekannt. Auch mit dem *in vivo* eingesetzten konfokalen Laser Scanning Mikroskop (HRT/RCM) kann das Keratozytennetzwerk mit den feinen Zellulärfortsätzen nicht detailliert dargestellt werden. Dieses wird vor allem für die topografische Darstellung des hinteren Augenabschnittes mit dem Sehnervenkopf eingesetzt.

Ein Screeningverfahren zur Früherkennung struktureller oder zellulärer Veränderungen bei der bullösen Keratopathie ist in Abhängigkeit einer herabgesetzten kritischen Endothelzellzahl als sinnvoll zu erachten. Dadurch könnten weitere wissenschaftliche klinische Erkenntnisse gewonnen werden. Diese könnten bei zukünftig erhofften Fortschritten auch auf molekularer Ebene eine therapeutische Intervention zum Sistieren oder gegebenenfalls einer Regression führen.

Auch bei anderen Hornhauterkrankungen oder kornealen Wundheilungsprozessen könnte die Erforschung der Pathogenese auf zellulärer Ebene mittels einer Untersuchung mit dem konfokalen Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskop sehr nützlich sein. Beispielsweise könnten damit in den Bereichen der refraktiven Chirurgie oder der immunologischen Antwort bei Zustand nach Keratoplastik Fortschritte erzielt werden. Frueh und Mitarbeiter (1998) dokumentierten nach photorefraktiver Chirurgie mittels konfokaler Mikroskopie einen signifikanten Zelldichteverlust im anterioren Stroma. McDermott (1993) untersuchte die Interaktion von Empfänger- und von Spenderkeratozyten bei Zustand nach perforierender Keratoplastik.

Fortschritte im Bereich der Keratoplastik mittels konfokaler Mikroskopie wären wünschenswert. Aktuell kann nach einer Korneatransplantation bis zu einem Jahr vergehen, bis Spenderkeratozyten durch die Empfängerkeratozyten ersetzt werden (Geerards, Kok 1993). Møller-Pedersen und Mitarbeiter 1994 untersuchten die Keratozytendichte bei Spenderhornhäuten und fand heraus, dass die Qualität und die Dichte der transplantierten Keratozyten von großer Bedeutung sind.

Die konfokale in vivo Mikroskopie könnte bei Existenz von geeigneten Farbstoffen mittels ihrer hochauflösenden optischen Schnitte die Möglichkeiten eröffnen, die bullöse Keratopathie oder andere Hornhauterkrankungen in ihrer graduellen Pathogenes zu beobachten. Eine Früherkennung pathologischer Veränderungen vor Ausprägung klinischer Symptomatik könnte damit gegebenenfalls erkannt werden. Auch andere korneale Erkrankungen, welche mit einer morphologischen Veränderung der Keratozyten und des entsprechenden Netzwerkes einhergehen, könnten mit der in vivo Erforschung im Frühstadium erkannt werden.

7. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, die Veränderungen der Keratozytensubpopulationen humaner Korneatrepanate bei bullöser Keratopathie morphologisch und morphometrisch zu analysieren.

Um sicher zu sein, dass nur vitale Keratozytenareale untersucht werden, wurden die Hornhautrepanate mit dem LIVE/DEAD®-Kit (Poole et al. 1993) angefärbt. Die vitalen Gewebebereiche konnten anschließend mit dem konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop untersucht und als digitale Datensätze abgespeichert werden.

Die Datensätze der Keratozyten und des Keratozytennetzwerkes wurden dreidimensional rekonstruiert. Damit konnte die Morphologie der drei Zellsubpopulationen beurteilt werden.

Die weiterführende quantitative Analyse der Keratozyten sowie des Netzwerkes bei bullöser Keratopathie wurde mit den Untersuchungsergebnissen von gesunden humanen Korneae verglichen. Die Daten der gesunden Hornhautzellen wurden von einer anderen Arbeitsgruppe (Somodi, Guthoff 1995, Hahnel et al. 1997, Hahnel et al. 2000) vorab untersucht und publiziert.

Bei der bullösen Keratopathie sind drei Keratozytensubpopulationen erkennbar, wobei die wesentlichen morphologischen Unterschiede zur gesunden Kornea bei der Keratozytensubpopulationen im posterioren Stroma registriert werden konnte. Es zeigte sich eine ausgeprägte Rarefizierung der Zellularfortsätze.

Mit einem hohen Signifikanzniveau ($p \leq 0.001$) zeigte sich eine deutliche Abnahme des mittleren Zellvolumens bei der posterioren Keratozytensubpopulation. In diesem Stroma-bereich zeigte sich ebenfalls eine signifikante Abnahme der Volumendichte sowie der Zelloberfläche.

Im anterioren Stroma konnte eine signifikante Verminderung der Zelldichte nachgewiesen werden.

8. Literaturverzeichnis

- Akhtar S, Bron AJ, Hawksworth NR, Bonshek RE, Meek KM. Ultrastructural morphology and expression of proteoglycans, beta1g-h3, tenascin-C, fibrillin-1 and fibronectin in bullous keratopathy. *Br J Ophthalmol.* 2001 Jun;85(6):720-731
- Assouline M, Chew SJ, Thompson HW, Beuerman R. Effect of growth factors on collagen lattice contraction by human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33(5):1742-1755
- Becker HH, Dorn G, Hahnel C, Weiss DG, Guthoff R. Real-time images of living human cornea in bullous keratopathy: a study using confocal microscopy. *IOVS.* 1999;40(4):620 (Abstract)
- Becker HH, Somodi S, Hahnel C, Weiss DG, Guthoff R. Eine dreidimensionale Studie des Keratozyten-Netzwerkes mittels konfokaler Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskopie. *Klin Mbl Augenheilk.* 1998; 213(Suppl 4):1-2
- Böhnke M, Masters BR. Confocal microscopy of the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 1999 Sep;18(5):553-628
- Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(1):69-94
- Brunette I, Sherknies D, Terry MA, Chagnon M, Bourges JL, Meunier J. 3-D characterization of the corneal shape in Fuchs dystrophy and pseudophakic keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(1):206-214.10.1167/iovs.09-4101
- Cavanagh HD, El-Agha MS, Petroll WM, Jester JV. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea.* 2000 Sep;19(5):712-722
- Chiou A G-Y, Kaufman SC, Beuerman RW, Ohta T, Soliman H, Kaufman HE. Confocal microscopy in cornea guttata and Fuchs' endothelial dystrophy. *Br J Ophthalmol.* 1999;83:185-189
- Corbett MC, Prydal JI, Verma S, Oliver KM, Pande M, Marshall J. An in vivo investigation of the structures responsible for corneal haze after photorefractive keratectomy and their effect on visual function. *Ophthalmology.* 1996;110(3):1366-1380
- Dorn G, Becker HH, Guthoff R. Pathologische Keratozytenpopulation des posterioren Stromas bei bullöser Keratopathie. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 2000;217(Suppl 8):1-15
- Dorn G, Becker HH, Guthoff R. Subpopulationen des Keratozytennetzwerkes bei bullöser Keratopathie. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 2000;217(Suppl 2):1-16
- Dorn G, Becker HH, Hahnel C, Weiss DG, Guthoff R. Morphometry of vital keratocytes from bullous keratopathy and healthy cornea. A study using confocal scanning fluorescence microscopy. *EJCB.* 1999; 78(Suppl 49):95
- Fischbarg J. On the mechanism of fluid transport across corneal endothelium and epithelia in general. *J Exp Zoolog Part A Comp Exp Biol.* 2003 Nov;300(1):30-40
- Frueh BE, Cadez R, Böhnke M. In vivo confocal microscopy after photorefractive keratectomy in humans. *Arch Ophthalmol.* 1998;116:1425-1431
- Geerards AJ, Kok JH. Extreme temporary thinning after keratoplasty of organcultured corneas. *Cornea.* 1993 Jul;12(4):277-281.

Gordon YJ, Mann RK, Mah TS, Gorin MB. Fluorescein-potentiated argon laser therapy improves symptoms and appearance of corneal neovascularization. *Cornea*. 2002 Nov;21(8):770-773

Hahnel C, Somodi S, Slowik C, Richter A, Weiss DG, Guthoff R. Dreidimensionale Rekonstruktion des humanen Keratozytennetzwerkes nach konfokaler Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie (CLSM). *Ophthalmologe*. 1997a; 94(Suppl 1):13

Hahnel C, Somodi S, Slowik C, Richter A, Weiss DG, Guthoff R. Visualization of the keratocyte network of the human cornea by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Pflügers Arch*. 1997b;33(6):381

Hahnel C, Somodi S, Slowik C, Weiss DG, Guthoff R. Organisation of the keratocyte network of the human cornea in keratoconus and bullous keratopathy. *Europ J Cell Biol*. 1997c;43:279

Hahnel C, Somodi S, Slowik C, Weiss DG, Guthoff RF. Fluorescence microscopy and three-dimensional imaging of the porcine keratocyte network. *Graefes Arch*. 1997d;235:773-779

Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, Guthoff R. The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea*. 2000 Mar;19(2):185-193

Herman B. *Fluorescence Microscopy*. 2. Auflage, *BIOS Scientific Publishers*. 1998

Holló Z, Homolya L, Davis CW, Sarkadi B. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1191:384-388

Jain S, Azar DT. Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol*. 1994;5:3-12

Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res*. 2003 May;22(3):359-389

Kao WW, Liu CY. Roles of lumican and keratocan on corneal transparency. *Glycoconj J*. 2002;19(4-5):275-285

Kaufman HE, Barron BA, Mc Donald MB: The Cornea (2. Auflage). *Butterworth-Heinemann* 1998, p678 - 684

Kaufman HE, Mc Donald MB, Barron BA Wilson SE. Principles of corneal and refractive surgery. In: Wright KW, ed. *Color atlas of ophthalmic surgery. Corneal and refractive surgery*. *JB Lippincott Company*-Philadelphia: 1992: 1

Kenney MC, Chwa M, Lin B, Huang GH, Ljubimov AV, Brown DJ. Identification of cell types in human diseased corneas. *Cornea*. 2001;20(3): 309-316

KlyceSD, Beuerman RW. Structure and function of the cornea. In: Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB, Waltman SR, eds. *The Cornea*. *Churchill-Livingstone* New York 1988:3-54

Kühnel W, Mendoza AS. Morphologie der Cornea. *Fortschr Ophthalmol*. 1987;84:217-224

Leung BK, Bonanno JA, Radke CJ. Oxygen-deficient metabolism and corneal edema. *Prog Retina Eye Res*. 2011 Nov;30(6):471-492. Epub 2011 Jul 26

Li HF, Petroll WM, Møller-Pedersen T, Maurer JK, Cavanagh HD, Jester JV. Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Curr Eye Res*. 1997;16:214-221

Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Couchman JR, Wu RR, Ninomiya Y, Sado Y, Maguen E, Nesburn AB, Kenney MC. Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996 May;37(6):997-1007

Ljubimov AV: Increased expression of fibrillin-1 in human corneas with bullous keratopathy. *Cornea*. 1998; 17:309-314

Masters BR, Böhnke M. Three-dimensional confocal microscopy of the human cornea in vivo. *Ophthalmic Res*. 2001;33:125-135

Masters BR, Thaer AA. Real-time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea. *Appl Optic*. 1994;33:695-701

Masters BR. Three-dimensional confocal microscopy of the living in situ rabbit cornea. *Optics Express*. 1998;3:351-355.

McDermott ML. Stromal wound healing. In: Brightbill FS. Corneal Surgery. Theory, Technique, and Tissue. Mosby St. Louis 1993:44-51

Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Aug;36(8):1037-1046

Møller-Pedersen T, Ehlers N. A three-dimensional study of the human corneal keratocyte density. *Curr Eye Res*. 1995;14:459-464

Møller-Pedersen T, Ledet T, Ehlers N. The keratocyte density of human donor corneas. *Curr Eye Res*. 1994;13:163-169

Møller-Pedersen T, Vogel M, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Quantification of stromal thinning, epithelial thickness, and corneal haze after photorefractive keratectomy using in vivo confocal microscopy. *Ophthalmology*. 1997;104:360-368

Møller-Pedersen T. A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging. *Cornea*. 1997;16:333-338

Møller-Pedersen T. Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Exp Eye Res*. 2004 Mar;78(3):553-560

Morishige N, Yamada N, Morita Y, Kimura K, Sonoda KH. Persistence of structural changes at the anterior cornea in bullous keratopathy patients after endothelial keratoplasty. *PLoS* 2013 Sep 16;8(9):e74279. doi: 10.1371/journal.pone.0074279

Morishige N, Yamada N, Zhang X, Morita Y, Yamada N, Kimura K, Takahara A, Sonoda KH. Abnormalities of stromal structure in the bullous keratopathy cornea identified by second harmonic generation imaging microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012 Jul 27;53(8):4998-5003. doi: 10.1167/iovs.12-10214

Morris J, Ruben M. Clinical aspects of the measurement of oxygen flux into the cornea. *Br J Ophthalmol*. 1981 Feb;65(2):97-100

Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea*. 1998;17(5):485-492

Naumann GO. Pathologie des Auges 2. Auflage Springer Berlin 1996:635-639

Neubauer L. Endothelioskopie bei Hornhautdegeneration. In: Lund OE, Waubke TN. Degenerative Erkrankungen des Auges. Enke, Stuttgart: (Heft 97) 1983:52-59

Nishida T, Yasumoto K, Otori T, Desaki J. The network structure of corneal fibroblasts in the rat as revealed by scanning electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29:1887-1890

Patel SV, McLaren JW, Camp JJ, Nelson LR, Bourne WM. Automated quantification of the keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Feb;40(2):320-326

Poole CA, Brookes NH, Clover GM. Confocal imaging of the keratocyte network in porcine cornea using the fixable vital dye 5-chloromethylfluorescein diacetate. *Curr Eye Res.* 1996 Feb;15(2):165-174

Poole CA, Brookes NH, Cover GM. Keratocyte networks visualised in the living cornea using vital dyes. *J Cell Sci.* 1993;106:685-691

Prydal JI, Kerr Muir MG, Dilly PN, Corbett MC, Verma S, Marshall J. Confocal microscopy with digital image analysis for measurement of keratocyte morphology in conscious humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36 (suppl):22

Prydal JI, Franc F, Dilly PN, Kerr Muir MG, Corbett MC, Marshall J. Keratocyte density and size in conscious humans by digital image analysis of confocal images. *Eye (Lond).* 1998;12 (Pt 3a):337-342

Rao SK, Ranjan Sen P, Fogla R, Gangadharan S, Padmanabhan P, Badrinath SS. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Indian eyes. *Cornea.* 2000;19(6):820-823

Rauz S, Walker EA, Murray PI, Stewart PM. Expression and distribution of the serum and glucocorticoid regulated kinase and the epithelial sodium channel subunits in the human cornea. *Exp Eye Res.* 2003;77(1): 101-108

Reim M. Chirurgische Anatomie, Physiologie, Biochemie sowie Fragen der Inlay-Technik. *Ophthalmol.* 1992;89:109-118

Riley MV, Peters MI. The localization of the anion-sensitive ATPase activity in corneal endothelium. *Biochim Biophys Acta.* 1981 Jun 22;644(2):251-256

Scharenberg K. The cells and nerves of the human cornea. *Am J Ophthalmol.* 1955;40:268-279

Schrems-Hoesl LM, Schrems WA, Cruzat A, Shahatit BM, Bayhan HA, Jurkunas UV, Hamrah P. Cellular and subbasal nerve alterations in early stage Fuchs'endothelial corneal dystrophy: an in vivo confocal microscopy study. *Eye (Lond)* 2013; 27(1):42-49. doi: 10.1038/eye.2012.220. Epub 2012 Nov 16

Sherif Z, Pleyer U, Rieck P, Hartmann C. Konfokale Mikroskopie bei Hornhautdystrophien. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1999;214:12-21

Somodi S, Guthoff R. Darstellung der Keratozyten in der humanen Cornea mittels Fluoreszenzmikroskopie. *Ophthalmologe.* 1995;92(4):452-457

Somodi S, Hahnel C, Slowik C, Richter A, Guthoff R, Weiss DG. Confocal in vivo microscopy, confocal laser scanning and fluorescence microscopy in bullous keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997a;38(4): 1086

Somodi S, Hahnel C, Slowik C, Richter A, Weiss DG, Guthoff R. Confocal in vivo microscopy and confocal laser – scanning fluorescence microscopy in keratoconus. *German J Ophthalmol.* 1997b;5(6):518-525

Somodi S, Slowik C, Guthoff R. Die Keratozyten der humanen und der Schweinehornhaut – Darstellung mittels konventioneller und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. *Klein Mbl Augenheilk.* 1995;207(6):405

Spencer WH. Ophthalmic Pathology. An Atlas and Textbook. [4. Auflage] Philadelphia: *Saunders* 1996 (Band I): 229-238

Stave J, Slowik C, Somodi S, Hahnel C, Gümmer G, Guthoff R. Keratozytendichte der In-vivo-Kornea. Automatische Messung mit einem modifizierten konfokalen Mikroskop MICROPHTHAL®. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 1998 Jul;213(1):38-44

Stockwell RA. Morphometry of cytoplasmic components of mammalian articular chondrocytes and corneal keratocytes: species and zonal variations of mitochondria in relation to nutrition. *J Anat*. 1991;175:251-261

Sverdlick J. Study of keratocytes by means of del Rio Hortega's method of silver impregnation. *Acta. XVII Int Cong Ophthalmol*. 1954;3:1887

Takatori SC, de la Jara PL, Holden B, Ehrmann K, Ho A, Radke CJ. In vivo oxygen uptake into the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Sept 19;53(10):6331-6337

Tomii S, Kinoshita S. Observations of human corneal epithelium by tandem scanning confocal microscope. *Scanning*. 1994;16:305-306

Wilson SE, Bourne WM. Fuchs' dystrophy. *Cornea*. 1988;7:2-18

Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res*. 1996;62:325-338

Wilson SE, Hong JW. Bowman's Layer Structure and Function. Critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea*. 2000;19(4):417-420

Wilson SE, Kim WJ. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:220-226

9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1 Schematische Darstellung des physiologischen Gleichgewichtes der Kornea.
- Abbildung 1-2 Pathohistologischer Schnitt einer bullösen Keratopathie mit ödematöser Verquellung des Stomas.
- Abbildung 1-3 Darstellung eines Endotheldefektes mit konsekutiver ödematöser Verquellung des kornealen Stomas bei bullöser Keratopathie.
- Abbildung 4-1 Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Calcein und Homodimer-1.
- Abbildung 4-2 Energiezustandsänderung der Fluorochrome bei der Fluoreszenz.
- Abbildung 4-3 Konfokales Laserscanning-Fluoreszenz-Mikroskop Diaphot 300 Odyssey XL.
- Abbildung 4-4 Schematische Darstellung des Strahlenganges des konfokalen Mikroskops.
- Abbildung 4-5 Dreidimensionale Darstellung mit Hilfe der Software Voxel-View[®].
- Abbildung 4-6 Graphische Darstellung der Tilted-View-Technik zur dreidimensionalen Rekonstruktion.
- Abbildung 5-1 Darstellung von vitalen und avitalen Keratozyten.
- Abbildung 5-2 Vitale Zellen im anterioren Keratozytennetzwerk.
- Abbildung 5-3 Vitale Keratozytensubpopulation im zentralen Stroma.
- Abbildung 5-4 Vitale Zellen im posterioren Keratozytennetzwerk (40x Vergrößerung).
- Abbildung 5-5 Vitale Zellen im posterioren Keratozytennetzwerk (20x Vergrößerung).
- Abbildung 5-6 Keratozytennetzwerk im anterioren Stroma.
- Abbildung 5-7 Graphische Darstellung eines Keratozyten im anterioren Stroma.
- Abbildung 5-8 Keratozytennetzwerk im zentralen Stromabereich.
- Abbildung 5-9 Graphische Darstellung eines Keratozyten des zentralen Stromabereiches.
- Abbildung 5-10 Keratozytensubpopulation im posterioren Stroma.

- Abbildung 5-11 Posteriore Keratozytensubpopulation im posterioren Stroma.
- Abbildung 5-12 Graphische Darstellung eines einzelnen Keratozyten im posterioren Stroma.
- Abbildung 5-13 Mittlere Zelllänge der drei Keratozytensubpopulationen.
- Abbildung 5-14 Mittlere Zellbreite in den drei Stomaschichten.
- Abbildung 5-15 Mittlerer Zellformfaktor der Keratozytensubpopulationen.
- Abbildung 5-16 Mittleres Zellvolumen in den drei Stomaschichten.
- Abbildung 5-17 Prozentuales Zellvolumen pro $10^6 \mu\text{m}^3$ Hornhaut in den drei Stomaschichten.
- Abbildung 5-18 Mittlere Zelloberfläche in den drei Keratozytensubpopulationen.
- Abbildung 5-19 Mittlere Zelldichte in den drei Stomaschichten.
- Abbildung 5-20 Vergleich der Zelldichte mit der Volumendichte in den drei Stomaschichten.
- Abbildung 6-1 Vergleich der Zellvoluminavon gesund versus bullös.
- Abbildung 6-2 Vergleich der Zelldichte von gesund versus bullös.
- Abbildung 6-3 Vergleich der Volumendichte von gesund versus bullös.
- Abbildung 6-4 Vergleich der Zelloberfläche von gesund versus bullös.

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 5-1	Unterscheidung der Längen- und Breitenausdehnung bei bullöser Keratopathie und Fuchs'scher Endotheldystrophie.
Tabelle 8-1	Gruppenstatistik anteriores Stroma
Tabelle 8-2	Gruppenstatistik zentrales Stroma
Tabelle 8-3	Gruppenstatistik posteriores Stroma
Tabelle 11-1	Statistischer Mittelwert der Zelllänge einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den 3 Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral, posterior).
Tabelle 11-2	Signifikanztest der Zelllänge bei einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den 3 Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral, posterior).
Tabelle 11-3	Statistischer Mittelwert der Zellbreite einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den 3 Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral, posterior).
Tabelle 11-4	Signifikanztest der Zellbreite bei einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den 3 Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral und posterior).
Tabelle 11-5	Statistischer Mittelwert des Zellformfaktors „Shape“ einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den 3 Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral, posterior).
Tabelle 11-6	Signifikanztest des Zellformfaktors „Shape“ bei einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den drei Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral und posterior).
Tabelle 11-7	Statistischer Mittelwert einer Stichprobe von der Volumen, Oberfläche, Volumendichte [%] und Zelldichte in den drei Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral, posterior).
Tabelle 11-8	Signifikanztest von Volumen, Oberfläche, Volumendichte [%] und Zelldichte [%] in den drei Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral und posterior).

11. Anhang

11.1. Notation

In diesem Dokument wird die folgende Notation verwendet:

- L_1 = Objektivlinse
- P_1 = Stromaebene des Hornhautpräparates
- S_0 = energetischer Grundzustand
- S_1 = energieärmerer Zustand
- S_1' = angeregtes Energie-Niveau
- T_0 = Zeitpunkt der ersten Messung
- T_i = Zeitpunkt der i -ten Kontrollmessung
- ΔT_i = Zeit zwischen der ersten und der i -ten Messung
- \bar{x} = Mittelwert
- σ = Standardabweichung
- p = Signifikanzniveau
- n = Anzahl Messungen

11.2. Abkürzungen

- 2D = zweidimensional
- 3D = dreidimensional
- Calcein-AM = Calcein Acetoxymethylester
- DNA = Desoxyribonukleinsäure
- D-PBS = Dulbecco's phosphate-buffered saline
- FCS = Foetales Kälberserum
- MEM = Minimal Essential Medium
- TSCM = Tandem Scanning Confocal Microscopy
- SSCM = Scanning Slit Confocal Microscopy

11.3. Statistische Berechnungen

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
BuLäAnt	45	21.8443	2.83161	.42211
FuLäAnt	38	21.0235	2.41460	.39170
BuLäZent	118	25.9740	3.27702	.30167
FuLäZent	26	25.2160	3.27558	.64239
BulläPost	167	27.5895	4.74741	.36737
FuLäPost	125	26.2566	3.89360	.34825

Tabelle 11-1 Statistischer Mittelwert der Zelllänge einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den 3 Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral, posterior).

	Testwert = 0					
	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
					Untere	Obere
BuLäAnt	51.750	44	.000	21.84431	20.9936	22.6950
FuLäAnt	53.673	37	.000	21.02353	20.2299	21.8172
BuLäZent	86.100	117	.000	25.97402	25.3766	26.5715
FuLäZent	39.253	25	.000	25.21600	23.8930	26.5390
BulläPost	75.101	166	.000	27.58946	26.8641	28.3148
FuLäPost	75.395	124	.000	26.25662	25.5673	26.9459

Tabelle 11-2 Signifikanztest der Zelllänge bei einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den 3 Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral, posterior).

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
BulBreiPost	167	12.3255	2.14883	.16628
FuBreiPost	125	11.9625	2.04174	.18262
BuBreiZent	118	11.9537	2.46790	.22719
FuBreiZent	26	11.7908	2.00656	.39352
BuBreiAnt	45	10.9296	1.73402	.25849
FuBreiAnt	38	11.0313	1.70198	.27610

Tabelle 11-3 Statistischer Mittelwert der Zellbreite einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den 3 Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral, posterior).

	Testwert = 0					
	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
					Untere	Obere
BulBreiPost	74.124	166	.000	12.32548	11.9972	12.6538
FuBreiPost	65.505	124	.000	11.96250	11.6011	12.3240
BuBreiZent	52.616	117	.000	11.95368	11.5037	12.4036
FuBreiZent	29.962	25	.000	11.79081	10.9803	12.6013
BuBreiAnt	42.282	44	.000	10.92956	10.4086	11.4505
FuBreiAnt	39.954	37	.000	11.03134	10.4719	11.5908

Tabelle 11-4 Signifikanztest der Zellbreite bei einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den 3 Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral und posterior).

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
BuShapePos	167	2.3216	.60554	.04686
FuShapePost	125	2.2458	.54670	.04890
BuShapeZent	118	2.3580	.73502	.06766
FuShapeZent	26	2.4620	.95976	.18822
BuShapeAnt	45	2.0913	.55928	.08337
FuShapeAnt	38	2.0835	.67246	.10909

Tabelle 11-5 Statistischer Mittelwert des Zellformfaktors „Shape“ einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den 3 Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral, posterior).

	Testwert = 0					
	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
					Untere	Obere
BuShapePos	49.546	166	.000	2.32161	2.2291	2.4141
FuShapePost	45.928	124	.000	2.24579	2.1490	2.3426
BuShapeZent	34.849	117	.000	2.35804	2.2240	2.4920
FuShapeZent	13.080	25	.000	2.46195	2.0743	2.8496
BuShapeAnt	25.084	44	.000	2.09131	1.9233	2.2593
FuShapeAnt	19.099	37	.000	2.08350	1.8625	2.3045

Tabelle 11-6 Signifikanztest des Zellformfaktors „Shape“ bei einer Stichprobe von „bullös“ und bei Fuchs'scher Endotheldystrophie in den drei Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral und posterior).

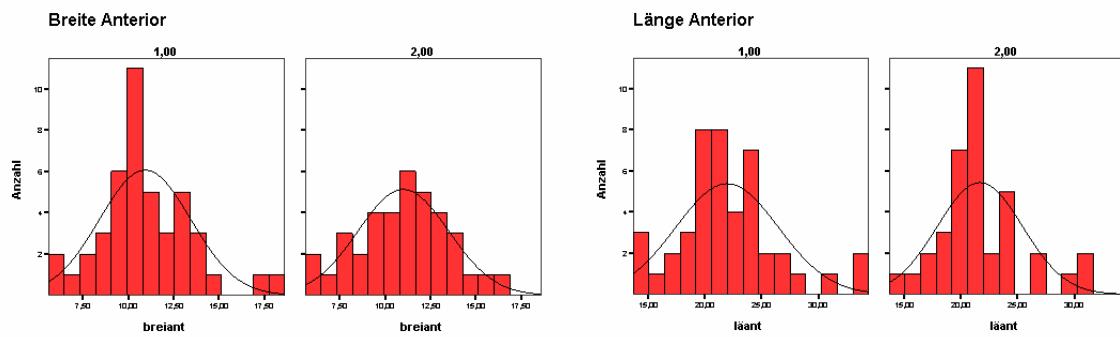
	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
VolAnter	191	5503.4232	1330.08257	96.24140
VolZentr	260	5021.0104	1447.02945	89.74096
VolPost	277	11670.0819	3521.09409	211.56204
OberflAnt	191	6460.2206	1717.02729	124.23973
OberflZent	260	4109.0192	1641.09209	101.77621
OberflPost	277	6532.1031	2506.00913	150.57150
VolDichteAnt	191	9.9017	2.60953	.18882
VolDichteZent	260	8.6057	2.40609	.14922
VolDichtePost	277	15.0163	5.60031	.33649
ZelldichteAnt	191	18.1026	2.41109	.17446
ZelldichteZent	260	17.2050	2.50897	.15560
ZelldichtePost	277	13.4121	3.72767	22397

Tabelle 11-7 Statistischer Mittelwert einer Stichprobe von der Volumen, Oberfläche, Volumendichte [%] und Zelldichte [%] in den drei Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral, posterior).

	Testwert = 0					
	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Diffe-	95% Konfidenzintervall der	
				renz	Untere	Obere
VolAnter	57.184	190	.000	5503.42319	5313.5843	5693.2621
VolZentr	55.950	259	.000	5021.01038	4844.2956	5197.7252
VolPost	55.162	276	.000	11670.08188	11253.6016	12086.5621
OberflAnt	51.998	190	.000	6460.22063	6215.1543	6705.2870
OberflZent	40.373	259	.000	4109.01919	3908.6050	4309.4334
OberflPost	43.382	276	.000	6532.10314	6235.6886	6828.5176
VolDichteAnt	52.440	190	.000	9.90173	9.5293	10.2742
VolDichteZent	57.672	259	.000	8.60573	8.3119	8.8996
VolDichtePost	44.626	276	.000	15.01628	14.3539	15.6787
ZelldichteAnt	103.763	190	.000	18.10257	17.7584	18.4467
ZelldichteZent	110.572	259	.000	17.20496	16.8986	17.5114
ZelldichtePost	59.883	276	.000	13.41213	12.9712	13.8530

Tabelle 11-8 Signifikanztest von Volumen, Oberfläche, Volumendichte [%] und Zelldichte [%] in den drei Keratozytensubpopulationen (anterior, zentral und posterior).

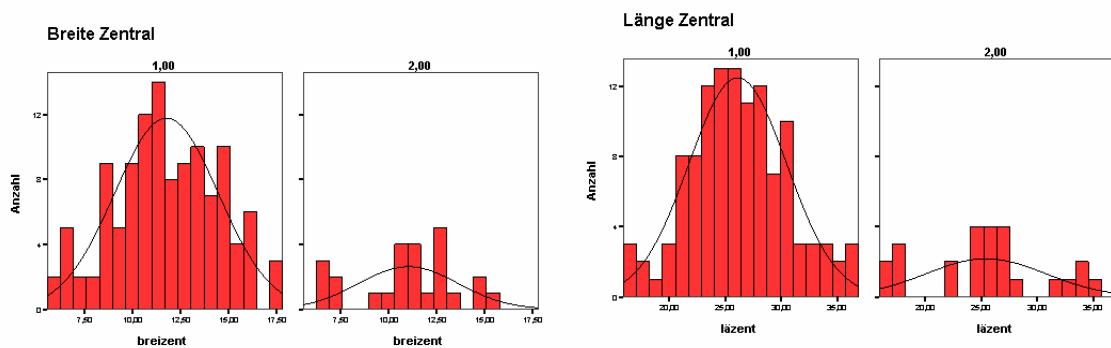
Überprüfung der Normalverteilung:



Anteriores Stroma: Gruppenstatistiken

	GRUPPEA	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	
LÄANT	1	44	21.95795455	4.521942667	0.681708507	
	2	37	21.68027027	3.765785654	0.619091348	
BREIANT	1	44	10.92954545	2.524945272	0.380649822	
	2	37	11.00432432	2.510285	0.412688312	

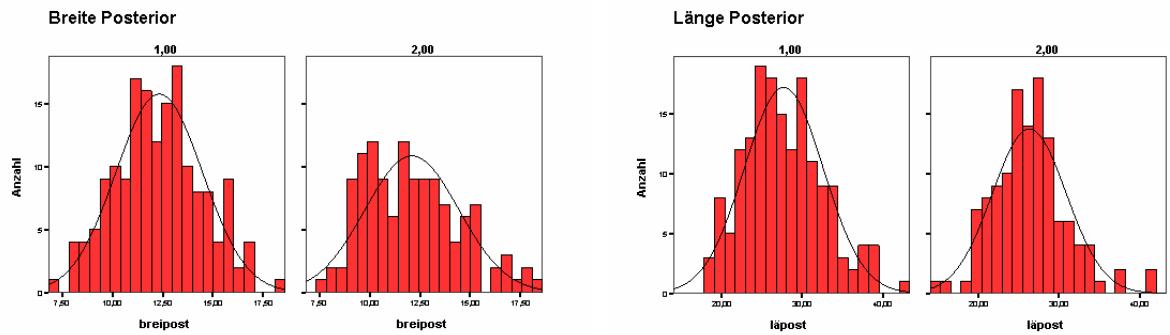
Tabelle 11-9



Zentrales Stroma: Gruppenstatistiken

	GRUPPEZ	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	
LÄZENT	1	117	26.11094017	4.384221706	0.40532144	
	2	25	25.416	5.380504159	1.076100832	
BREIZENT	1	117	11.75709402	2.699010055	0.249523568	
	2	25	11.0308	2.587852907	0.517570581	

Tabelle 11-10



**Posteriore Stroma:
Gruppenstatistiken**

	GRUPPEP	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
LÄPOST	1	166	27.70993976	4.903987925	0.380623281
	2	124	26.31241935	4.587130171	0.41193645
BREIPOST	1	166	12.32548193	2.155331812	0.167286192
	2	124	12.09959677	2.338965931	0.210045341

Tabelle 11-11

12. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Guthoff für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, die Betreuung und Unterstützung während der gesamten Dauer der Studie.

Für die freundliche Übernahme des Korrekturlesens möchte ich mich bei Herrn Prof. O. Stachs bedanken.

13. Lebenslauf

Persönliche Daten: GabrielDorn
geboren am 04. Juli 1971 in Männedorf

14. Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Rostock, den

(Gabriel Dorn)