



Aus der Universitätsaugenklinik Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. R. F. Guthoff  
Medizinische Fakultät der Universität Rostock

**Die Stimulierung von Langerhanszellen im  
Hornhautepithel und Evaluation der Entstehung einer  
Sicca – Symptomatik durch die Benzalkoniumchlorid –  
Applikation bei gesunden Probanden**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Hartwig Bergter aus Rostock

Rostock, 2011  
Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

Datum der Abgabe: 08.02.2011

Datum der Verteidigung: 18.1.2012

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. R. F. Guthoff
2. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Wree
3. Gutachter: Prof. Dr. med. F. E. Kruse

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Prinzipien der konfokalen in vivo Mikroskopie .....</b>	<b>7</b>
2.1. Entwicklung der konfokalen Mikroskopie	
2.2. Technische Anforderungen	
2.3. Rostock Kornea Modul	
2.4. Möglichkeiten und Auflösung des Mikroskops	
2.5. In vivo konfokale Mikroskopie der Kornea	
2.5.1. Normale Hornhaut	
2.5.2. Problematik des Trockenen Auges	
<b>3. Langerhanszellen .....</b>	<b>22</b>
3.1. Morphologie und Funktion der Langerhanszellen	
3.2. Verteilung der Langerhanszellen in der Kornea	
3.3. Darstellung der Langerhanszellen in vivo mit konfokaler Mikroskopie	
<b>4. Konservierungsmittel .....</b>	<b>30</b>
4.1. Verfügbare Substanzen	
4.2. Nutzen und Notwendigkeit von Konservierungsmitteln	
4.3. Mögliche konservierungsmittelbedingte Schäden am Auge	
4.3.1. Allergisierungspotential	
4.3.2. Toxische Effekte am Auge	
4.3.3. Oxidativer Stress	
4.3.4. Immunreaktion des Körpers	
4.3.5. Wirkung auf den Tränenfilm	
4.3.6. Einfluss auf die Barrierefunktion des Epithels	

- 4.3.7. Wirkung auf tiefere anatomische Strukturen des Auges
- 4.4. Konservierungsmittelfreie Präparate und ihre Vorteile

<b>5. Hypothese .....</b>	<b>42</b>
<b>6. Methodik .....</b>	<b>43</b>
6.1. Aufbau der klinischen Studie	
6.2. Untersuchungsvorrichtung	
6.3. Studienablauf	
6.4. Untersuchungsparameter	
6.5. Probanden	
6.6. Konfokale in vivo Mikroskopie	
6.7. Statistische Analyse	
<b>7. Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
7.1. Entwicklung der Langerhanszellzahl im Verlauf der Studie	
7.1.1. Hornhaut – Zentrum	
7.1.2. Hornhaut – Peripherie	
7.2. Veränderungen in den Untersuchungsparametern, die auf die Entwicklung eines trockenen Auges hindeuten	
7.2.1. Verträglichkeit und Beschwerden	
7.2.2. Biomikroskopie (Spaltlampenuntersuchung)	
7.2.3. Epitheldicke	
7.2.4. Schirmer-I-Test	
7.2.5. Tränenfilmaufrisszeit (Break-Up-Time )	
7.2.6. Hornhautsensibilität	

<b>8. Diskussion .....</b>	<b>64</b>
8.1. Veränderung der Langerhanszellzahl im zeitlichen Verlauf	
8.2. Problematik des Trockenen Auges (Keratokonjunktivitis sicca)	
<b>9. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>71</b>
<b>10. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>11. Thesen .....</b>	<b>82</b>
<b>12. Veröffentlichungen .....</b>	<b>84</b>
<b>13. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>85</b>

# 1. Einleitung

Seit der Einführung von Augentropfen als Applikationsform zur medikamentösen Therapie in der Medizin ist das Auftreten von bakterieller Keratitis und Konjunktivitis nach längerer Instillation der Tropfen aus demselben Behältnis bekannt. Dank der Einführung von Konservierungsmitteln kommen diese Nebenwirkungen der Arzneimittelapplikation am Auge heutzutage kaum noch vor. Das Medikament wird nachhaltig vor Erregerkontamination und Wirkstoffzerfall geschützt. Allerdings weiß man heute auch, dass Symptome wie Brennen, Irritationen, Hornhautschäden und die Entwicklung eines trockenen Auges gerade der Anwendung von diesen konservierenden Hilfsstoffen zuzuschreiben sind.

Die quaternäre Ammoniakverbindung Benzalkoniumchlorid (BAC) ist bei weitem das am häufigsten verwendete Konservierungsmittel in ophthalmologisch angewendeten Pharmaka. Es wirkt effektiv antimikrobiell, indem es semipermeable Zytoplasmamembranen als hoch aktives Lösungsmittel zerstört und Proteine denaturiert. In Konzentrationen von 0,005 – 0,02 % angewendet, penetriert es allerdings auch in die tieferen Schichten der Hornhaut und kann dort dosisabhängig Schäden verursachen sowie Allergien induzieren [9;23;25;93]. Allergische Reaktionen machen sich als konjunktivale Hyperämie oder papilläre Konjunktivitis bei ca. 3,7 % als verzögerte Typ IV Reaktionen bemerkbar [2;49]. Des Weiteren ist schon länger bekannt, dass Konservierungsmittel die Entwicklung eines trockenen Auges verursachen können, einerseits durch die Veränderung des Tränenfilms und dessen Produktion, andererseits durch die ständige Irritation und Entzündung der okulären Oberfläche [4;23-28]. Studien haben gezeigt, dass BAC unter den Konservierungsmitteln durch die hohe Penetrationstiefe das höchste toxische Potential hat. Die schädlichen Effekte sind dabei dosisabhängig und korrelieren mit der Länge der Exponierung. Bereits 0,01 % BAC – Lösung über drei Stunden angewendet induzieren im Epithel einen kompletten Mikrovillenschwund, degenerative Membranveränderungen und die Desquamation der ersten beiden Epithelschichten [28]. Die Desquamation der obersten Epithelschicht geschieht schon nach 30 Minuten bei Anwendung von 0,005 % BAC [51].

Mit Hilfe der in vivo konfokalen Mikroskopie lassen sich Veränderungen der okulären Oberfläche auf zellulärer Ebene problemlos, schonend, schnell und jederzeit reproduzierbar darstellen. So wählten wir diese Untersuchungsmethode als Alternative zu der

zeitaufwendigen immunhistochemischen Darstellung der antigenpräsentierenden Langerhanszellen. Diese immunologisch aktiven Zellen sind befähigt Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und Effektorzellen anschließend zu präsentieren. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Stimulation von T-Zellen und der Produktion von T-Zell-abhängigen Antikörpern und gehören zu den wenigen Abwehrzellen, die jederzeit in der Kornea präsent sind.

Das Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss von Benzalkoniumchlorid, in medikamentenüblicher Konzentration angewendet, auf die Expression von Langerhanszellen zu zeigen. Die Vermehrung und Reifung dieser antigenpräsentierenden Zellen wäre ein verlässlicher Hinweis auf eine entzündliche Irritation der Hornhaut durch das Konservierungsmittel. Eine Veränderung der Langerhanszellzahl nach Absetzen der BAC – Testsubstanz wird Aufschluss über das immunologische Potential und die Reaktionsbreite des Immunsystems in der Hornhaut geben. Zusätzlich soll die mögliche BAC – induzierte Entwicklung einer trockenen Auge – Symptomatik bei gesunden Probanden eingeschätzt werden.

## 2. Prinzipien der konfokalen in vivo Mikroskopie

Die wohl am meisten verbreitete Untersuchungsmethode in der Ophthalmologie ist die Spaltlampenmikroskopie. Schon früh war es möglich Veränderungen im vorderen Augenabschnitt mittels dieser in vivo Mikroskopie festzustellen. So schilderten Vogt et al. bereits 1930 in ihrem veröffentlichten „*Lehrbuch und Atlas der Spaltlampenmikroskopie des lebenden Auges*“ das Vorkommen von Hornhautkörperchen (*corpusculi corneae*), welche aufgrund der begrenzten Vergrößerung (ca. 40fach) allerdings nicht weiter zu differenzieren waren [115]. Erst 1968 sollte das erste konfokale scanning Mikroskop zur Anwendung kommen und damit eine weitere Differenzierung von okulären Strukturen und Zellen in vivo möglich werden. Es zeichnete sich besonders durch eine höhere Auflösung in die Tiefe (z – Achse) von Zellen im lebenden Gewebe aus. Eine Fixierung des Objektes oder Anfärbung war nicht nötig [43].

### 2.1. Entwicklung der konfokalen Mikroskopie

Die Grundlagen für die Entwicklung eines konfokalen Mikroskops wurden 1955 von Marvin Minsky an der Harvard University gelegt [81]. Durch eine Kondensorlinse treten in dem damals entwickelten Mikroskop die Lichtstrahlen auf das zu untersuchende Objekt und erzeugen dort einen Brennpunkt. Die auf diesen Brennpunkt gerichtete Objektivlinse ist so ausgerichtet, dass beide Linsenbrennpunkte und so auch die Linsen selbst konfokal angeordnet sind und das reflektierte Licht aufnehmen können [3]. Minsky forschte vor allem an ungefärbten Nervenzellen in Hirngewebe, fand zu seiner Zeit allerdings nicht sehr viel Beachtung. Gründe hierfür liegen wahrscheinlich in den damals bestehenden technischen Limitationen: Suffiziente Lichtquellen (Laserdioden) und eine hohe Leistung sowohl von Hardware als auch Software, um die gewonnenen Daten zu verarbeiten, waren zu seiner Zeit noch nicht gegeben [81].

Egger und Petran schlossen sich Ende der 1960er Jahre den Entwicklungen Minskys an und konzipierten ein konfokales Mikroskop mit mehreren Strahlen und einer sich drehenden von Paul Nipkow 1884 in Berlin entwickelten Scheibe („Nipkow Disk“), welche mehrere Tausend konjugierte lochförmige Öffnungen enthält. Auch sie untersuchten zunächst Hirngewebe [30]. Etwa zeitgleich führte Maurice 1968 das erste „high – powered specular microscope“

ein und konnte an der Kornea vom Kaninchen Epithel, Stroma, Descemetische Membran und Endothel in ca. 500facher Auflösung photographisch dokumentieren [77]. Wenig später setzten Lemp (1985), Jester und Cavanagh (1990) das Petran Tandem Scanning Mikroskop, ebenfalls unter Verwendung der Nipkow Disk ein, um Hornhäute ex vivo von Kaninchen und Menschen zu studieren. Auch die mikroskopische Darstellung in vivo sollte kurz darauf geschehen: Dies gelang Dilly, Cavanagh und Masters wenig später [15;69;73]. Um eine bessere Lichttransmission und optimale Lichtreflektion zu erreichen führten Masters und Thaer 1994 konfokale Spalt – Scanning Systeme in Echtzeit ein [74]. Auch Tomii, Richter und Stave applizierten diese Technik in ihren Forschungen und perfektionierten sie zunehmend [88;102;103;112].

Um die Auflösung der mikroskopischen Aufnahmen zu verbessern, musste versucht werden, das Streulicht von außerhalb der fokalen Ebene zu minimieren und die Lichtintensität zu verstärken. Neue Technologien aus der Laserforschung und schnellere digitale Prozessoren lösten die Spaltlampenmethode ab und ermöglichten die Einführung von Mikroskopen, welche die Oberfläche mittels Laser abtasten konnten.

## 2.2. Technische Anforderungen und involvierte Prinzipien

Herkömmliche Lichtmikroskope „durchleuchten“ die gesamte Tiefe des zu untersuchenden Objektes (z.B. eines Schnittpräparates). Dabei werden Strukturen sowohl vor als auch hinter der fokussierten Ebene mit abgebildet bzw. verschlechtern die Klarheit des Bildes. Um diese Effekte zu verhindern, bedient man sich bei der konfokalen Mikroskopie dem Spaltlampenprinzip: Ein begrenzter Lichtstrahl wird durch einen Spalt und die eine Hälfte des Objektivs auf ein definiertes Areal im zu untersuchenden Objekt (z.B. der Kornea) projiziert. So sammelt sich der Großteil des Lichtes in der gleichen Fokusebene und wird ebenso durch die andere Hälfte des Objektivs und einen Spalt zurück reflektiert. Dadurch wird Streulicht quasi ausgeschaltet, da es nicht mit dem aus der fokalen Ebene kommenden reflektierten Lichtstrahl durch den gleichen Spalt in das Mikroskop kommen kann. Das Bild wird schließlich über einen hoch sensitiven CCD – Sensor (*Charge – Coupled Device*) erfasst und auf dem Monitor abgebildet. Um größere Flächen zu erfassen bewegen sich die Spaltöffnungen in der Ebene und tasten so die Kornea ab. Eine 670 nm Laserdiode sorgt bei der konfokalen laserscanning Mikroskopie für eine suffiziente Intensität des Lichtstrahls und somit für hohe Kontraste.

### 2.3. Rostock Kornea Modul

Der Heidelberg Retina Tomograph II (HRT II) wurde als konfokales laserscanning Mikroskop eigentlich zur Detektierung von Veränderungen am Sehnervenkopf bei Glaukompatienten und zur Darstellung von pathologischen Veränderungen der Retina z.B. bei choroidaler Neovaskularisation konzipiert [11;50]. Um den Fokus nach vorne zu verlegen, damit auch anteriore Strukturen des Auges wie die Kornea in vivo untersucht werden können, wurde das System von Stave et al. an der Universität Rostock mit einem vorsetzbaren Objektivsystem, dem Rostock Cornea Module (RCM), gekoppelt [104].

Dank dieser Innovation war es nun auch möglich detaillierte optische Schnitte der Kornea in vivo zu machen und zusätzlich die Hornhaut Mikrometer genau auszumessen. Sämtliche Hornhautstrukturen konnten nun dargestellt werden: Epithel, Bowmansche und Descemetsche Membran, Stroma und Endothel sowie Nervengeflechte des subepithelialen Plexus und infiltrierende Entzündungszellen. Auch vorher nur ex vivo beschriebene dendritische Zellen konnten nun am lebenden Objekt in Echtzeit beobachtet und quantitativ sowie qualitativ evaluiert werden [104].

Um die Distanz in die Tiefe (z – Achse) präzise bestimmen zu können und einen konstanten Objektiv – Kornea – Abstand einzuhalten war die Anwendung einer Aufsatzkappe nötig. Diese so genannte Polymethylmethacrylat (PMMA) – Kappe fungiert gleichzeitig als Reservoir für ein auf Wasser basiertes Carbomer Gel, das die Brechungsindizes im Strahlengang harmonisiert und den Kontakt zum Objekt aufrechterhält. Für die Vorrichtung wurde ein Wasser – Kontakt Objektiv eingesetzt (Zeiss, 63x/0.95W, 670nm,  $\infty/0$ , Jena, Deutschland). Scharfe Bilder können bis zu einer 800fachen Vergrößerung dargestellt werden. Mit dem System sind Videoaufnahmen in Echtzeit sowie Sequenzen mit bis zu 100 Bildern oder auch Einzelbildern möglich. In die Tiefe kann der Fokus auf der z-Achse um bis zu 60  $\mu\text{m}$  verlagert werden und so eine Schicht dieser Dicke in einer Sequenz beurteilt werden. Das Untersuchungsfeld beläuft sich dabei auf eine Fläche von 200 x 200 bis 400 x 400  $\mu\text{m}$ . Eine gezielte makroskopische Positionierung des Objektivs auf die Kornea wird mit einer externen, seitlich montierten Videokamera kontrolliert [79;102].

Fortschritte in der Datenverarbeitung erlauben heute die dreidimensionale Rekonstruktion von anatomischen Strukturen. Dabei werden mehrere Schnittflächen als Bildersätze in einem 3-D

Gerüst zusammengelegt [101;125]. Eine der neusten Innovationen ist die 2-D Darstellung von größeren Hornhautarealen während der gleichen Untersuchung mittels mehrerer Kompositionsbilder. Dabei werden schon während der konfokalen Mikroskopie überlappende Einzelaufnahmen zu einem Gesamtbild mit einer maximalen Größe von 3072 x 3072 Pixel (3,2 x 3,2 mm) durch die entwickelte Software rekonstruiert [122].

## 2.4. Möglichkeiten und Auflösung des Mikroskops

Die Auflösung eines Mikroskops wird durch den Abstand zwischen zwei Punkten eines Objektes definiert, bei dem diese immer noch getrennt voneinander identifiziert werden können – also in wie weit kleinste Strukturen noch klar darstellbar sind.

Bestimmende Faktoren sind neben der Vergrößerung der Linsenoptik auch die Wellenlänge des verwendeten Lichtes. Kurzwelliges Licht sorgt dabei für eine bessere Resolution als Licht mit langen Wellen. Außerdem spielt das Medium zwischen Objektiv und Objekt eine wichtige Rolle: Der Refraktionsindex sollte hier möglichst nicht zu sehr von dem des Objektivs abweichen. Für das RCM wird deshalb als Kontaktmedium ein Carbomer Gel mit einem Refraktionsindex von 1,350 angewandt (Visidic, Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland).

Das RCM verhilft dem HRT II zu einer Differenzierung zwischen zwei Punkten in der x – y – Ebene die weniger als 1 µm voneinander entfernt sind. In z – Achse, also Tiefe, lassen sich die Strukturen in 7 – 8 µm auseinander halten [125].

Dank der hohen Auflösung und suffizienten, bis zu 800fachen Vergrößerung in vivo als nicht – invasive Untersuchungsmethode lassen sich Strukturen und pathologische Veränderungen der Kornea besonders gut mikroskopisch darstellen [79;102;123].

## 2.5. In vivo konfokale Mikroskopie der Kornea

Die einfache und problemlose Anwendung der in vivo konfokalen Mikroskopie ermöglicht heute den routinemäßigen Einsatz des Verfahrens zur Untersuchung von normalem und pathologisch verändertem Gewebe. Da viele der anatomischen Strukturen am Auge transparent sind, findet die Technik derzeit hauptsächlich in der Ophthalmologie besondere

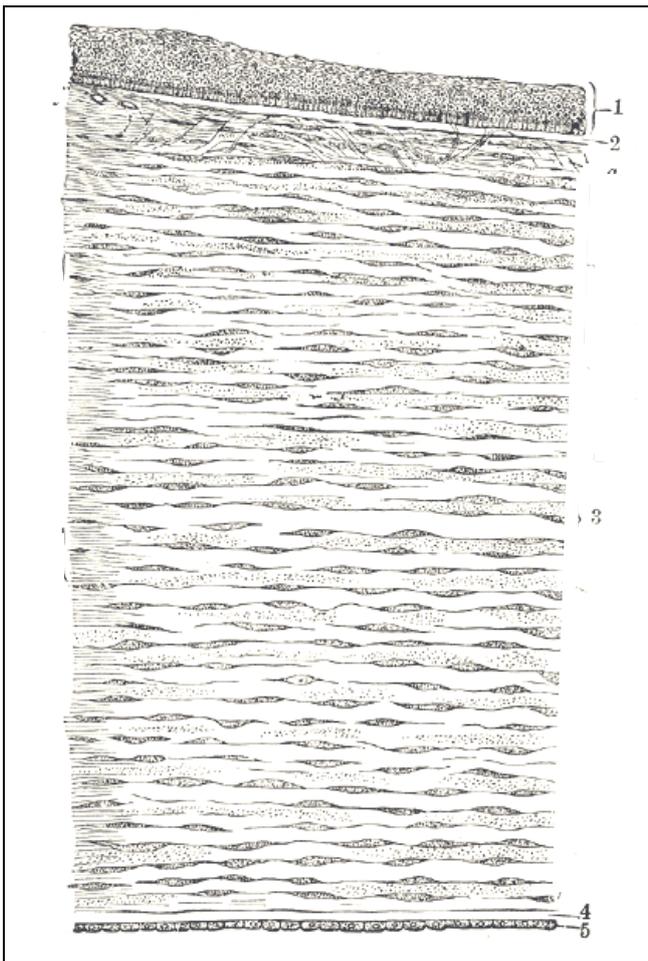
Aufmerksamkeit. Im Folgenden werden die Strukturen am Auge, wie sie mit der konfokalen Mikroskopie sichtbar gemacht werden, beschrieben.

### 2.5.1. Normale Hornhaut

Die Hornhaut (Kornea) als vorderste Begrenzung des Auges hat die Form einer Ellipse mit einer Oberfläche von etwa  $1,3 \text{ cm}^2$ . Sie misst im Durchmesser horizontal  $11,5 - 12 \text{ mm}$  und vertikal  $11 \text{ mm}$ . Die geringere vertikale Größe liegt an der Ausdehnung der skleralen Fasern, die oben und unten weiter in die Hornhaut hineinreichen. Wenn man die Hornhaut von hinten betrachten würde, wäre sie etwa  $13 \text{ mm}$  im Durchmesser und kreisrund. Horizontaldurchmesser von  $10 - 13 \text{ mm}$  können als physiologisch angesehen werden. Werte darunter weisen auf eine Mikrokornea, Werte darüber auf eine Makrokornea oder Megalokornea hin [41]. Im Zentrum ist die Hornhaut ca.  $535 - 540 \mu\text{m}$  dick, nach peripher nimmt die Dicke bis auf durchschnittlich  $610 \mu\text{m}$  zu [29;67]. Als bradytrophes Gewebe wächst die Hornhaut in der Wachstumsphase kaum mit und hat nach sechs Lebensmonaten schon nahezu ihre endgültige Ausdehnung erreicht. Größenveränderungen sind nach dem sechsten Lebensjahr nicht mehr feststellbar. Bei Frauen ist die Hornhaut allgemein etwas kleiner als bei Männern.

Histologisch werden fünf Schichten in der Kornea beschrieben (von vorne nach hinten): Epithel, Bowmansche Membran, Stroma, Descemetsche Membran und Endothel. Beim Epithel lassen sich weiterhin die Superfizialzellen, die Intermediären Zellen oder Flügelzellen und die Basalzellen abgrenzen.

**Abb. 1 Querschnitt der Hornhaut (nach Waldeyer) [38]:**



1. Epithel
2. Bowmansche Membran
3. Stroma
4. Descemetsche Membran
5. Endothel

Superficialzellen (Abb. 2 a):

Helle Zellgrenzen mit dunklen Zellkerni machen die am meisten oberflächlich gelegenen Zellen aus. Sie sind häufig polygonal oder hexagonal in ihrer Form. Im Durchschnitt können sowohl im Zentrum als auch in der Peripherie ca. 840 Zellen pro Quadratmillimeter gezählt werden [29].

Intermediäre Zellen / Flügelzellen (Abb. 2 b und 2 c):

In der intermediären Schicht lassen sich die Zellen mit hellen Zellgrenzen und dunklem Zytoplasma charakterisieren. Zellkerne lassen sich hier nur schwer differenzieren. In Größe und Form unterscheiden sich diese Zellen kaum. Mit 5000 Zellen/mm<sup>2</sup> im Zentrum der Kornea und 5500 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Peripherie ist die Zelldichte wesentlich höher als an der Oberfläche [29].

Basalzellen (Abb. 2 d):

Genau über der Bowmanschen Membran gelegen, lassen sich diese Zellen durch ihre hellen Zellgrenzen und den nicht abzugrenzenden großen Zellkern ausfindig machen. Wie die über ihnen gelegenen Flügelzellen unterscheiden sich auch die Basalzellen kaum untereinander in Größe und Form. Sie sind insgesamt hochprismatisch und nehmen etwa ein Drittel der Epithelschichtdicke ein. Als Regenerationspool für die vorderen Zellreihen weist diese Schicht eine sehr hohe Mitoserate auf. Abgeschilferte Zellen aus der Superfizialschicht werden ständig von neuen, zur Hornhautoberfläche hinwandernden Zellen der Basalzellschicht ersetzt.

Mit 9000 Zellen / mm<sup>2</sup> im Zentrum und 10000 Zellen / mm<sup>2</sup> in der Peripherie ist die Zelldichte noch größer. Das Verhältnis der Zelldichte zwischen den Schichten ist somit 1:5:10 (superficial : intermediär : basal) [29].

Bowmansche Membran (Abb. 2 f):

Von Bowman zuerst beschrieben, ist diese fibrillenreiche Schicht als oberste Begrenzung des Stromas äußerst dünn (7-14 µm), jedoch gleichzeitig widerstandsfähig. Es kommt neben Kollagen Typ IV zusätzlich Kollagen vom Typ VII vor [71;126]. Sie ist nicht fähig, sich nach Verletzung zu regenerieren, und somit von wichtiger Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Strukturgefüges in der Kornea.

Stroma (Abb. 2 g und 2 h):

Das auch Substantia propria genannte Stroma nimmt den Großteil der Hornhaut mit etwa 90 % ein. Von Virchow wurden die Hauptbestandteile noch als Lamellen bezeichnet. Heute weiß man, dass es sich überwiegend um Kollagenfaserbündel vom Typ I handelt [20]. Diese Bündel ziehen teilweise von Limbus zu Limbus, teilweise enden sie aber auch im Zentrum oder münden in andere Kollagenfasern, kreuzen sich mehrfach und bilden so ein stabiles Geflecht. Kikkawa et al. haben mit Hilfe von Phasenkontrastmikroskopuntersuchungen die Struktur genauer beschrieben. Peripher sind die Kollagenfasern demnach radiär und parallel zueinander angeordnet und werden nur von wenigen Fasern zirkulär gekreuzt. Zentral findet sich ein weniger systematisch angeordnetes Netzwerk von sich dicht kreuzenden Fasern [58]. Neben den Kollagenfasern besteht das Stroma zum größten Teil aus Wasser (80 %), welches von Mukopolysacchariden und Glykosaminoglykanen (hauptsächlich Keratansulfat und Chondroitinsulfat) gehalten wird. Diese Substanzen haben eine starke Neigung aufzuquellen. Daher führen Veränderungen des Wassergehaltes (z.B. bei Verletzungen oder Entzündungen)

schnell zur Ausbildung eines Ödems und konsekutiver Hornhauttrübung. Als zelluläre Bestandteile kommen die sternförmigen Keratozyten im Stroma vor. Sie machen hier etwa fünf Volumenprozent aus und bilden über Protoplasmabrücken eine Art Synzitim. Damit reagieren bei Affektion auch immer mehrere Keratozyten einheitlich und nie nur wenige gleichzeitig. Lichtmikroskopisch sind das Zytoplasma dieser Fibroblasten und die von ihnen gebildeten Kollagenfasern nicht sichtbar, man sieht lediglich die hoch reflexiven Zellkerne. Die Zellkerndichte der Keratozyten nimmt von vorne nach hinten ab, ist also an der Bowmanschen Membran am höchsten [56].

Descemetische Membran:

Im Gegensatz zur Bowmanschen Membran ist die Descemetische Membran mit 6 – 8 µm etwas dünner, dafür aber aufgrund von elastischen Fasern noch widerstandsfähiger und elastischer. Man geht heute davon aus, dass die Membran vom Endothel gebildet wird. Somit ist sie auch regenerationsfähig.

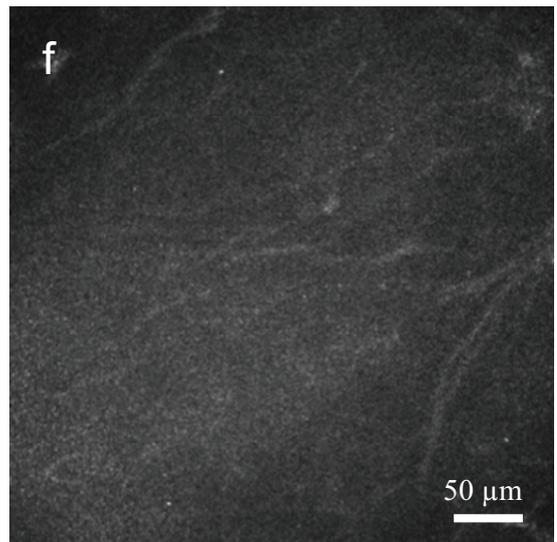
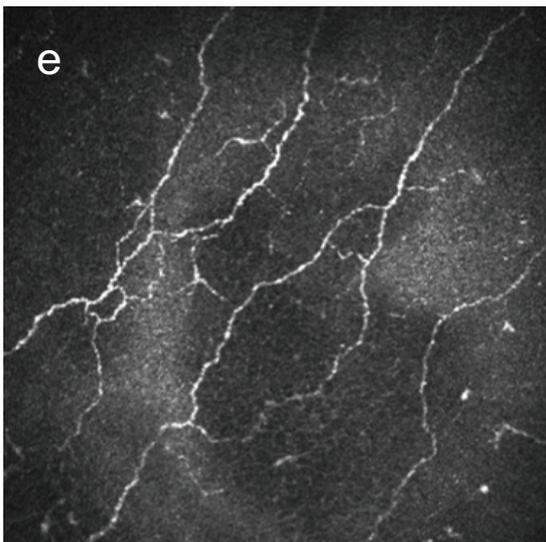
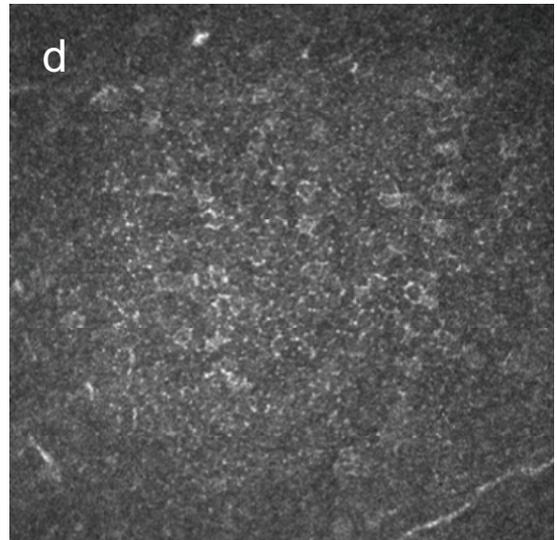
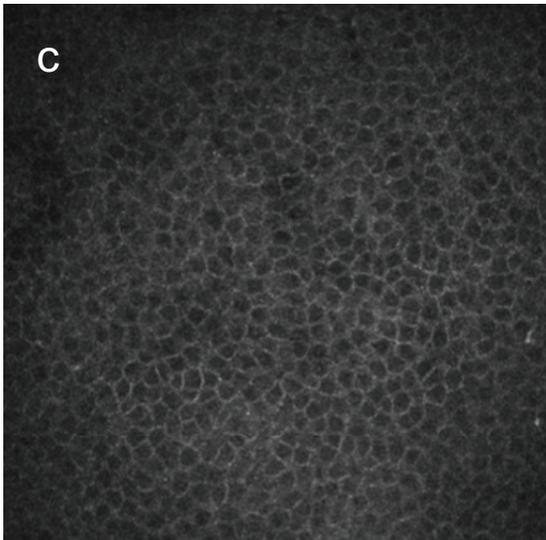
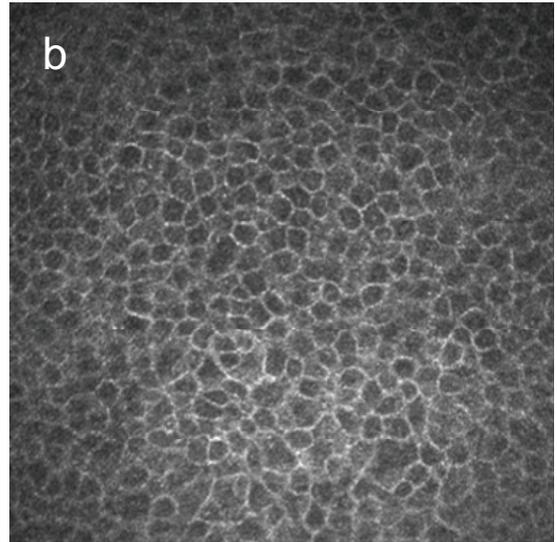
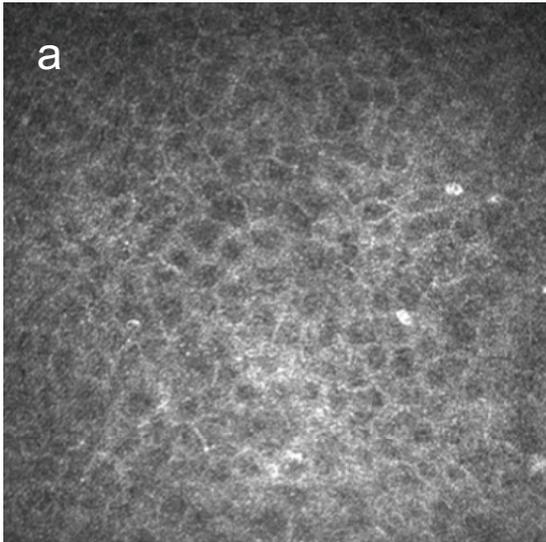
Endothelzellen (Abb. 2 i):

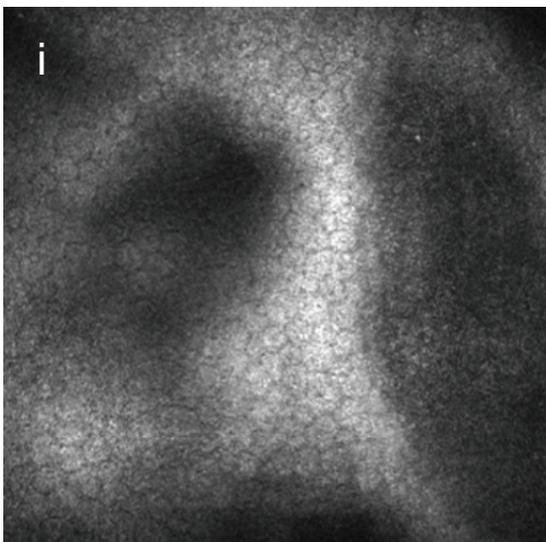
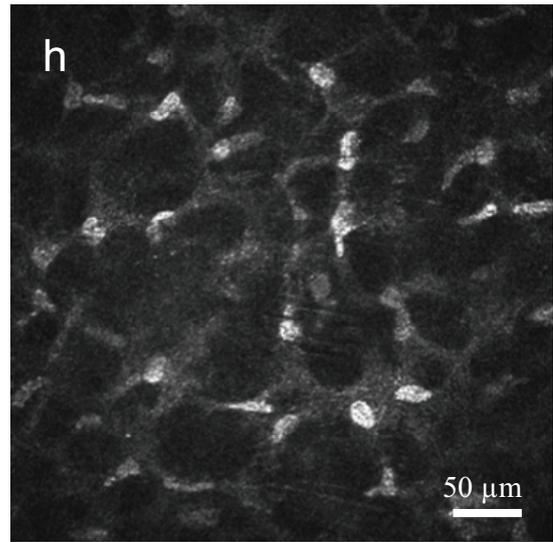
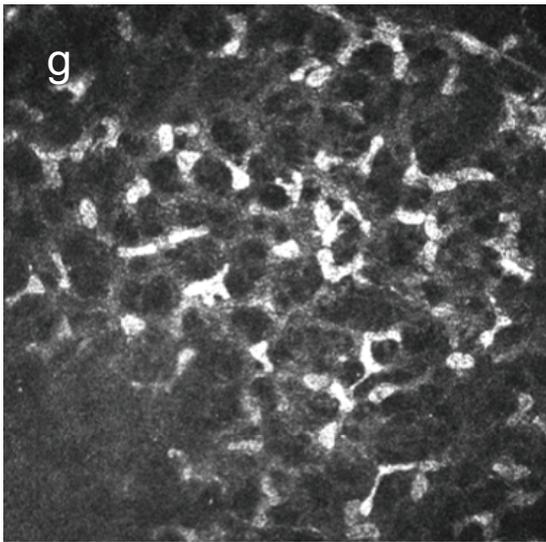
Ein Gefüge von einer einzigen Lage regulär angeordneter, platter, hexagonaler Zellen macht das Endothel mit einer Zelldichte von normalerweise 2500 Zellen / mm<sup>2</sup> aus [41]. Peripher gehen die Zellen ins Netzwerk des Trabekelwerks über. Da das Zytoplasma mehr Licht reflektiert als die Zellgrenzen, erscheinen dem Betrachter helle Zellen mit dunklen Grenzen. Die Zellkerne sind meist nicht zu identifizieren.

Nervengeflecht der Kornea (Abb. 2 e)

Dank der ausgeprägten Innervierung der Kornea schützt der Lidschlussreflex selbst bei minimaler Irritation die Hornhaut. Die vielen Nervenbündel dienen aber nicht nur der Sensitivität, sondern beeinflussen auch die Integrität des Epithels und die Heilung von Wunden. Die sensorischen Nerven kommen aus dem Plexus ciliaris, der vom Nervus nasociliaris des Nervus ophthalmicus, einem Ast des Nervus trigeminus, gebildet wird. Sie sind nicht myelinisiert, zwischen 0,2 bis 10 µm dick und bilden den subepithelialen Nervenplexus. Abzweigende Nervenfasern enden frei in Richtung Hornhautoberfläche und Hornhautzentrum oder bilden feine Endkölbchen. Oft können hier Y – oder T – förmige Nervenverzweigungen beobachtet werden. Manche Nervenfasern bilden richtige Faserkörbchen um die Epithelzellen. Weiterhin ist die perlschnurartige Form der Nervenfasern charakteristisch. Eine traumatische Abschilferung von Epithelzellen (Erosio

corneae) führt zu einer Freilegung der Nervenfaserverendigungen, was die massive Schmerzhaftigkeit bei diesem Krankheitsbild erklärt. Dargestellt werden können die stromalen Nervengeflechte und der subepitheliale Nervenplexus sehr gut in vivo mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie. Stachs et al. konnten mit der Zusammenrechnung mehrerer konfokaler Bilder dreidimensionale Übersichtsaufnahmen erstellen. So lassen sich Veränderungen im Nervengeflecht der Kornea bei pathologischen Prozessen im Verlauf gut veranschaulichen und die Re – Innervation z.B. nach refraktiver Chirurgie kontrollieren [41;42;56;101].





**Abb. 2 Konfokale Schnittbilder der Hornhautschichten:**

- |                                     |                        |
|-------------------------------------|------------------------|
| (a) Superfizialzellen               | (f) Bowmansche Membran |
| (b) Obere Flügelzellen              | (g) Vorderes Stroma    |
| (c) Untere Flügelzellen             | (h) Hinteres Stroma    |
| (d) Basalzellen                     | (i) Endothel           |
| (e) Subepithelialer<br>Nervenplexus |                        |

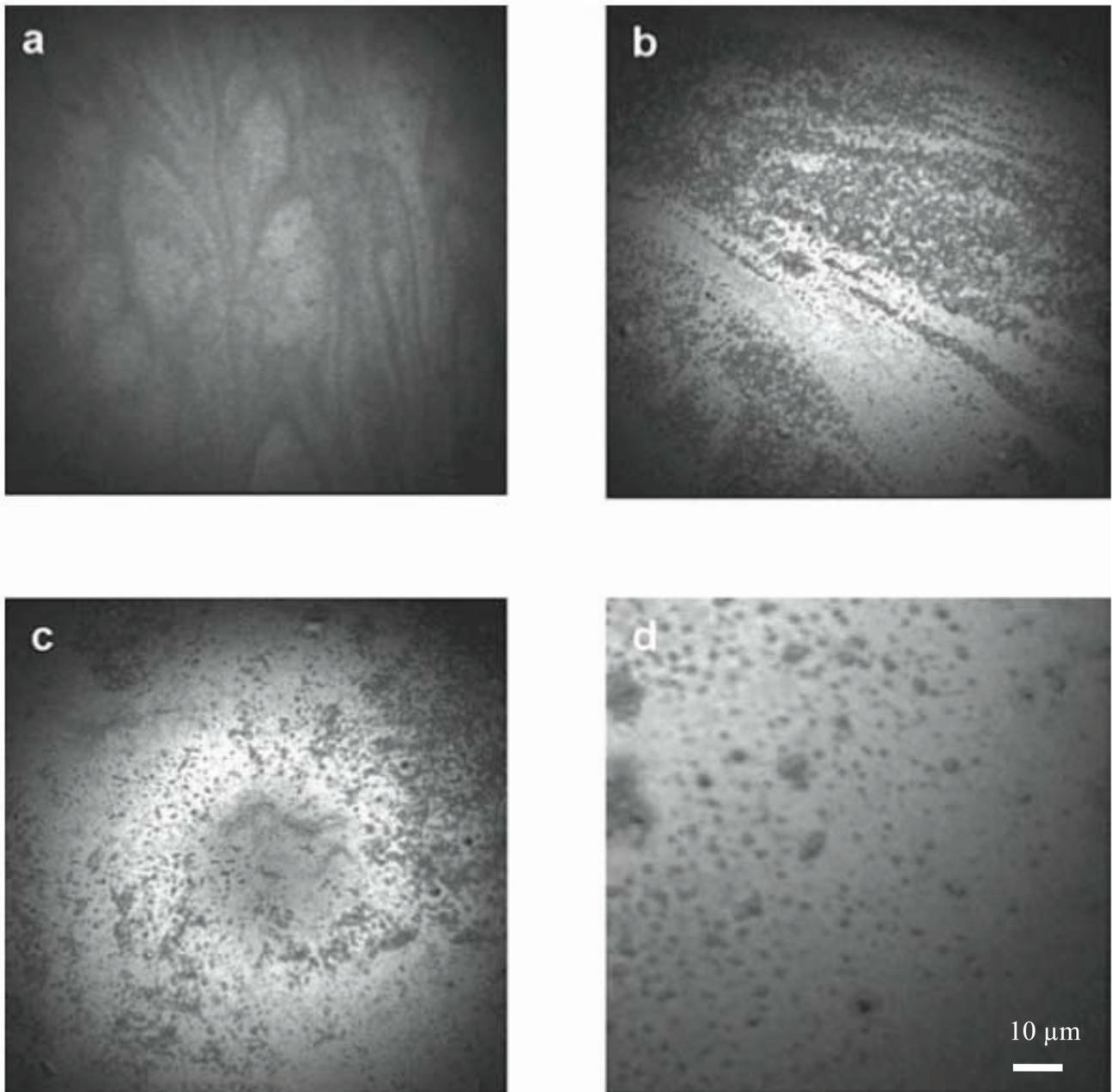
## 2.5.2. Problematik des Trockenen Auges

Auf dem Internationalen Dry Eye WorkShop (DEWS) 2007 wurde folgende Definition des Trockenen Auges festgelegt:

„Das Trockene Auge ist eine multifaktorielle Erkrankung der Tränen und Augenoberfläche, die zu Beschwerdesymptomen, Sehstörungen, und Träneninstabilität mit möglicher Beschädigung der Augenoberfläche führt. Sie wird von erhöhter Osmolarität des Tränenfilms und Entzündung der Augenoberfläche begleitet [68].“

Zur Diagnose des Trockenen Auges wurden auf dem DEWS von einem Subkomitee für diagnostisches Vorgehen Empfehlungen ausgesprochen. Zur Anwendung kommen validierte Fragebögen für routinemäßiges Screening in der Praxis, die Tränenfilm – Aufrisszeit (BUT – break up time), Bestimmung der Funktion der Tränenflüssigkeit (TFI – Tear Function Index als Quotient aus Schirmer – Wert und Tränen – Clearance – Rate) in einem kommerziell erhältlichen Test und die Bestimmung der Osmolarität, die derzeit allerdings noch speziellen Zentren vorbehalten ist [13].

Der Tränenfilm und das Hornhautepithel können mittels HRT II und RCM in Kontakt – bzw. *non – contact* Verfahren problemlos dargestellt werden. So lassen sich etwaige Epithelveränderungen oder Erosionen bedingt durch die verminderte Befeuchtung der Hornhautoberfläche schnell und anschaulich darstellen (Abb. 3) [43;124].

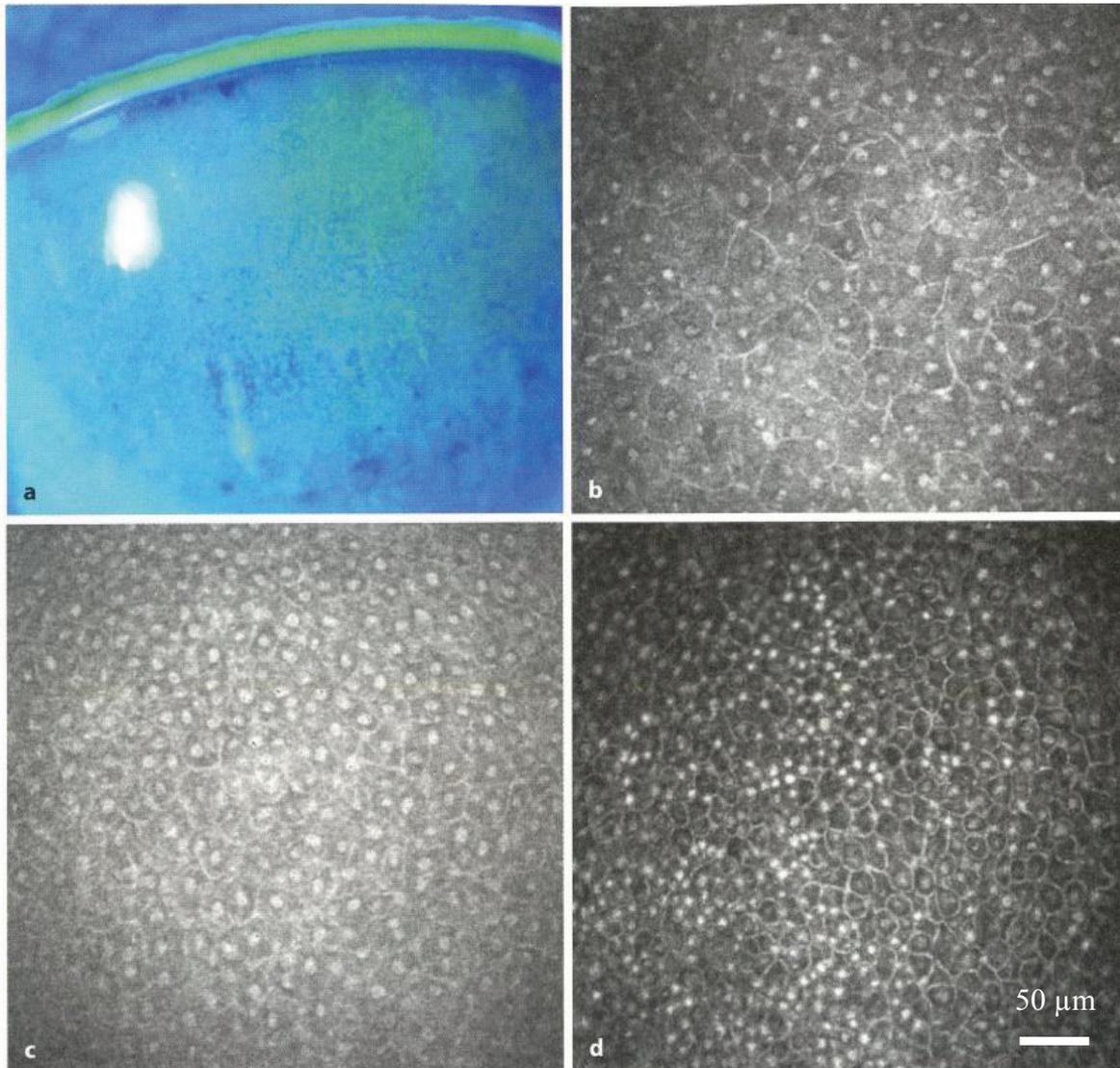


**Abb. 3 Konfokal mikroskopische Bilder des Tränenfilms im *non – contact* Verfahren (Größe: 100 x 100 µm) [124]:**

- (a) Tränenfilm kurz nach dem Blinzeln, Streifen des Lipidfilms sind sichtbar
- (b) Tränenfilm 5 Sekunden nach Blinzeln
- (c) Tränenfilm 10 Sekunden nach Blinzeln
- (d) Die ersten Defekte im Tränenfilm (trockene Flecken) werden sichtbar (BUT > 10 s)

In einer größeren epidemiologischen Studie wird von Tian et al. eine Prävalenz für das Trockene Auge von bis zu 30 % angegeben. Zu den Risikofaktoren dieser Erkrankung zählen hohes Alter, weibliches Geschlecht, das Tragen von Kontaktlinsen und die Anwendung von Augentropfen [111].

Im superfizialen Epithel können vermehrt hyperreflektive, unterschiedlich große Zellen mit demarkiertem Zellkern als Zeichen der Zellpyknose gesehen werden (Abb. 4). In schwereren Fällen treten diese zellulären Veränderungen auch in tieferen Zellschichten auf. Zusätzlich ist eine erhöhte Anzahl von Langerhanszellen zu verzeichnen. Der subbasale Nervenplexus ist darüber hinaus bei vielen Patienten rarifiziert [124]. Zur Evaluierung der Permeabilität des Hornhautepithels wird heute überwiegend Natriumfluorescein bzw. Bengalrosa angewandt. So lassen sich interzelluläre Strukturen, Zellkerne und veränderte Zellgrenzen sichtbar machen. Weiterhin kann die Penetrationstiefe des Natriumfluoresceins abgeschätzt und so Aussagen zur kornealen Diffusionsbarriere getroffen werden [43].



**Abb. 4 Repräsentative konfokal mikroskopische Aufnahmen bei Keratokonjunktivitis sicca [42]:**

(a) Spaltlampenfoto mit Fluoresceinanfärbung der okulären Oberfläche:

positive Hornhautstippung bei einer 45 – jährigen Frau mit Keratokonjunktivitis sicca.

(b) – (d) Entsprechende konfokalmikroskopische in vivo Bilder:

Hornhautepithelmetaplasie mit unterschiedlich großen Zellen, die zum Teil hyperreflektive, aktivierte Zellkerne und ein vermindertes Zellkern – Zellplasma – Verhältnis aufweisen.

(b) Superfizialzellen

(c) Intermediäre Zellen / Flügelzellen

(d) Basalzellen

### 3. Langerhanszellen

Schon 1868 wurden diese dendritischen Zellen von einem jungen Medizinstudenten namens Paul Langerhans in Berlin beschrieben. Er färbte sie mittels Goldimprägnierung an und ging aufgrund der vielen Zellfortsätze davon aus, dass es sich um Nervenzellen handelt. Erst über 100 Jahre später – nämlich 1973 durch Steinman et al. [106] und 1982 durch Gillette et al. [34] – konnte die Zugehörigkeit der Langerhanszellen (LZ) zum Immunsystem und der Ursprung u. a. aus Monozyten des Knochenmarks nachgewiesen werden. Klareskog et al. [60] vermuteten schon 1979, dass es sich bei den durch Immunfluoreszenz entdeckten Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) im Epithel der Kornea mit den typischen dendritischen Fortsätzen um Langerhanszell – ähnliche Zellen handeln könnte. Früh beobachtete man die nach Antigenkontakt erfolgende Migration der Zellen in zum Lymphabflussgebiet zugehörige Lymphknoten. Mit der Möglichkeit Zellen aus dem Gewebe zu isolieren, konnte man dann auch weitere Oberflächenproteine immunhistochemisch markieren und so die Fähigkeit zur Antigenpräsentation belegen [8;34;46;60;106].

#### 3.1. Morphologie und Funktion der Langerhanszellen

Neben Zellen des mononukleären phagozytären Systems (z.B. Makrophagen), Endothelzellen, Astrozyten, Schwann'schen Zellen und den B – Lymphozyten gehören die LZ zu den APZ des Immunsystems. Lichtmikroskopisch zeichnen sich die im Durchmesser 12 – 15 µm messenden Zellen durch dendritische Fortsätze aus, das Zytoplasma ist leicht eosinophil und fibrillenarm. Außerdem sind das glatte endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat gut ausgebildet und die Zellen mit vielen Lysosomen ausgestattet. Stäbchenförmige Zytoplasmainschlüsse und helle, nierenförmige, vesikuläre Nuklei sind weiterhin charakteristisch. Von anderen dendritischen Zellen lassen sie sich durch typische zytoplasmatische Granula, den Birbeck Granula, unterscheiden [10;56;89].

Oft auch als dendritische Zellen (DZ) benannt, sind sie nicht primär wie Makrophagen darauf spezialisiert Fremdpartikel sprich Antigene zu phagozytieren, sondern diese dem Immunsystem zu präsentieren. Dabei sind LZ oft schon konstitutiv zur Antigenpräsentation

ausgestattet und müssen nicht erst, wie Makrophagen, stimuliert werden. Kennzeichnend sind die zur Präsentation von Antigenen notwendigen Oberflächenmoleküle: *Major Histocompatibility Complex II* (MHC-II). LZ gehören mit zum wichtigsten Glied in der zellvermittelten Immunreaktion. Nach der Aufnahme eines Antigens von APZ mittels rezeptorvermittelter Endozytose, Phago – oder Makropinozytose wird dieses prozessiert, d.h. in Peptide aufgespalten und anschließend an der Oberfläche über den MHC-II Rezeptorkomplex besonders T – Helfer – Lymphozyten präsentiert.

Heute weiß man, dass die DZ eine heterogene Gruppe von APZ darstellen und es sich keineswegs um identische Zellen gleichen Ursprungs handelt. Bis jetzt sind mindestens drei Entstehungswege aus dem Knochenmark bzw. dem hämatopoetischen System bekannt: Der lymphoide Entstehungsweg, der myeloide Entstehungsweg und die direkte Entstehung aus Zellen des mononukleären (CD14+ Monozyten) Systems. Wachstum und die funktionelle Entwicklung werden dabei stets durch spezifische Zytokine bestimmt. Diese interzellulären Botenstoffe sind sowohl für die Differenzierung der unreifen DZ im Gewebe als auch für das Zirkulieren durch den Blutkreislauf und das lymphatische Gewebe verantwortlich. Es ist davon auszugehen, dass gewebeständige DZ von im Blut zirkulierenden Vorläufern abstammen. Diese binden an endotheliale Rezeptoren wie ICAM-1, V-Cam-1 und E-Selectin über membranständige Oberflächenmoleküle wie CD11a/CD18, CD48d und an dem Cutanen Lymphozyten Antigen (CLA). Eine solche Zell – Rekrutierung erfolgt wahrscheinlich durch lokal produzierte Zytokine wie GM-CSF und durch systemisch wirkende Substanzen wie das bakteriell freigesetzte Lipopolysaccharid (LPS) [14;57;90;98;108].

Als noch unreife Vorläuferzellen siedeln sich DZ im Gewebe ab. Sie sind durch einen hohen Gehalt an intrazellulär befindlichen MHC-II in entsprechenden *MHC-II rich compartments*, Expression von CD1a und einer geringen Fähigkeit zur T-Zellstimulation gekennzeichnet. Trotz der Unreife sind sie sehr fähig, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren. Dafür bedienen sie sich dreier Aufnahmemechanismen: Der Phagozytose von ganzen Partikeln, der Makropinozytose als Aufnahme von in größeren Vesikeln befindlichen Extrazellulärflüssigkeiten und der rezeptorvermittelten Endozytose mittels Lectinrezeptor (z.B. Makrophagen Mannose Rezeptor und DEC-205) sowie Fcg- und Fce-Rezeptoren [55;94;95;98]. Beladen mit dem fremden Antigen wandern die DZ in T-Zellgebiete der Lymphknoten und der Milz. Diese Migration der DZen wird wahrscheinlich u. a. über den *vascular endothelial growth factor receptor – 3* vermittelt [46]. Hier können sie sich nach

Stimulation durch proinflammatorische Chemo- und Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$  und IL-1, GM-CSF, MIP-1 $\alpha$  und  $-\beta$  oder CCR5 in die reifen, aktiven APZ umwandeln. Diese nun sehr immunkompetenten DZen lassen sich durch folgende Kriterien charakterisieren: Sie haben multiple Zellfortsätze, können sich aktiv bewegen, haben eine geringere Phagozytoseaktivität, eine hohe Zelloberflächendichte an MHC I und II sowie weitere Moleküle zur T-Zellstimulation (wie z.B. CD40, CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3, CD80/B7-1 und CD86/B7-2). Außerdem weisen sie eine Produktion von Zytokinen (z.B. IL-12) und Zelllinienstabilität auf – d.h. es erfolgt keine Umwandlung mehr in beispielsweise Makrophagen oder Lymphozyten (bei Monozytenursprung) [85;86;91;92;98;100].

Für die Migration von DZ in T-Zell Gebiete der sekundären Lymphorgane scheinen besonders pro – inflammatorische Chemokine wie z.B. *macrophage inflammatory protein* MIP-1a und MIP-3a oder *secondary lymphoid tissue chemokines* verantwortlich zu sein [98].

Zielzellen der DZ sind vor allem naive CD4-positive T-Zellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen (ZTL). Nachdem diesen das Antigen präsentiert wurde, wird die zellvermittelte Immunantwort in Gang gesetzt: Die naiven CD4+ T-Zellen differenzieren zu T-Helfer und Gedächtniszellen und sind somit fähig wiederum B-Lymphozyten und ZTL zu stimulieren. Um die Antigen – präsentierende Funktion der DZ noch weiter hoch zu regulieren, sind die Lymphozyten befähigt dies direkt über entsprechende Rezeptorkontakte den DZ zu vermitteln. Das geschieht überwiegend über Interaktion zwischen MHC-TCR und CD40-CD40L [16].

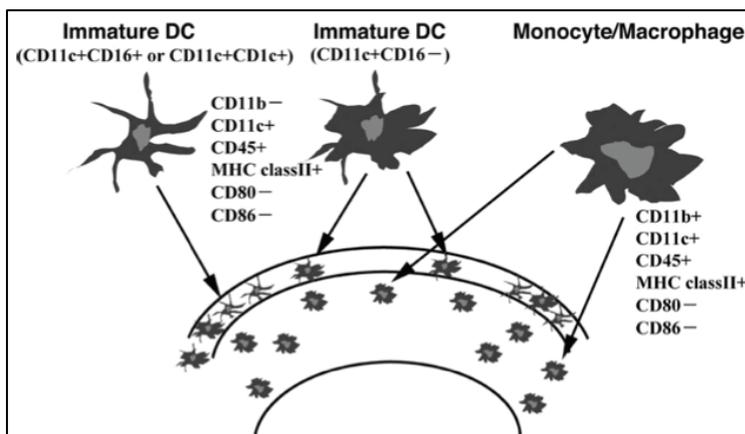
Auch eine direkte Stimulierung von CD8+ ZTL ist durch die DZ möglich. Dazu werden die phagozytierten und prozessierten Antigene über das endoplasmatische Retikulum der Zelle an MHC-I Moleküle gekoppelt und schließlich im Komplex an der Oberfläche den ZTL präsentiert. Diese sind wiederum befähigt etwaige Zellen zu eliminieren. Bei Studien an Mäusen fand man einen kurzen Lebenszyklus der DZ, wenn sie erstmal im Lymphknoten waren – nach Antigenpräsentation gingen die Zellen in Apoptose [87;98].

### 3.2. Verteilung der Langerhanszellen in der Kornea

Viele Wissenschaftler sind bis vor kurzem davon ausgegangen, dass die Kornea mit zu den immunprivilegierten Geweben gehört und von der Immunabwehr abgeschirmt ist [83;105].

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzuntersuchungen und seit Einführung der in vivo anwendbaren konfokalen Laser Scanning Mikroskopie konnte jedoch in mehreren getrennt durchgeführten Studien die Präsenz von Dendritischen Zellen im Epithel der Kornea nachgewiesen werden. Mayer et al. konnten 2007 Langerhanszell – spezifische Oberflächenmarker mittels Immunfluoreszenz nachweisen: Langerin+/CD1a+/HLA-DR+ LZ (ca. 100 Zellen/mm<sup>2</sup>) wurden im Epithel und vorderen Stroma bei frischen Hornhäuten sowie in der Limbusregion und der Hornhautperipherie bis zu 83 Tage lang bei in Kultur befindlichen Hornhäuten gefunden [78]. Schon Rodrigues und Gillette bestimmten die Dichte von LZ der Kornea in den 1980er Jahren. Dabei kam Gillette auf ca. 75-150 Zellen / mm<sup>2</sup> in der Hornhautperipherie und auf ca. 25-50 Zellen / mm<sup>2</sup> in der parazentralen Hornhautregion. Eine zum Hornhautzentrum hin abnehmende Dichte der LZ wurde dabei beschrieben [34;91].

Lange war die Präsenz von LZ im Zentrum der Kornea fraglich. Hamrah et al. konnten 2002 jedoch MHC-II negative LZ in der parazentralen und zentralen Region der Hornhaut bei gesunden Mäusen nachweisen [48]. MHC-II positive LZ wurden in der Peripherie und Limbusregion nachgewiesen. Dies könnte für eine Reifung der LZ schon in der Kornea sprechen – ursprünglich intrazellulär befindliche MHC-II werden an die Zelloberfläche der LZ auf dem Weg zur T-Zellregion der Lymphknoten transportiert (siehe oben). In entzündeten Hornhäuten waren MHC-II positive LZ in allen Regionen vorhanden, zusätzlich wiesen diese zum Teil co – stimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD80 und CD86 auf – was bereits für eine Aktivierung und Befähigung zur Antigenpräsentation der LZ spricht [34;48].



**Abb. 5 Verteilung von LZ in der Hornhaut [119]:**

Die Dendritischen Zellen konnten u. a. aufgrund ihres Erscheinungsbildes und des markanten CD11c positiven Markers klassifiziert werden.

### 3.3. Darstellung der Langerhanszellen in vivo mit konfokaler Mikroskopie

Seit der Einführung des Rostocker Cornea Moduls für den Heidelberg Retina Tomographen II ist es möglich auch die Hornhaut im Schnittbildverfahren darzustellen und so einzelne Zellen morphologisch und quantitativ zu bestimmen. Wie schon beschrieben, lassen sich die LZ als 10 – 15 µm große helle Zellkörper mit den ebenfalls bis zu 15 µm langen markanten Fortsätzen ausgestattet darstellen. Situiert sind die LZ im Hornhautepithel auf Höhe der unteren Flügelzellschicht, der Basalzellschicht und dem subepithelialen Nervenplexus. Dabei können einerseits juvenile Zellen ohne Fortsätze, andererseits entwickelte Zellen beobachtet werden, die über ihre Ausläufer interdigitierende Netzwerke bilden. Zumeist kommen dendritenreiche Zellen in der Hornhautperipherie vor. Solche ohne Fortsätze können in allen Bereichen der Hornhaut erfasst werden.

Konfokal mikroskopisch wurden LZ unter anderem von den Forschungsgruppen um Hamrah (2002) bei der Maus und von Zhivov (2005) sowie Mastropasqua (2006) beim Menschen nachgewiesen [48;76;126].

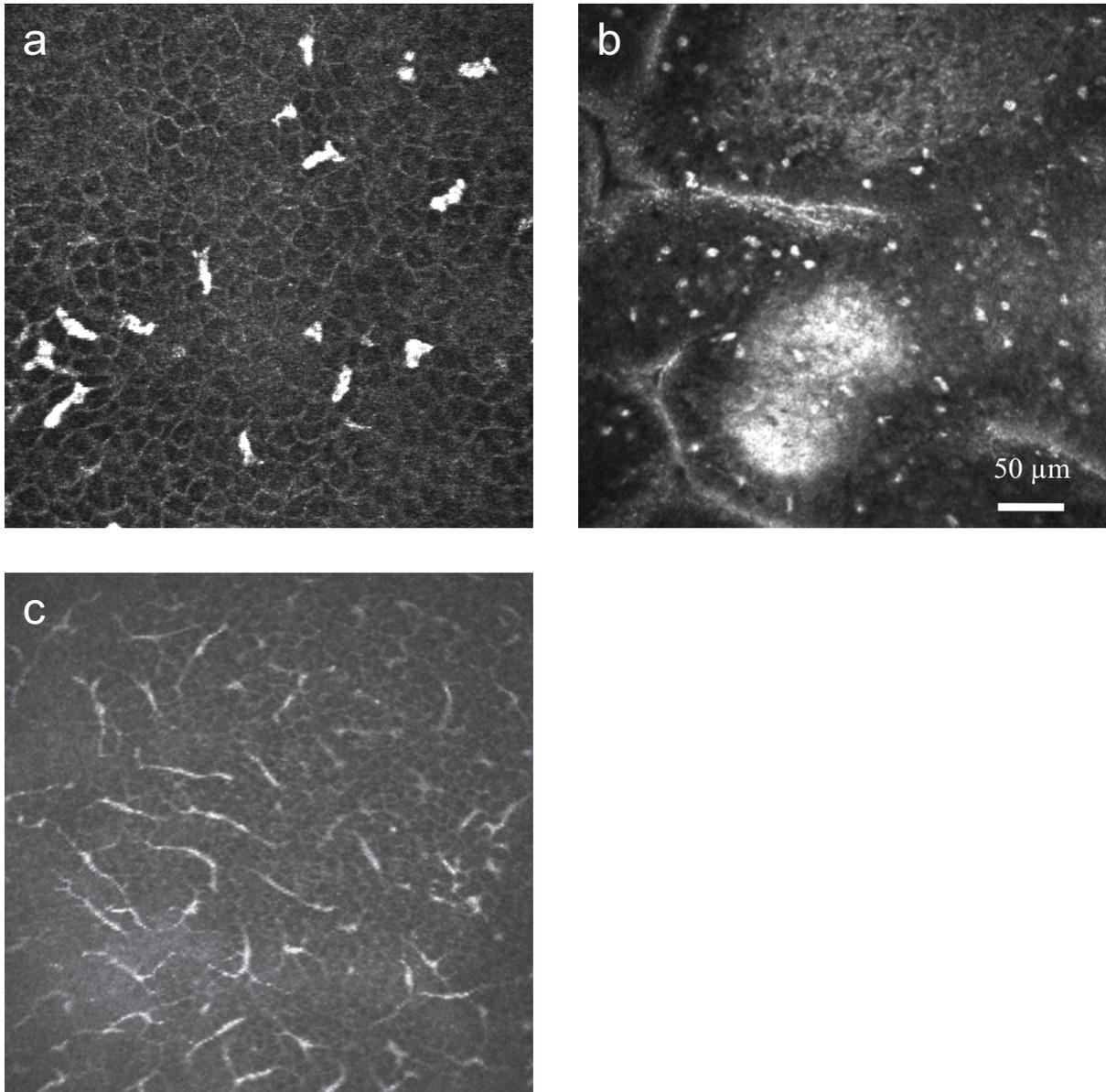
Zhivov et al. war es 2005 möglich mit Hilfe der in vivo konfokalen Mikroskopie an insgesamt 112 gesunden Probanden ohne okuläre Entzündungen oder Operationen in der Krankengeschichte die Präsenz von LZ im Epithel der zentralen Kornea aufzuzeigen. Dabei wurden im Durchschnitt 34 Zellen / mm<sup>2</sup> (0 – 64 Zellen / mm<sup>2</sup>) zentral und 98 Zellen / mm<sup>2</sup> (0 – 208 Zellen / mm<sup>2</sup>) peripher gezählt [126].

Die Vermutung, dass es sich auch um Makrophagen mit dendritischen Strukturen handeln könnte, wurde 2007 von Mayer mit dem Nachweis von für LZ typischen Oberflächenmarkern widerlegt [78].

Die folgenden Zellen müssen differentialdiagnostisch bei der konfokalen Mikroskopie in Betracht gezogen werden und kommen auch bei gesunden Menschen vor.

Makrophagen und Monozyten können als hyperfluoreszente Strukturen in der konfokalen Mikroskopie auffallen. Auch Fortsätze wie bei den LZ treten als kleine Ausstülpungen der Zellmembran in Erscheinung. Die Arbeitsgruppe um Hamrah und Yamagami konnte allerdings mittels Immunfluoreszenzstudien aufzeigen, dass Makrophagen zentral meist im

anterioren Stroma und peripher gewöhnlich im posterioren Stroma sesshaft sind und üblicherweise nicht im Epithel vorkommen. Außerdem ist die Anzahl dieser APZ mit 3 % in der Hornhaut im Allgemeinen insgesamt viel geringer (Abb. 5) [47;119].



**Abb. 6 Differenzierung verschiedener Zellen in der konfokalen Mikroskopie [123]:**

- (a) Hyperreflektive, entrundete Zellen ohne Ausläufer: vermutlich Makrophagen
- (b) Kleinere hyperreflektive Zellen in tarsaler Bindehaut: vermutlich Lymphozyten
- (c) Große Zellen mit langen Dendriten im Hornhautepithel: Langerhanszellen

Lymphozyten und Leukozyten lassen sich konfokal mikroskopisch nur schwer auseinander halten. Beide sind von der Größe her mit LZ vergleichbar. Gegen diesen Zelltyp spricht, dass die Präsenz von Leukozyten in nicht entzündeten Hornhäuten äußerst ungewöhnlich wäre und bei Nachweis für eine subklinische Infektion sprechen würde, welche wir bei gesunden Probanden nahezu ausschließen können (Abb. 6).

Von den hier erwähnten in Frage kommenden Zellen bilden darüber hinaus nur LZ ein Netzwerk über dendritische Fortsätze aus.

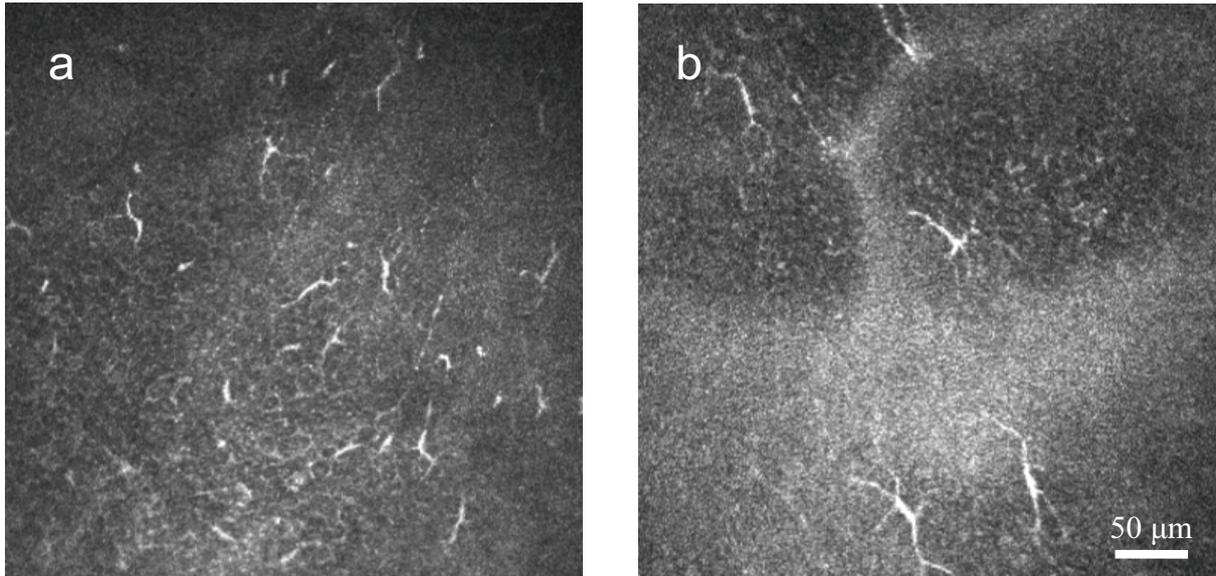
Tabelle 1 [123] zeigt konfokal mikroskopisch sichtbare Merkmale der verschiedenen Zellpopulationen, die in der Hornhaut vorkommen können.

Typ der Leukozyten	Größe	Charakteristika
Granulozyten	< 10 µm	kleinste Gruppe von Leukozyten, charakterisiert durch unregelmäßig gelappte Zellkerne und das Vorhandensein kleiner Partikel im Zytoplasma, diese Granula sind im KFM nicht darstellbar
Monozyten	ca. 20 µm	Vorläufer der Makrophagen im Blut, große runde Zellen, typische Lokalisation – Blutgefäße der Bindehaut oder vaskularisierte Hornhaut
Makrophagen	12-15 µm	hyperreflektive, entrundete Zellen, typischerweise bei Ulzera bzw. Infiltraten im Hornhautepithel sichtbar
Lymphozyten	10-12 µm	hyperreflektive Zellen, kleiner als Makrophagen, typische Lokalisation in palpebraler oder tarsaler Bindehaut

**Tab. 1 Merkmale der verschiedenen Zellpopulationen wie sie konfokal mikroskopisch in der Hornhaut sichtbar werden (Abb. 6) [123]:**

Folgende Merkmale machen die Identifikation der LZ in der Kornea möglich (Abb. 7):

- die bis zu 15 µm langen markanten dendritischen Zellausläufer
- die hyperreflektiven Zellkörper
- die Größe (10-15 µm)
- die typische Lokalisation im Epithel und subepithelialen Nervenplexus
- und die typischen im Netzwerk angeordneten Zellen [123;127]



**Abb. 7 Beispielaufnahmen von Langerhanszellen im Hornhautepithel wie sie in der konfokalen Laser Mikroskopie zu sehen sind:**

Verschiedene Entwicklungsstufen der antigenpräsentierenden Zellen:

(a) Kleine mit wenigen dendritischen Fortsätzen ausgestattete Zellen

(b) Höher entwickelte Zellen mit langen und vielen Ausläufern

## 4. Konservierungsmittel

Bevor ein Fertigarzneimittel auf den deutschen Markt gebracht werden darf, wird es einem ausgiebigen Prüfungsverfahren der Arzneimittelbehörde des Gesundheitsministeriums unterzogen. Dabei werden nicht nur der pharmakologisch wirksame Bestandteil, sondern auch Zusatzstoffe wie Konservierungsmittel auf Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit untersucht. Anforderung an diese Substanzen ist, die Arznei vor und nach erstmaligem Öffnen so keimarm wie möglich zu halten, also vorrangig das Vorkommen und Wachstum von Bakterien und Pilzen zu verhindern. Dabei bedienen sich die meisten Substanzen mindestens einer der folgenden Mechanismen: Unspezifische Auflösung von Membranstrukturen, Erhöhung der Permeabilität von Membranen für Ionen oder Hemmung des Zellstoffwechsels. Da diese Mechanismen überwiegend unspezifisch sind, also auch eukaryote Zellen betreffen, kann es bei Anwendung am menschlichen Auge zu Arzneimittelreaktionen kommen, die dann natürlich ungewollt sind.

Im folgenden Kapitel werden die derzeit in der Ophthalmologie verwendeten Konservierungsmittel vorgestellt. Dabei wird besonders auf die quaternären Ammoniakverbindungen sowie die Vor- und Nachteile der Stoffe eingegangen.

### 4.1. Verfügbare Substanzen

Derzeit werden Stoffe aus insgesamt sechs Substanzgruppen verwendet: Quaternäre Ammoniakverbindungen, organische Quecksilberderivate, Amidine, Alkohole, Parabene und sogenannte oxychlorierte Komplexe. Alle Verbindungen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, pathogene Keime abzutöten und natürlich auch bezüglich ihrer allergenen und potentiell toxischen Eigenschaften [6].

#### *Organische Quecksilberderivate*

Die bakterizide Wirkung dieser Stoffe ist dem Quecksilberion zuzuschreiben: Es verbindet sich mit Sulfationen von bakteriellen Proteinen und führt somit zu deren Denaturierung. Pathogene, die in ihrem Stoffwechsel Enzyme mit Sulfationenbindung verwenden, können effektiv abgetötet werden. Dazu gehören vor allem Gram positive und nicht-sporenbildende Organismen. In leicht saurem Milieu sind diese Stoffe besonders wirksam [6].

### *Amidine*

Von den Amidinen wird vor allem Chlorhexidin verwendet. Es gehört zur Gruppe der Bis – diguanide, ist wasserlöslich und besonders wirksam im neutralen oder leicht basischen Milieu. Die bakterizide und fungizide Wirkung wird über eine Auflösung von semi-permeablen Zytoplasmamembranen begründet. Antibakterielles Spektrum sind Gram – positive Kokken und manche Gram negativen Bakterien. Serratia, Proteus und Pseudomonas gehören zu den resistenten Stämmen [6].

### *Alkohole*

Alkohole erhöhen die Lipidlöslichkeit in Membranen und führen somit zu einer Permeabilitätserhöhung derselben. Chlorbutanol wird am häufigsten verwendet und ist gegen Gram positive und negative Bakterien sowie Candida albicans wirksam. Das Phenylethanol wird nur als Zusatz zu anderen Konservierungsmitteln verwendet, weil es für sich nur bedingt desinfizierend wirkt [6].

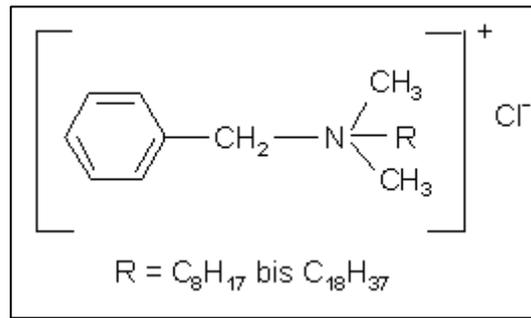
### *Parabene*

Es handelt sich bei diesen Hilfsmitteln um Ester der Para-Hydroxy-Benzoesäure (PHB-Ester). Die desinfizierende Wirkung bleibt auch noch nach Applikation am oder im Menschen für längere Zeit erhalten. Dabre et al. haben Parabene 2004 im Brusttumorgewebe von Frauen nachgewiesen [21]. Sie sind am ehesten in saurem Milieu und gegen Pilze besonders wirksam [6].

### *Oxychlorierte Komplexe*

Diese kleinen Moleküle können leicht durch Zellmembranen diffundieren und interferieren schnell mit subzellulären Strukturen, wie Lipidmembranen sowie Proteinen und stören so den Stoffwechsel. Chloridverbindungen (z.B. NaClO<sub>2</sub>) fügen den Organismen oxidativen Stress zu, indem sie Glutathion – Moleküle oxidieren. Diese sind somit unbrauchbar und können nicht mehr zur Beseitigung von Radikalen im eigenen Organismus verwendet werden. Besonders sensibel reagieren Keime mit niedrigem Glutathionlevel wie z.B. Staphylococcus aureus [6].

## Quaternäre Ammoniakverbindungen



**Abb. 8: Benzalkoniumchlorid [99]**

Zu den wohl am meisten verwendeten Konservierungsmitteln gehört das Benzalkoniumchlorid (BAC). Es ist in nahezu 80 % aller Ophthalmika der „Roten Liste“ enthalten und findet auch in anderen Produkten Anwendung (Weichspüler, Pflegeprodukte, Textilhilfsmittel, Bohrschlämmen der Ölindustrie etc.). Wie auch einige der anderen Stoffe fungiert es als hoch aktives Lösungsmittel: Die semi-permeablen Zytoplasmamembranen werden zerstört und bakterielle Zellwände aufgelöst. Dabei lagert sich BAC an die Oberfläche von Mikroorganismen und auch eukaryonten Zellen an und wird adsorbiert. Eine wichtige Rolle spielen bei der Wirkung des BACs der quaternäre Stickstoff und eine bzw. mehrere lipophile Seitenketten. Diese hydrophoben Ketten aus mindestens acht Kohlenstoffatomen werden für die Wechselwirkungen an den Zellmembranen verantwortlich gemacht. Zusätzlich kann der kationische Molekülteil die Ladung von Proteinen neutralisieren und diese somit auch gleichzeitig denaturieren. Da diese Substanz im leicht sauren bis leicht alkalischen Milieu und bei Körpertemperatur am besten wirkt, eignet sie sich zur Keimabtötung lokal ideal [6;99].

Als wirksamstes Konservierungsmittel in Augentropfen hat sich die Dreierkombination aus 0,01 % BAC, 0,5 % EDTA und 0,5 - 0,6 % Benzylalkohol bewährt [99].

Die bakterizide Wirkung richtet sich vor allem gegen Gram positive (Staph. aureus) und Gram negative Bakterien (Pseudomonas aeruginosa nur bei Zusatz mit 0,1 % EDTA), die geringe fungizide Aktivität gegen Candida albicans und Aspergillus fumigatus. BAC kann durch Eiter, Serum oder Eiweiß inaktiviert werden [6;99].

## 4.2. Nutzen und Notwendigkeit von Konservierungsmitteln

Da es sich bei vielen der verwendeten Medikamente in der Augenheilkunde um Langzeittherapeutika handelt (z.B. antiglaukomatöse Therapie), ist es ökonomischer und praktikabler nicht Einmaldosen, sondern Mehrfachdosen zu gebrauchen. Allerdings lässt sich dies nur realisieren, wenn das angewendete Pharmazeutikum vor allem gegen bakterielle Kontamination durch Zusatzstoffe geschützt ist und die Wirksamkeit nicht negativ beeinflusst wird, das Medikament also möglichst steril und der Wirkstoff stabil bleibt. Wie bereits aufgeführt kommen dabei mehrere Substanzen in Frage. Keines ist nebenwirkungsfrei, vielmehr müssen etwaige ungewollte Arzneimittelwirkungen gegen den Nutzen der applizierten Wirkstoffe abgewogen werden. Zusätzlich sollte natürlich auch die molekulare Stabilität des Wirkstoffes gewährleistet sein.

Für den Patienten sind Mehrfachdosen sicherlich bequemer: Das Medikament kann aus einem Behältnis mehrfach verwendet werden, sodass weniger Arzneimittelgefäße gehandhabt werden müssen. Außerdem muss das entsprechende Präparat nicht speziell gelagert werden (z.B. Schutz vor Licht oder Kühlung). Diese Vorteile wirken sich natürlich auch positiv auf die Compliance des Patienten aus. Auch für den Kostenträger sind konservierungs – mittelhaltige Arzneimittel günstiger.

Die Sicherheit vor bakterieller Kontamination von konservierten Augentropfen wurde in Studien nachgewiesen: Wessels et al. zeigten, dass von 1485 getesteten offenen Augentropfencontainern mit Konservierungsmitteln nur einer (mit einem *Micrococcus*) kontaminiert war (0,07 %) [116]. In einer Studie von Kim et al. wurden 207 mehrfach verwendete Augentropfencontainer ohne Konservierungsstoffe untersucht [59]. Davon zeigten 2,42 % eine bakterielle Kontamination, überwiegend mit Koagulase-negativen Staphylokokken bzw. mit Gram-negativen *Acinetobacter*. Risikofaktoren für kontaminierte Augentropfen waren dabei höheres Alter und ungeschickter Umgang (Berührung der Öffnung mit dem Finger) [59].

### 4.3. Mögliche Konservierungsmittelbedingte Schäden am Auge

Die gewollten toxischen Effekte der Konservierungsmittel gegen Erreger bleiben auch für den menschlichen Organismus nicht ohne Folgen. Bei den ungewollten Nebenwirkungen muss zwischen Allergisierungspotential und direkter Toxizität unterschieden werden. Betroffen sind vor allem die mit dem applizierten Stoff direkt in Kontakt stehenden Oberflächen wie Bindehaut, Augenlider und Kornea.

Eine pharmakokinetisch bedingte, lange Verweilzeit und erhebliche Akkumulation des BACs in Konjunktiva, Hornhautepithel und Stroma prädestiniert dieses Konservierungsmittel besonders, allergische und toxische Reaktionen hervorzuheben. Die langen Halbwertszeiten von ca. 20 Stunden im Epithel und 11 Stunden in der Konjunktiva führen dazu, dass diese Strukturen quasi als Reservoir fungieren. Das BAC kann aus diesen Depots demzufolge nach und nach an benachbarte Gewebe und den Tränenfilm abgegeben werden und wirkt somit noch länger auf okuläre Strukturen ein [17;39].

#### 4.3.1. Allergisierungspotential

Da viele der angewendeten Hilfsmittel auch in anderen weit verbreiteten und gebräuchlichen Verbindungen (z.B. Kosmetika, Desinfektionsmitteln etc.) Verwendung finden, ist bei längerer Applikation eine Sensibilisierung und ein Allergieausbruch möglich. Das Allergisierungspotential von BAC wird derzeit als moderat eingeschätzt. Häufig wird ein der Konjunktivitis ähnelnder Befund mit Hyperämie der Bindehaut und Ekzem der Lider erhoben. Aufgrund der offensichtlichen Symptomatik kann diese verzögerte allergische Typ IV Reaktion (nach Gell und Coombs) schnell diagnostiziert werden und frühzeitig auf ein anderes, z.B. konservierungsmittelfreies Präparat gewechselt werden. Zur Verifizierung kann evtl. ein Hauttest (z.B. „prick test“) durchgeführt werden. [49].

Experimentell ließen sich Sensibilisierungen auf Thiomersal bei Kaninchen und BAC bei Meerschweinchen reproduzieren [2;35]. An allergischen Reaktionen lassen sich je nach Schweregrad folgende Befunde erheben: Chemosis und Hyperämie der Bindehaut, Schleimbildung und Gefäßeinsprossung, Iritis und Zellinfiltrat der Vorderkammer. Da für die Sensibilisierung gegen Stoffe stets eine gewisse atopische Disposition des Individuums vorauszusetzen ist, kommt eine ausgeprägte allergische Reaktion glücklicherweise nur in einer geringen Zahl der Fälle vor, nämlich bei BAC in 4-11 %, je nach Studie [49].

#### 4.3.2. Toxische Effekte am Auge

Bei den toxischen Effekten der Konservierungsmittel spielen interindividuelle Unterschiede bezüglich einer Sensibilisierung kaum eine Rolle, viel mehr sind diese lokalen Veränderungen direkt dosisabhängig und korrelieren mit der Einwirkdauer der Substanz. Imperia et al. zeigten schon 1986 bei in vitro Studien die dosis – und zeitabhängige Korrelation [53]: Während kurze Einwirkzeiten von 5 min den Zellstoffwechsel von Epithelzellen kaum beeinflussten (5 % gehemmt), wurden die Zellen nach 30 min schon erheblich gehemmt (85 %). Arzneimittelübliche BAC – Konzentrationen von 0,01 % kamen dabei zur Anwendung [53]. Besonders scheinen die Integrität der Plasmamembranen und Zellkontakte, die Proliferation sowie der Energiestoffwechsel in Mitochondrien betroffen zu sein. Manche der molekularen Veränderungen sind irreversibel und treten schon bei Konzentrationen auf, die unter den derzeit gebräuchlichen Dosen liegen. Ein Absetzen der Anwendung konservierungs-mittelhaltiger Medikationen garantiert nicht in jedem Fall die Erholung der schon geschädigten Zellen [22;26;53;93].

Quaternäre Ammoniakverbindungen wie das BAC scheinen unter den pharmazeutischen Konservierungsmitteln besonders toxisch zu sein. Tripathi et al. zeigten in vitro, dass die mitotische Aktivität und Sekretion von Cytokinen der Hornhautepithelzellen schon nach einmaliger Applikation von 0,01 % BAC gehemmt wurde. Auch Vergleiche zwischen Ophthalmika mit und ohne Konservierungsmittel (BAC) zeigten erhebliche Einschränkungen der Vitalität von konjunktivalen Zellen, die mit dem Konservierungsmittel in Kontakt kamen [113].

Bei allen erfolgten Studien muss natürlich berücksichtigt werden, dass in der Realität nicht von absoluten Konzentrationen ausgegangen werden kann. Viel mehr werden die applizierten Lösungen sofort durch den Tränenfilm und Tränenfluss verdünnt und abtransportiert, sodass der potentiell zelltoxische Effekt eigentlich nur durch geringere Konzentrationen der Stoffe hervorgerufen wird und somit weniger ausgeprägt ist. Bei Langzeitanwendung oder Applikation mehrerer Ophthalmika simultan kommt es allerdings zur Akkumulation der Stoffe in der Hornhaut. Dies macht das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen wahrscheinlicher. Zu den gefürchteten Zellveränderungen gehören: Verlust von Kontakten zwischen benachbarten Epithelzellen – somit auch Auflösung der Barriere und weitere Permeation von Stoffen – Schwund von Mikrovilli, Mitosearrest und Zelltod – dosisabhängig entweder durch Apoptose (niedrige Konzentration) oder Nekrose (hohe Konzentration). Dies

wurde 1999 anschaulich in einer Studie von de Saint et al. gezeigt: Menschliche konjunktivale Zellreihen wurden für jeweils zehn Minuten verschiedenen Konzentrationen von BAC ausgesetzt (0,1 % – 0,0001 %). Anschließend wurden die Zellen nach 3, 24, 48 und 72 Stunden in physiologischem Milieu untersucht. Bei einer BAC Konzentration von 0,1 % bzw. 0,05 % erfolgte die Zellyse unmittelbar nach Behandlung. Bei der mit 0,01 % exponierten Zellreihe starben sämtliche Zellen innerhalb von 24 Stunden ab. Dabei wurden folgende molekularbiologische Beobachtungen als Beweis aufgenommen: Kondensation von Chromatin und DNA – Fragmenten, Reduktion des Zellvolumens und Expression des Apoptosemarkers Apo 2,7. Bei geringeren BAC – Konzentrationen wurde ein Wachstumsarrest und dosisabhängiger programmierter Zelltod durch Apoptose nach 24 bis 72 Stunden beobachtet [22]. Auch Grant et al. zeigten 1996 Veränderungen im Zellstoffwechsel von Korneaepithelzellen 24 Stunden nach Behandlung mit BAC von Kaninchen auf: Dosisabhängig verringerte sich der ATP/ADP Quotient sowie der intrazelluläre pH – Wert. Das intrazelluläre Kalzium ( $Ca^{2+}$ ) stieg an [37]. Die Parameter können zur Evaluierung der Homeostase der Epithelzellen herangezogen werden und geben Hinweise auf die verringerte Vitalität der Zellen [23;24;37;113].

#### 4.3.3. Oxidativer Stress

Eine weitere ungewollte Nebenwirkung der quaternären Ammoniakverbindungen ist die Induktion von oxidativem Stress. Debbasch et al. fanden unter diesen Verbindungen die höchste Produktion von Radikalen – nämlich  $H_2O_2$  und  $O_2^-$ , welche gleichzeitig mit erhöhter Zellmembraninstabilität und Apoptoseraten in der untersuchten Zellreihe einhergingen. Eine vorherige Inkubation der Zellen mit Vitamin E verringerte die durch BAC hervorgerufenen Schäden signifikant [25].

#### 4.3.4. Immunreaktion des Körpers

Auch die Immunreaktion des Körpers bleibt nach andauernder Stimulation mit körperfremden Stoffen nicht stumm. So war es Baudouin et al. möglich Entzündungszellen immunhistochemisch in humanen Biopsien von Konjunktiven und Trabekelwerk postoperativ nach längerer Behandlung mit konservierungsmittelhaltigen Ophthalmika nachzuweisen [7]: 24 von 26 Bindehautpräparate und 21 von 24 Trabekelpräparate waren mit Entzündungszellen infiltriert. Bei den nicht medikamentös, primär operativ behandelten Patienten war lediglich eine von fünf Biopsien positiv auf Entzündungsmarker getestet. Wie schon beschrieben gehen Zellen nicht nur programmiert in den Zelltod, sondern lysieren auch direkt und gehen

in Nekrose über. Dabei erscheinen sonst ausschließlich intrazellulär vorkommende Proteine plötzlich extrazellulär. Zusätzlich werden Proteine wahrscheinlich auch direkt von Konservierungsmitteln denaturiert. Beide Mechanismen würden eine Stimulation immunkompetenter Zellen erklären. Es ist schon länger bekannt, dass okuläre Strukturen keineswegs immunprivilegiertes Gewebe darstellen – Langerhanszellen kommen nicht nur in der Konjunktiva sondern auch in der Kornea vor. Normalerweise ruhend, nehmen diese HLA Klasse II - positiven Zellen die applizierten körperfremden Stoffe auf, prozessieren sie und präsentieren sie als Antigene, um letztendlich eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. In Studien mit Kaninchen wurde eine vermehrte Einwanderung von Fibroblasten mit vermehrter subepithelialer Kollagenbildung in den Konjunktiven bei Anwendung von in BAC konserviertem Metipranolol über sechs Monate gefunden [80]. Diese Proliferation von subepithelialen Fibroblasten verschlechtert den Erfolg von operativen Eingriffen zur Behandlung von Glaukomen. Eine durchgeführte Sklerektomie verschließt sich schneller und verringert somit den Nutzen der Operation [7;9;80;120].

#### 4.3.5. Wirkung auf den Tränenfilm

Als unspezifische Lösungsmittel wirken Konservierungsmittel auch auf den Hornhaut – protektiven Tränenfilm: Die Lipidschichten des Films werden schon bei einmaliger Applikation von 0,0001 % BAC aufgelöst. Dies wiederum führt zu einer erheblichen Verringerung (um 50 %) der Tränenfilm-Aufreißzeit (*break – up – time*, BUT), was die Hornhaut – benetzende Funktion der Tränenflüssigkeit wesentlich vermindert. Folglich wird das Auftreten einer Keratokonjunktivitis sicca mit Trockenheitsgefühl, Fremdkörpergefühl und Brennen begünstigt. In ausgeprägten Fällen können dazu noch eine punktförmige Eintrübung des Korneaepithels oder Epithelfäden auftreten [84;117].

Zu den schwerwiegendsten Nebenwirkungen von Zusatzstoffen zählen Mikrodefekte an der Kornea. So genannte Stippungen können mittels Fluoreszenz-Färbung in einigen Fällen nach vierwöchiger BAC Anwendung am Auge mit Spaltlampenuntersuchung dargestellt werden. Imayasu et al. haben dazu den Gehalt an Laktatdehydrogenase und Albumin in der Tränenflüssigkeit gemessen. Beide Substanzen spiegeln den auf die Kornea einwirkenden Stress wider und korrelierten in der Konzentration mit dem Auftreten von Mikroläsionen [33;52;120].

#### 4.3.6. Einfluss auf die Barrierefunktion des Epithels

Auch die Barrierefunktion des Epithels schwindet zunehmend mit Behandlung von BAC – haltigen (0,01 %) Substanzen: Lopez et al. verzeichneten eine bis zu hundertfache Aufnahme der verwendeten Testsubstanz (5,6-Carboxyfluoreszein) im Vergleich zur Kontrollgruppe [72]. Andere Lösungen mit Thiomersal bzw. Polyquad erhöhten die Aufnahme der Testsubstanz nur bis zu vierfach; Lösungen ohne jegliche Konservierungsmittel führten zu keiner Änderung der Aufnahme. Dabei korrelierte in elektronenmikroskopischen Untersuchungen wiederum der Epithelschaden mit der 5,6-Carboxyfluoreszinaufnahme. Das hierzu verwendete Rutheniumrot penetrierte in der BAC – Gruppe bis in die Basalzellschicht, während es bei den anderen Substanzen nur bis ins oberflächliche Epithel vordrang. Die Zellen wiesen morphologische Änderungen mit vermehrter Vakuolenbildung auf. Potentiell toxische Substanzen und Pathogene werden weniger effektiv daran gehindert in tiefere okuläre Strukturen vorzudringen. BAC verbleibt länger und in höheren Mengen in der Kornea [72].

Die schon beschriebenen verringerten Zellkontakte wirken sich auch auf eine Defektheilung der Kornea durch Reepithelialisierung negativ aus. Schon geringste Konzentrationen BACs in Ophthalmika führen zu einer Hemmung der Zelladhäsion mittels Fibronectin und verzögern somit den Heilungsprozess [19;96].

#### 4.3.7. Wirkung auf tiefere anatomische Strukturen des Auges

Da die Penetration des BACs bei kontinuierlicher Anwendung in tiefere anatomische Strukturen des Auges fortschreitet, treten auch hier morphologische Veränderungen auf: So konnte z.B. von Samples et al. in vitro nachgewiesen werden, dass das Wachstum von Zellen des Trabekelwerks schon bei geringsten Konzentrationen (0,0001 %) gehemmt wurde [97]. Dies wiederum hat Auswirkungen auf die Erfolgsrate von Trabekelektomien bei Glaukompatienten, die schon länger präoperativ mit konservierungsmittelhaltigen Medikamenten therapiert worden sind. Auch am Trabekelwerk konnten in Apoptose gegangene Zellen, durch Exposition mit 0,0001 % BAC über 15 Minuten induziert, nachgewiesen werden [44;45;66].

An Linsenepithelzellen wurde von Goto et al. in vitro ebenfalls eine dosisabhängige Schädigung bzw. Immunstimulation der Zellen durch BAC (0,02 %) gezeigt. So nahm die Sekretion von Zellmediatoren wie Prostaglandin E<sub>2</sub>, Interleukin-1 alpha und Interleukin-6

dosisabhängig zu. Dies kann wiederum zu einer erhöhten Entzündungsrate und Ausbildung eines zystischen Makulaödems nach Kataraktoperation führen [36;82].

Auch an der Retina wurden pathologische Veränderungen bei längerer Anwendung von BAC gefunden. Chou et al. injizierten dazu handelsübliche, mit BAC konservierte Betablocker (jeweils 0,2 ml) täglich über zwei Wochen subkonjunktival bei pigmentierten Kaninchen und Albinos. Schon nach einer Woche konnten Veränderungen im Elektroretinogramm in Form von Amplitudenabnahmen in den A – und B – Wellen festgestellt werden. Die histologischen Untersuchungen ergaben eine Netzhautablösung und allgemeinen Zellschwund sowie Atrophie der Choroidea und des pigmentierten Epithels der Retina. Da diese Veränderungen nicht in der mit konservierungsmittelfreien Medikamenten behandelten Kontrollgruppe und nur bei pigmentierten Kaninchen auftraten, ist der toxische Einfluss des BAC sehr wahrscheinlich, dieses akkumuliert wahrscheinlich im Pigmentepithel. Ob es auch bei topischer Anwendung von BAC am Auge zur Penetration und Akkumulation des Stoffes in der Retina kommt ist fraglich, da der Großteil mit dem Tränenfilm verdünnt und weggespült wird [18].

Bei zeitlich begrenzter, oberflächlicher Anwendung von Ophthalmika, z.B. im Rahmen einer temporären antibiotischen Behandlung bei Konjunktivitis, sind die evtl. auftretenden Schäden am Auge durch Konservierungsmittel sicherlich vernachlässigbar. Gefährdete Individuen sind vor allem Glaukompatienten, die über Jahre täglich Medikamente tropfen müssen, um einen akzeptablen Augeninnendruck zu erreichen. Bei medikamentöser Therapie mit Prostaglandinderivaten ist hier zu berücksichtigen, dass die Penetration von Arzneimitteln durch das BAC zusätzlich erhöht wird.

Auch wenn die geschilderten möglichen Schäden am Auge bedrohlich klingen, muss immer bedacht werden, dass sie bis jetzt überwiegend ex vivo oder an Tieren nachgewiesen wurden. In der Realität kommen außerdem geringere Konzentrationen der Konservierungsmittel zur Anwendung, und erfahrungsgemäß wirken die Stoffe bedingt durch den Tränenfluss und Lidschlag auch weniger lange auf das Auge ein. Alternativ kann evtl. auf Präparate als Einmaldosis gewechselt werden – die mutmaßlichen toxischen Effekte der Konservierungsmittel können so eingedämmt werden.

#### 4.4. Konservierungsmittelfreie Präparate und ihre Vorteile

Die aufgeführten, signifikanten unerwünschten Arzneimittelwirkungen legen nahe, sich gänzlich von den Konservierungsmitteln zu distanzieren. Viele Patienten tolerieren bestimmte Präparate aufgrund der Nebenwirkungen (z.B. konjunktivale Reizung) bedingt durch die Zusatzstoffe auch gar nicht mehr. Damit bleibt dem Arzt nur noch die Möglichkeit, auf Arzneimittel ohne Konservierungsmittel zurückzugreifen, die besser verträglich sind.

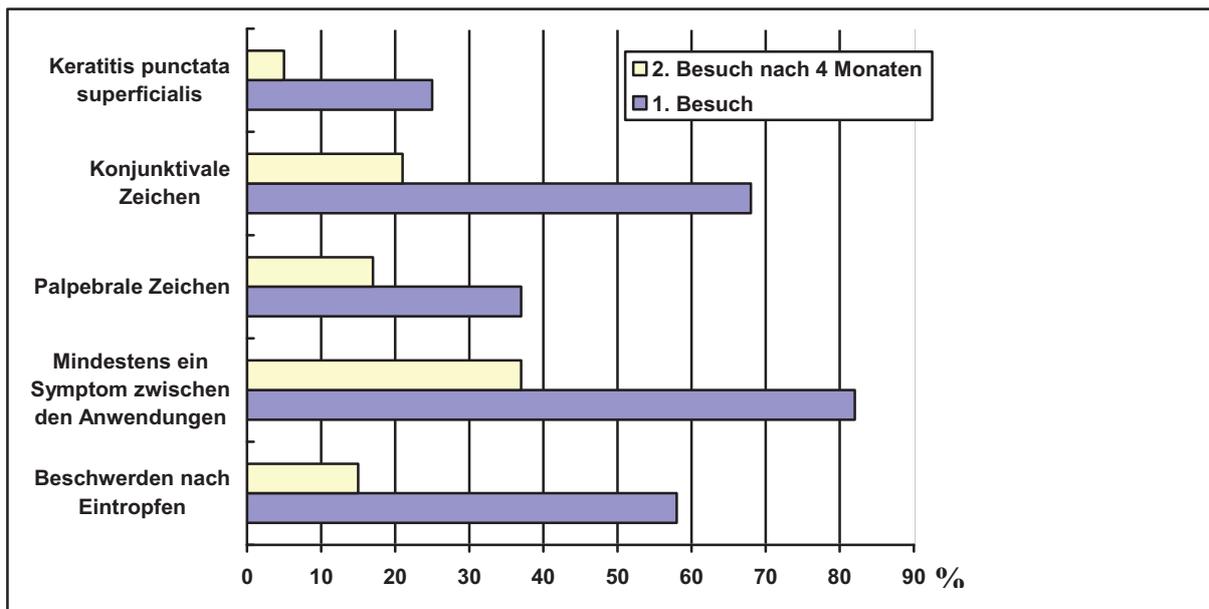
Diese Präparate müssen selbstverständlich die gleichen pharmakologischen und pharmakokinetischen Anforderungen an ein Arzneimittel erfüllen, also in ihrer Wirksamkeit und Verträglichkeit mindestens gleichwertig sein. Viele Hersteller haben heute gleiche Wirkstoffe mit dem Zusatz „EDO“ (Einzeldosisophthiole) oder „sine“ (ohne) auf dem Markt – die Zusatzbezeichnung weist darauf hin, dass dem Präparat kein Konservierungsmittel hinzugefügt wurde. Abgefüllt sind die Medikamente meist in kleinen Ophthiolen zur einmaligen Anwendung.

Eine Auswahl von topisch applizierbaren Medikamenten in der Augenheilkunde mit Benzalkoniumchlorid als Konservierungsstoff zeigt Tabelle 2 auf.

Handelsname	Wirkstoff	Firma	Benzalkoniumchlorid Konzentration
Alphagan	Brimonidin	Allergan	0,005 %
Lumigan	Bimatoprost	Allergan	0,005 %
Timolol CV	Timololhydrogenmaleat	Novartis	0,01 %
Fotil	Pilocarpin+Timolol	Novartis	0,01 %
Dispaclonidin	Clonidin-HCl	Omnivision	0,015 %
Xalatan	Latanoprost	Pfizer	0,02 %

**Tab. 2: Antiglaukom-Therapeutika mit Benzalkoniumchlorid als Konservierungsstoff**

Levrat et al. stellten in einer Studie mit niedergelassenen Augenärzten an Patienten mit chronischem Offenwinkelglaukom eine signifikante Besserung jeglicher Symptome bei Umstellung von konservierungsmittelhaltigen auf unkonservierte Augentropfen fest. Dabei lag nach einer viermonatigen Beobachtungszeit eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Verringerung aller funktionalen Symptome meist um den Faktor 3 bis 4 vor (Abb. 9) [70].



**Abb. 9: Darstellung der Erhebung funktionaler Zeichen und Symptome:**

Änderung der Befunde bei Umstellung von konservierten (Besuch 1) zu unkonservierten Augentropfen (Besuch 2) bei Patienten mit Glaukom bei einer Signifikanz von jeweils  $p < 0,001$  [85].

Zur Ausschaltung von allergischen, der Konjunktivitis ähnlichen Reaktionen wie Hyperämie der Bindehaut und Ekzem der Lider eignen sich die konservierungsmittelfreien Pharmaka sehr gut. Einen speziellen Fall stellt der Verschluss der Tränenwege dar. Durch die längere Verweildauer der toxisch wirkenden Stoffe kann es schnell zu einer Akkumulation in Bindehaut und Hornhaut mit konsekutiver Schädigung der Gewebe kommen (z.B. Mikroläsionen an der Hornhaut) [33]. Wie oben aufgeführt sind diese toxischen Effekte im Gegensatz zu allergischen Reaktionen nicht an eine vorherige Sensibilisierung gebunden und korrelieren direkt mit der Dosis. Daher ist eine Anwendung von konservierungsmittelfreien Präparaten bei diesem Krankheitsbild besonders zu empfehlen. Bei Beschwerden, wie Trockenheitsgefühl, Fremdkörpergefühl und Brennen, sollte der Kliniker auch an die evtl. durch das BAC hervorgerufene Symptomatik eines trockenen Auges denken. Auch hier kann ein konservierungsmittelfreies Präparat möglicherweise Abhilfe schaffen [70;85]. Beachtet werden muss dabei allerdings, dass auch Betablocker, Kortisonpräparate, lokale Adrenalinpräparate und andere systemisch angewandte Medikamente zu einer Keratoconjunktivitis sicca führen können [40].

## 5. Hypothese

Die dieser Arbeit zugrunde liegende klinische Studie zielt darauf ab, einen Nachweis zu erbringen, ob bei Medikation mit konservierungsmittelhaltigen Augentropfen (BAC) bei gesunden Probanden eine Immunstimulation der Hornhaut mit Zunahme der Dichte von Langerhanszellen (LZ) induziert werden kann. Gleichzeitig soll geprüft werden, ob ein direkter Zusammenhang mit der LZ – Dichte und dem Auftreten einer Sicca – Symptomatik besteht.

Nach längerer Applikation der Augentropfen wird eine quantitative Erhöhung der Langerhanszellzahl sowohl zentral als auch peripher erwartet, dabei könnte sich die Zellzahl auch selektiv zentral oder peripher differenzieren. Nach Absetzen der Studienmedikation, also des externen Stimulus, ist mit einem Rückgang der Langerhanszellzahl zu rechnen. Ob die vermehrte Expression der Langerhanszellen alleine dem BAC anzuschulden ist oder allgemein durch den Stimulus – Augentropfen verursacht ist, lässt sich prospektiv im direkten Vergleich zwischen den jeweiligen Augen untersuchen (BAC – Auge vs. Placebo – Auge). Zusätzlich werden Parameter, die eine Sicca – Symptomatik ankündigen, aufgenommen: Tränenfilmaufrisszeit (break-up-time), Tränenproduktion (Schirmer-I-Test) und Bindehautbefund (LIPCOF).

## 6. Methodik

### 6.1. Aufbau der Klinischen Studie

Für die zu untersuchenden Parameter mussten bestimmte Studienbedingungen festgelegt werden, damit die Untersuchungen möglichst objektiv und standardisiert durchzuführen waren. Um diese Kriterien zu erfüllen wurde eine randomisierte Placebo – kontrollierte Doppelblindstudie gewählt, sowohl Patient als auch Untersucher wussten nicht, welche Studienmedikation am rechten sowie linken Auge appliziert wurde. Jeder Proband applizierte in ein Auge die Studienmedikation (\*A) und in das andere die Placebolösung (\*B) dreimal täglich über insgesamt zwölf Wochen. Die Studienmedikationen waren in Einzeldosisbehältern abgefüllt. Die jeweiligen Augen wurden bezüglich der Studienmedikation randomisiert.

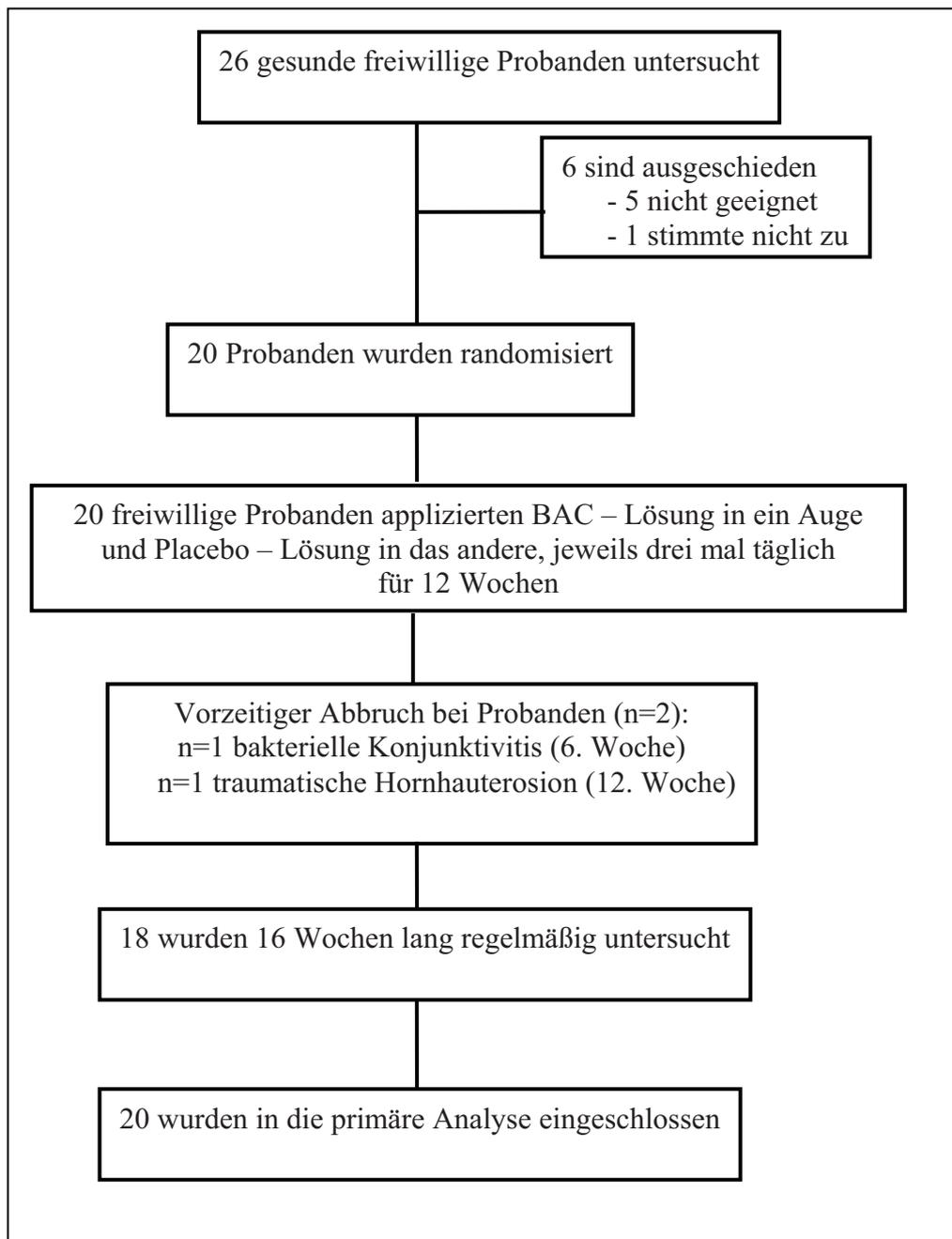
#### Studienmedikation A:

- 0,9 g Natriumchlorid
- 0,5 g Hydroxyethylcellulose 400
- 0,25 g Natriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat
- 10,0 g Edetathaltige Benzalkoniumchlorid-Stammlösung
- 0,1 % Wasser für Injektionszwecke zu 100 g

#### Studienmedikation B:

- 0,9 g Natriumchlorid
- 0,5 g Hydroxyethylcellulose 400
- 0,25 g Natriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat
- 0,1 % Wasser für Injektionszwecke zu 100 g

Für die klinische Studie an Probanden wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock die Genehmigung in Anlehnung an die „*World Medical Association - Declaration of Helsinki*“ eingeholt. Den Probanden wurden der Ablauf (Abb. 10) und mögliche Nebenwirkungen detailliert erläutert, Fragen zur Studie wurden beantwortet, und die Möglichkeit zum vorzeitigen Austreten aus der Studie wurde den Probanden dargelegt. Eine schriftliche Einverständniserklärung lag von jedem Probanden vor.



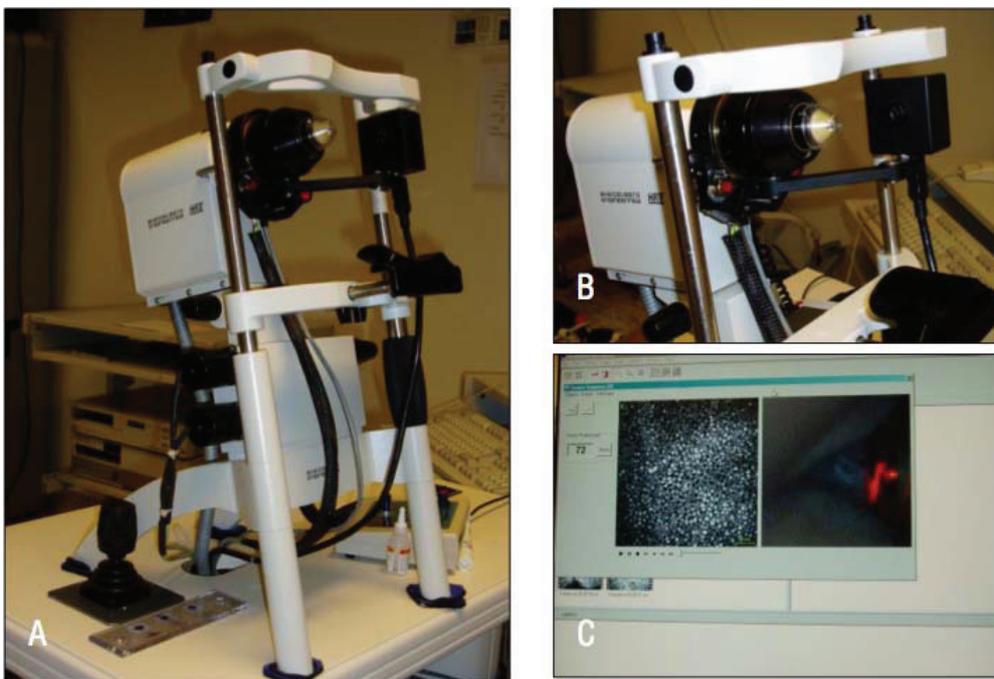
**Abb. 10: Zeitlicher Ablauf der Studie**

Die Studie wurde unter folgender Studiennummer (EudraCT Nr.) registriert: 2006-004908-39

## 6.2. Untersuchungsvorrichtung

Systemkomponente (Abb. 11):

- Heidelberg Retina Tomograph II (HRT II) mit eingebautem Motor (z-Achse) in Kombination mit dem Rostocker Cornea Modul (RCM) mit zusätzlichem Feinstufenmotor (x-y- und z-Scan)
- Personal Computer mit „Heidelberg Eye Explorer“ – Software zur Datenverarbeitung
- Video Kontroll – System mit Kamera und Monitor



**Abb. 11 Untersuchungsvorrichtung [32]:**

A – HRT II mit RCM

B – RCM mit Kamera zur seitlichen Kontrolle

C – Software mit Beispielbild einer Videosequenzaufnahme

Verwendet wurde der HRT II in Kombination mit dem RCM, das mit einem Wasser – Kontakt – Objektiv (Zeiss, 63x/0,95W, 670 nm,  $\infty/0$ , Jena, Deutschland) ausgerüstet war. Mit dieser Vorrichtung wurden ausreichend hochauflösende Bilder produziert und morphologische Details dargestellt. Da bei der Untersuchung ein direkter Kontakt zwischen Objektivaufsatz und Hornhaut notwendig war, wurde eine seitliche Videokontrolle

angewendet. Dies ermöglichte erstens eine genauere Positionierung des Mikroskops und zweitens eine genaue Zuordnung des zu untersuchenden Hornhautbereiches zum mikroskopischen Bild nach der Untersuchung.

Der Fokus der Objektivs konnte am HRT II mit Hilfe eines Joysticks extern in x-y- und z-Achse sowie intern in z-Achse geändert werden, sodass eine präzise Positionierung und Tiefenbestimmung möglich war. Die aufgenommenen Bild-Sequenzen wurden mit der Software „*Heidelberg Eye Explorer*“ gespeichert und ausgewertet.

### 6.3. Studienablauf

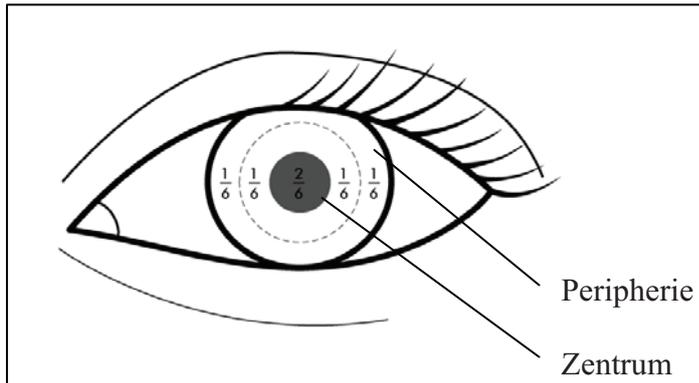
Von der Aufnahmeuntersuchung an erhielt jeder Proband 12 Wochen lang die randomisiert zugeteilte Studienmedikation (A und B) für das linke bzw. das rechte Auge. Der Proband wurde nach Vorlage seiner schriftlichen Einverständniserklärung bei der Erstuntersuchung (Tag 0), nach einer Woche, nach sechs Wochen und zwölf Wochen untersucht. Die genaue Studiendauer richtete sich nach der chronologisch erfolgten Rekrutierung der Probanden der Universitätsaugenklinik Rostock. Vier Wochen nach Beendigung der Studienmedikation (nach insgesamt 16 Wochen) erfolgte eine abschließende Untersuchung insbesondere zur nochmaligen Feststellung der Änderung der Langerhanszellzahl. Die Studie lief von Dezember 2006 bis Juli 2007.

	Aufnahme- untersuchung Tag 0	nach 1 Woche	nach 6 Wochen	nach 12 Wochen	4 Wochen nach Abschluss
Anamnese	x				
Aufklärung / Beratung	x				
Probandeneinverständniserklärung	x				
Ein – und Ausschlusskriterien	x				
Visus	x	x	x	x	x
Spaltlampenuntersuchung	x	x	x	x	x
Intraokularer Druck	x	x	x	x	x
Verträglichkeitsanamnese		x	x	x	
Hornhautsensibilitätsmessung (quantitativ)	x	x	x	x	x
Erfassung der Tränenfilmaufreiß – zeit nach Fluoreszeinfärbung	x	x	x	x	x
Schirmertest	x	x	x	x	x
Vorhandensein von lidkanten – parallelen konjunktivalen Falten	x	x	x	x	x
Fotodokumentation des Ausgangs – befundes (Spaltlampenfotografie)	x			x	x
Basisuntersuchung der konfokalen Mikroskopie an 3 zentralen und 4 peripheren Stellen	x	x	x	x	x
Abschlussbeurteilung				x	x
Erfassung der Veränderungs – charakteristika der Langerhans – zellproliferation					x

**Abb. 12: Ablaufdiagramm der Studie mit den jeweiligen Untersuchungen**

## 6.4. Untersuchungsparameter

Der Hauptwirksamkeitsparameter war die Anzahl der Langerhanszellen im Hornhautzentrum und in der Hornhautperipherie. Zur Erfassung dieser Werte wurde das Hornhautepithel in gesamtter Dicke an drei zentralen und an vier peripheren Stellen (oben, nasal, unten und temporal) mikroskopiert und die Langerhanszellendichte ausgewertet.



**Abb. 13: Schematische Aufteilung der Untersuchungsfelder an der Hornhaut**

Dazu wurde peripher im äußersten Sechstel der Hornhaut, ca. zwei mm vom Limbus entfernt jeweils die Langerhanszellzahl der Peripherie bestimmt (siehe Abb. 13). In einem zentralen Areal, entsprechend zwei Sechstel der Hornhaut, mit einem Durchmesser von ca. vier mm wurde die Langerhanszellzahl des Zentrums bestimmt (siehe Abb. 13).

Weitere Untersuchungsparameter zur Abschätzung der Entwicklung eines trockenen Auges und zur Verträglichkeit der Testsubstanz wurden aufgenommen:

Subjektive Beschwerden und Verträglichkeit auf einer Bewertungsskala von 1-5, wobei 1 keine Beschwerden darstellte und 5 massives Unbehagen angab. Biomikroskopie der Bindehaut (konjunktivale Injektion und LIPCOF), der Hornhaut und der Vorderkammer sowie Bestimmung der Hornhautepitheldicke (Abstand von Superficialzellschicht bis zur Bowmanschen Membran) mittels konfokaler Mikroskopie. Die Hornhautsensibilität wurde mit einem Cochet – Bonnet Esthesiometer an der zentralen Hornhaut bestimmt (Luneau Ophthalmologie, Chartres Cedex, France; Diameter des Monofilamentes: 12/100), dazu wurde das Filament in kompletter Länge von 60 mm angewandt und bei negativer Reaktion um jeweils 5 mm verkürzt. Der Schirmer-I-Tränen-Test wurde mit einem 5 x 35 mm Filterpapierstreifen über 5 min. bestimmt (Siccarta, Bausch & Lomb Dr.Mann Pharma, Berlin, Germany). Zusätzlich wurde die „break-up-time“ (BUT) mittels Spaltlampe und

vorheriger Tränenfilmanfärbung mit Fluorescein bestimmt und der Augeninnendruck mittels Goldmann Tonometer gemessen (Haag-Streit, Bern, Switzerland).

## 6.5. Probanden

20 Probanden (10 männlich und 10 weiblich im Alter von 23 +/- 2 J, Altersverteilung zwischen 21 – 28 J) wurden nach o. g. Schema untersucht. Selektionskriterien für die Auswahl waren: Alter zwischen 18 und 80 Jahre, momentan oder in der Geschichte keine lokalen oder systemischen Erkrankungen, welche Einfluss auf die Hornhaut haben könnten, keine vorausgegangenen okulären Infektionen oder chirurgischen Eingriffe am Auge, keine Allergien, keine stattgefundenen traumatischen Augenverletzungen, keine Anwendung von Kontaktlinsen, keine Applikation von Augentropfen in den vorangegangenen sechs Monaten und bei weiblichen Probanden zum Zeitpunkt der Aufnahmeuntersuchung keine Schwangerschaft.

Zwei Probanden mussten vorzeitig von der Studie ausgeschlossen werden, einer nach 6 Wochen wegen Hornhauterosion (Proband Nr.20), der andere wegen beidseitiger bakterieller Konjunktivitis (Proband Nr.12), nach 12 Wochen. Beide Ereignisse standen nicht im Zusammenhang mit der konfokalen Mikroskopie.

## 6.6. Konfokale in vivo Mikroskopie

Die in vivo Mikroskopie wurde an jedem Auge zu jedem Untersuchungszeitpunkt zentral und peripher durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine Lokalanästhesie am Auge mit Proparacain-POS (Ursapharm, Saarbrücken, Deutschland) durchgeführt und ein Film Carbomer Gel (Visidic, Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland; Refraktionsindex 1,350) als Kontaktmedium in die untere konjunktivale Fornix gegeben. Um Verwacklungseffekte des zu untersuchenden Auges zu vermeiden war der Proband aufgefordert mit dem kontralateralen Auge eine Lichtdiode zu fixieren. Die Dauer der Untersuchung von beiden Augen war gewöhnlich nicht länger als 15 Minuten.

Für jedes Auge wurden pro Untersuchung sieben Bild – Sequenzen aufgenommen: drei vom Hornhautzentrum und vier aus der Hornhautperipherie (oben, unten, temporal und nasal). Dabei wurde der jeweilige Hornhautabschnitt von vorne nach hinten durchgescannt, sodass neben der Bestimmung der Anzahl an Langerhanszellen auch eine Bestimmung der

Epitheldicke möglich war. Die Langerhanszellzahl wurde manuell jeweils in einem Untersuchungsfeld von 200 x 200 µm ausgezählt und wird in Zellen je Quadratmillimeter angegeben.

## 6.7. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte in der Einrichtung für Biometrie und Statistik der Universität Rostock mit freundlicher Unterstützung von Prof. Kundt. Zur Aufarbeitung der erhobenen Daten verwendeten wir die Programme SPSS, Version 15,0 (SPSS Inc. Chicago, USA) und nQuery Advisor 6.0 (Statistical Solutions, Saugus, USA).

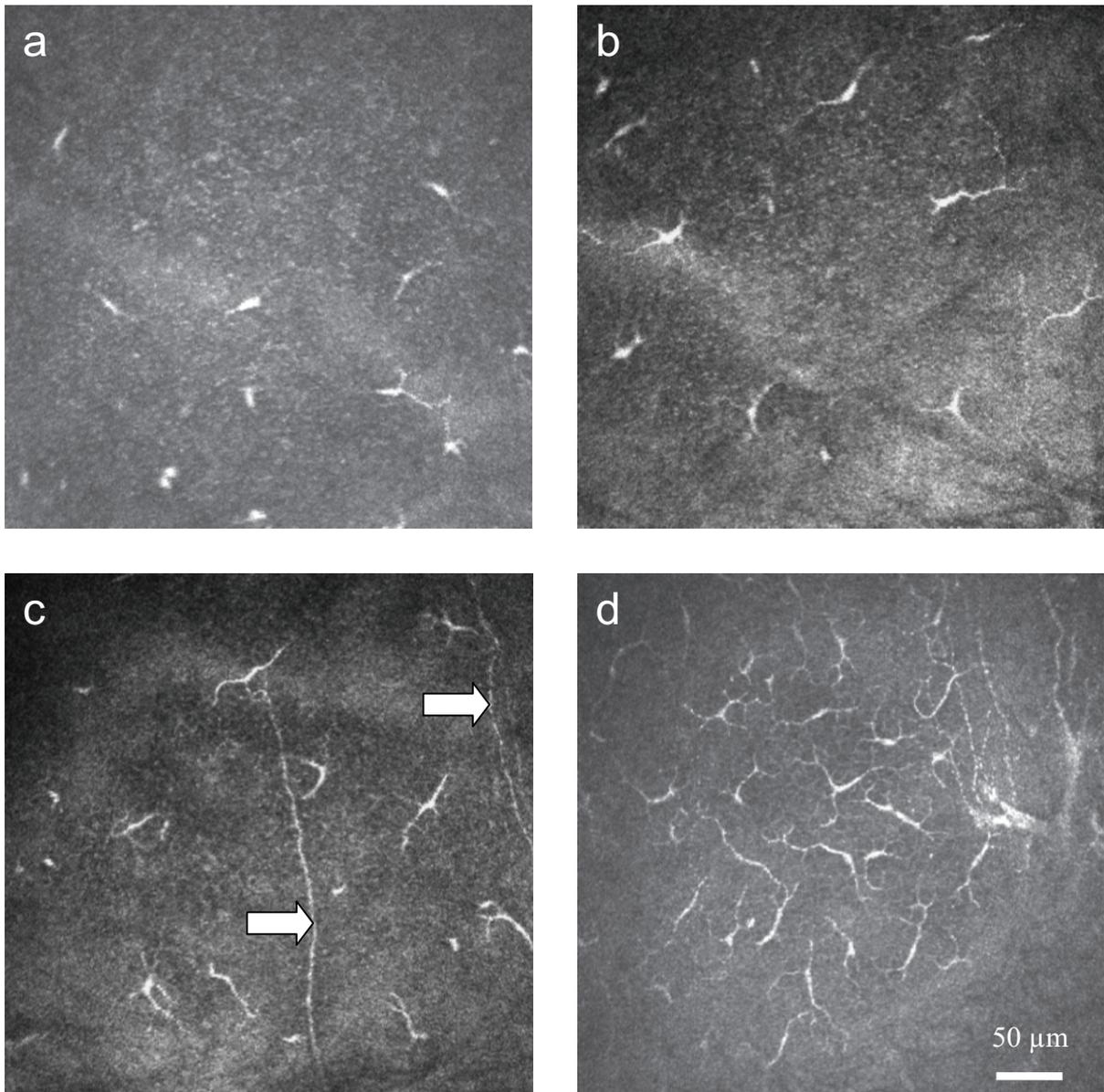
Zur Bestimmung der Anzahl von Probanden wurden vorhergehende Studien herangezogen [126]: Es wurde eine Studienpopulation von 20 Probanden (n=20) gewählt damit Unterschiede in den Durchschnittswerten der LZ von 2,00 LZ / mm<sup>2</sup> im Zentrum der Kornea mit 90%iger Sicherheit, einer Signifikanz von 0,05 und Standardabweichung von 2,50 detektiert werden konnten. In der Peripherie würde diese Studiengröße Unterschiede der LZ-Durchschnittswerte von 5,00 LZ / mm<sup>2</sup>, mit einer Standardabweichung von 6,50 ermöglichen. In der statistischen Auswertung berücksichtigten wir die jeweiligen Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der erhobenen Variablen, außerdem wurde das absolute und relative Auftreten von bestimmten Variablen erhoben. Weil die Effekte der BAC – Lösung in einem (zufällig festgelegten) Auge mit denen der Placebo – Lösung des anderen Auges eines Probanden verglichen wurden und weil die Effekte jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt wurden, verwendeten wir statistische Methoden für abhängige Variablen. Bei Unterschieden von konstanten Variablen zwischen der BAC – und der Placebogruppe und innerhalb der Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten wendeten wir den gepaarten t-Test oder den Wilcoxon – Test für Paardifferenzen an. Die Auswahl des Testes wurde von der Normalverteilung der Unterschiede der Variablen mit Hilfe des Kolmogorov – Smirnov Testes abhängig gemacht. Weil die Anzahl der vorhandenen LZ bei den Probanden jeweils unterschiedlich waren, setzten wir die bei der ersten Untersuchung ermittelte Anzahl an LZ jeweils als Nulllinie (*baseline* – Wert) fest und führten Änderungen in der LZ – Anzahl in folgenden Untersuchungen als prozentuale Änderungen zur Erstuntersuchung (*baseline* – Wert) auf. Dazu verwendeten wir den t-Test für abhängige Stichproben gegen eine Konstante von 100 %. Um bestimmte Werte zwischen den Gruppen zu vergleichen, benutzten wir den Fisher Test. Anpassungen von „alpha level“ wurden mittels der Bonferroni Korrektur vorgenommen, weil es insgesamt fünf Untersuchungszeitpunkte gab. So wurde die

Signifikanz von  $0,05 / 5 = 0,01$  – bei dem Vergleich von Unterschieden zwischen den fünf Untersuchungszeitpunkten korrigiert und von  $0,05 / 4 = 0,0125$  – bei dem Vergleich von Unterschieden zwischen den prozentualen Änderungen zur Erstuntersuchung (*baseline*).

Alle p-Werte wurden mittels zweiseitigem statistischen Test erhoben. Nicht signifikante, Bonferroni – korrigierte p – Werte die zwischen 0,05 und 0,0125 waren wurden als grenzwertig signifikant angesehen. Alle p – Werte die größer als 0,05 waren wurden als nicht signifikant eingestuft.

## 7. Ergebnisse

Mit Hilfe der *in vivo* konfokalen Mikroskopie konnten die Langerhanszellen als helle, korpuläre Partikel mit einem Durchmesser von bis zu 15  $\mu\text{m}$  in einer Tiefe von 35 – 60  $\mu\text{m}$  sichtbar gemacht werden. Es wurden folgende Erscheinungsformen beobachtet: vereinzelte Zellen ohne Fortsätze (Abb. 14 a), Zellen mit Dendriten (Abb. 14 b, c) und über lange interdigitierende Dendriten im Netzwerk angeordnete Zellen (Abb. 14 d). Zellen mit Fortsätzen wurden überwiegend in der Hornhautperipherie gefunden, während solche ohne Zellfortsätze im Zentrum und in der Peripherie zu finden waren. In manchen Fällen waren peripher sowohl Zellen mit als auch Zellen ohne Dendriten gleichzeitig auffindbar.



**Abb. 14 Konfokal mikroskopische Bilder von Langerhanszellen im Korneaepithel:**

- (a) Zentrale Hornhaut eines 25 – jährigen männlichen Probanden bei der Aufnahmeuntersuchung. Die Zellkörper haben wenig ausgebildete Dendriten und liegen im Niveau der basalen Epithelschicht. Tiefe: 49 µm
- (b) Periphere Hornhaut einer 23 – jährigen weiblichen Probandin bei Aufnahmeuntersuchung. Langerhanszellen weisen Fortsätze auf. Tiefe: 52 µm
- (c) Vermehrte Anzahl an Langerhanszellen bei einem 24 – jährigen männlichen Probanden nach 12 Wochen BAC-Exposition. Schicht zeigt außerdem zwei hyperreflektive Nervenfasern des subepithelialen Nervenplexus (siehe Pfeile). Tiefe: 47 µm
- (d) Periphere Hornhaut eines 23 – jährigen männlichen Probanden, in der 12. Woche der

Studie. Die Langerhanszellen sind im Netzwerk über lange interdigitierende Dendriten angeordnet. Tiefe: 50  $\mu\text{m}$

### 7.1. Entwicklung der Langerhanszellzahl im Verlauf der Studie

Zum Zeitpunkt U1 (Aufnahmeuntersuchung) betrug die LZ – Dichte in der Placebo – Gruppe 59  $\pm$  46  $\text{Ze}/\text{mm}^2$  im Zentrum und 102  $\pm$  28  $\text{Ze}/\text{mm}^2$  in der Peripherie und in der BAC – Gruppe 37  $\pm$  29  $\text{Ze}/\text{mm}^2$  zentral und 92  $\pm$  24  $\text{Ze}/\text{mm}^2$  peripher. Die Mittelwerte und Standardabweichungen zu den jeweiligen Untersuchungszeiten U1-U5 sind in der Abb. 15 A und Abb. 15 B präsentiert.

Die Anzahl von Langerhanszellen unterschied sich vor allem im Zentrum (Abb. 15 A) in beiden Medikationsgruppen bei der Aufnahmeuntersuchung U1 (Ausgangswert,  $p < 0,01$ ). Aus diesem Grunde wurden die Werte zu den Untersuchungszeitpunkten 2, 3, 4 und 5 nicht direkt verglichen. Stattdessen wurde jeweils die prozentuale Veränderung zum Untersuchungszeitpunkt 1 gebildet, und diese prozentualen Veränderungen wurden zwischen beiden Medikationsgruppen für das Zentrum und die Peripherie getrennt einem Vergleich unterzogen. Im Folgenden ist die LZ – Dichte der Aufnahmeuntersuchung als 100% zu verstehen.

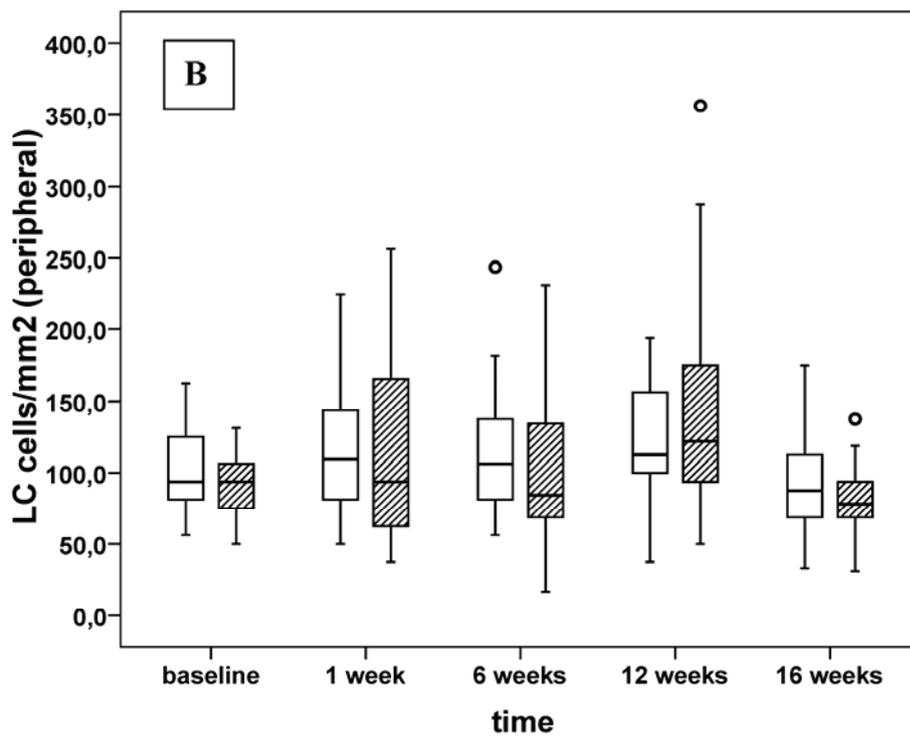
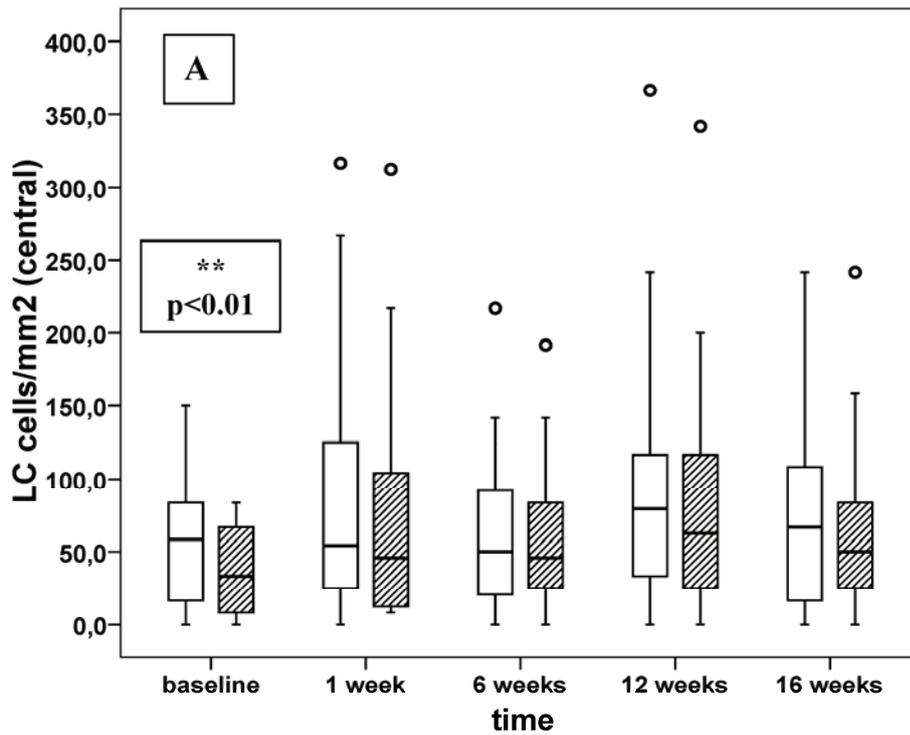


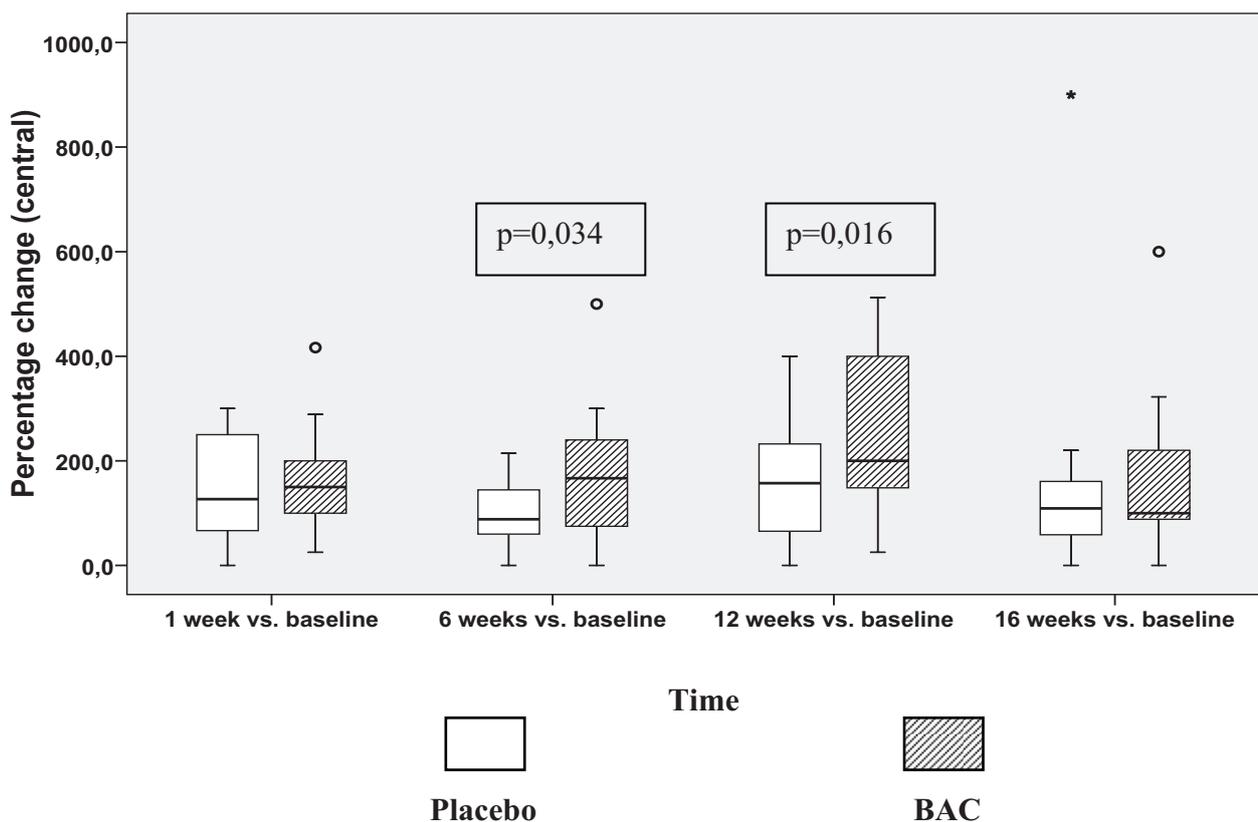
Abb. 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Langerhanszellzahl:

A: im Zentrum und

B: in der Peripherie im zeitlichen Verlauf der Studie

### 7.1.1. Hornhaut – Zentrum

Von der Aufnahmeuntersuchung zur 2. Untersuchung nahm die Langerhanszellichte in der BAC – Gruppe auf 166 +/- 101 % zu, in der Placebogruppe fiel die Zunahme mit 148 +/- 93 % etwas geringer aus. Nach einer Woche ( $p=0,016$ ) und nach sechs Wochen ( $p=0,022$ ) konnten in der BAC – Gruppe grenzwertig signifikante Erhöhungen der LZ – Dichten erhoben werden. Eine signifikante Erhöhung der LZ wurde nach zwölf Wochen festgestellt ( $p=0,001$ ). Eine grenzwertig signifikante ( $p=0,034$ ) Differenz der Langerhanszellendichte zwischen den Medikationsgruppen zeigte sich zum Untersuchungszeitpunkt 3 gegenüber dem Untersuchungszeitpunkt 1 (Abb. 16). In der BAC-Gruppe ergab sich nach sechs Wochen eine durchschnittliche Erhöhung auf 176%, während die Zellzahl in der Placebogruppe in Bezug zur 1. Untersuchung kaum anstieg. Von der 1. zur 4. Untersuchung erhöhte sich die Zellzahl zentral noch mehr und zwar in der BAC-Gruppe auf 263 %, während sie in der Placebogruppe auf nur 165 % anstieg (Abb. 16). Dies ist grenzwertig signifikant ( $p=0,016$ ).

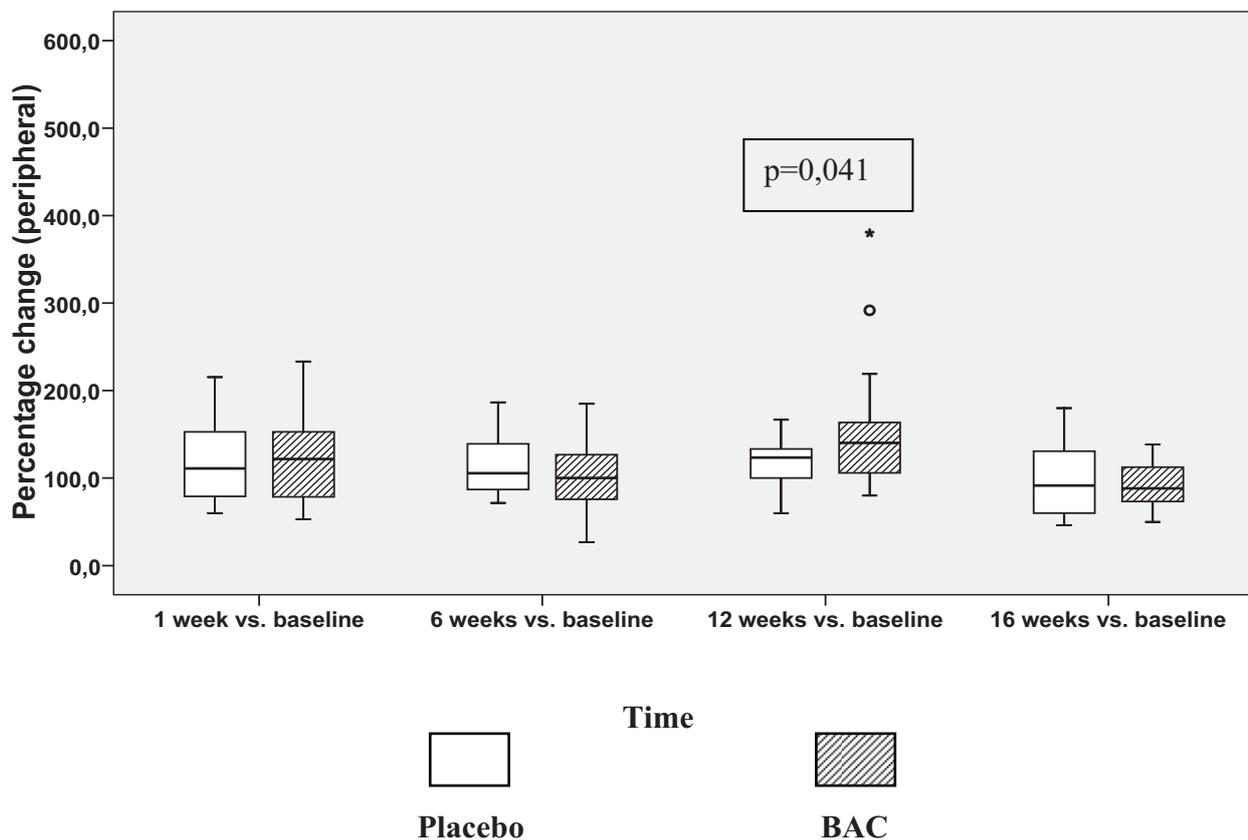


**Abb. 16: Box plots der prozentualen Differenz der Langerhanszellen zur Untersuchung 1 im Zentrum zwischen den Studienmedikationen.**

Vier Wochen nach Absetzen der Studienmedikation lag die Langerhanszellendichte deutlich unter der ehemaligen Höchstdichte unter BAC – Stimulation, allerdings immer noch etwas höher als bei der Aufnahmeuntersuchung. Die Placebo – Kontroll – Gruppe zeigte während der Studie keine signifikanten Änderungen der Langerhanszellendichte. Es war lediglich eine grenzwertig signifikante Erhöhung nach 1 und 12 Wochen zu verzeichnen (jeweils  $p=0,041$ )

### 7.1.2. Hornhaut – Peripherie

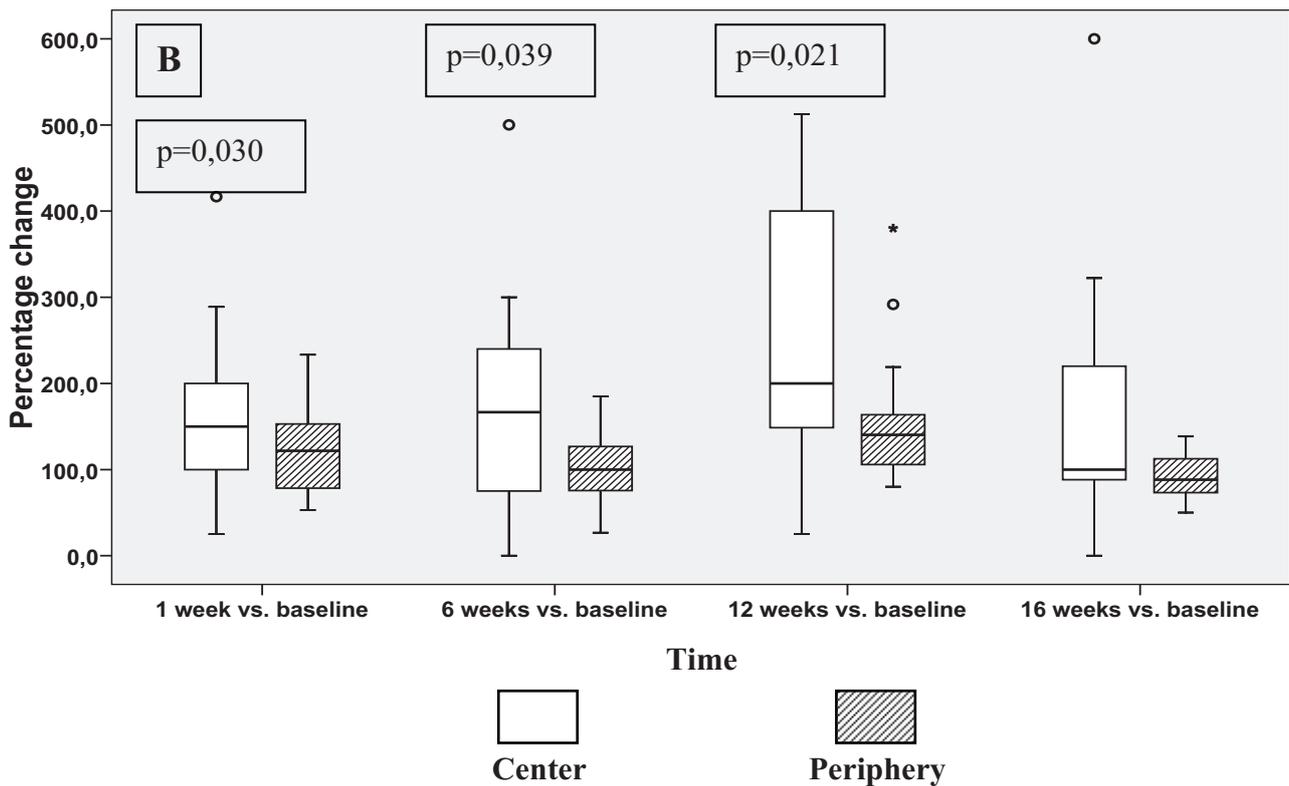
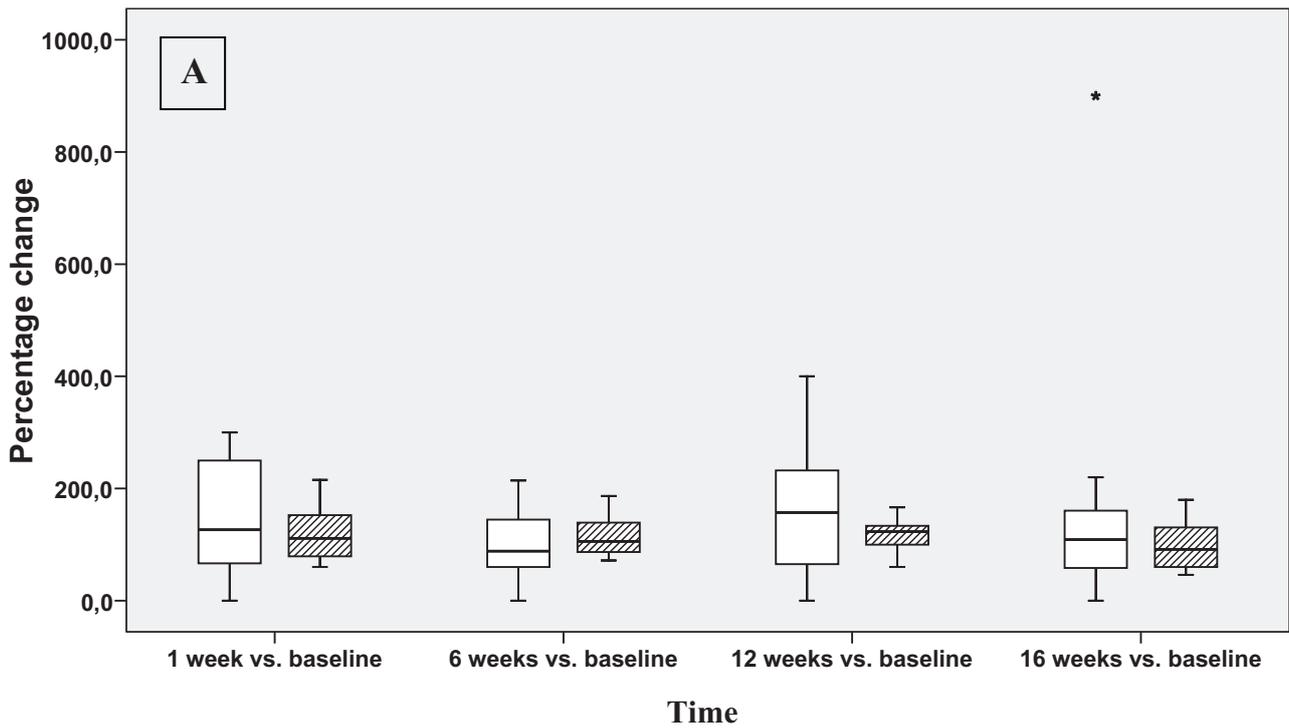
In der Peripherie war eine moderate Erhöhung der Langerhanszellendichte zu verzeichnen: Von der Aufnahmeuntersuchung zur 2. Untersuchung in der BAC-Gruppe auf 123 % und in der Placebogruppe auf 118 %. Zur 3. Untersuchung sank die Zellzahl wieder etwas ab: In der BAC – Gruppe auf 107% (-16 %) und in der Placebogruppe auf 117% (-1 %).



**Abb. 17: Box plots der prozentualen Differenz der Langerhanszellen zur Untersuchung 1 in der Peripherie zwischen den Studienmedikationen.**

Ein deutlicher Unterschied konnte wiederum zwischen der 1. und der 4. Untersuchung bei den Studienmedikationen beobachtet werden. Die Zellzahl in der BAC-Gruppe stieg auf 159 %, während die der Placebogruppe mit 119 % nahezu unverändert war (+2 %) ( $p=0,041$ ). Zur Ausgangsuntersuchung kam es zu einer signifikanten Zellzahlerhöhung nach 12 Wochen (BAC – Gruppe:  $p=0,005$ ; Placebo – Gruppe:  $0,011$ ). Vier Wochen nach Absetzen der Studienmedikation waren in der Peripherie niedrigere Werte für die LZ-Dichte als bei Aufnahmeuntersuchung zu verzeichnen (Abb. 17).

Die Erhöhung der Langerhanszellen war im Zentrum und in der Peripherie unterschiedlich. Bei der BAC – Gruppe zeigte sich zentral eine schnellere Zunahme der Zelldichte als peripher. Darüber hinaus waren die Zelldichten nach 1, 6 und 12 Wochen im Zentrum und in der Peripherie bei der BAC – Gruppe statistisch unterschiedlich (nach einer Woche  $p=0,030$ ; nach sechs Wochen  $p=0,039$ ; nach zwölf Wochen  $p=0,021$ ). Die Placebo – Kontroll – Gruppe zeigte dagegen keine statistisch relevanten Unterschiede (Abb. 18 B).



**Abb. 18: Box plots der prozentualen Änderungen der LZ – Dichte zur Ausgangsuntersuchung (100 %) in den zwei verschiedenen Untersuchungsgebieten (Hornhautzentrum und – peripherie):**

A: Placebogruppe

B: BAC – Gruppe

## 7.2. Veränderungen in den Untersuchungsparametern, die auf die Entwicklung eines Trockenen Auges hindeuten

Neben dem Hauptwirksamkeitsparameter LZ – Dichte wurden weitere Untersuchungsparameter erhoben. Einerseits war dies zur Kontrolle der Verträglichkeit nötig, andererseits ergeben die Parameter Auskunft über die evtl. Entstehung eines „Trockenen Auges“.

### 7.2.1. Verträglichkeit und Beschwerden

Keiner der Probanden gab zum Zeitpunkt der U1 augenärztliche Beschwerden an. Zum Zeitpunkt U4 (nach zwölf Wochen) gaben drei Probanden in jeder Gruppe leichtes Brennen und einen Juckreiz an, bei zwei traten diese Symptome in beiden Augen auf. Zu keinem Zeitpunkt konnten die Probanden subjektiv einen Unterschied zwischen den zwei Prüfmedikationen feststellen. Es bestanden keine Unterschiede bei der Verträglichkeit zwischen der BAC – und der Placebo – Lösung.

### 7.2.2. Biomikroskopie (Spaltlampenuntersuchung)

#### Bindehaut:

Eine geringe konjunktivale Injektion wurde zum Zeitpunkt U4 in der Placebo – Gruppe (5,3 %) und zum Zeitpunkt U3 in der BAC – Gruppe (5,3 %) verzeichnet.

LIPCOF (Lid – parallele konjunktivale Falten): Es kam im Verlauf der Studie zu einer Zunahme der LIPCOF bei den Probanden in der Placebo – Gruppe von 15 % bei U1 zu 27,8 % bei U4 sowie zu einer Abnahme auf 22,2 % zur U5 (nach Absetzen der Medikation). Das Auftreten von LIPCOF nahm in der BAC – Gruppe von der Aufnahmeuntersuchung bis zur Untersuchung nach zwölf Wochen von 15 % auf 44 % zu. Nach Absetzen der Studienmedikation gingen die LIPCOF in beiden Gruppen auf ca. 22 % zurück (Tab. 3). Im Vergleich zur Placebo – Gruppe lag keine signifikante Erhöhung der LIPCOF vor ( $p=0,49$ ).

#### Hornhaut:

Die Biomikroskopie ergab keine Hornhautproblematik mit Ausnahme einer Hornhautstippung an einem Placebo – Auge zum Zeitpunkt U3, welche sicher nicht der Studienmedikation oder der Untersuchung zuzuschreiben war.

### Vorderkammer:

Die Vorderkammer war bei allen Probanden bei jeder Untersuchung optisch leer.

### 7.2.3. Epitheldicke

Die in vivo konfokal mikroskopisch gemessenen Unterschiede der Epitheldicke sowohl peripher als auch zentral sind vernachlässigbar klein und nicht signifikant.

#### Zentrum:

Die Epitheldicke nahm von der 1. zur 4. Untersuchung in der Placebo – Gruppe von 41 auf 44  $\mu\text{m}$  und in der BAC – Gruppe von 42 auf 44  $\mu\text{m}$  zu. Bei der 5. Untersuchung lag die Epitheldicke bei der Placebo – Gruppe weiterhin bei 44  $\mu\text{m}$  während sie bei der BAC – Gruppe wieder auf 41  $\mu\text{m}$  absank.

#### Peripherie:

In der Peripherie nahm die Epitheldicke von der 1. zur 4. Untersuchung sowohl in der Placebo – Gruppe als auch in der BAC – Gruppe von 40 auf 42  $\mu\text{m}$  zu. Bei der 5. Untersuchung betrug die Epitheldicke wiederum 40  $\mu\text{m}$  und entsprach dem Ausgangswert. Es waren keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufgetreten.

### 7.2.4. Schirmer-I-Test

Eine Verringerung der Tränenflüssigkeit war von der Aufnahmeuntersuchung bis zur Untersuchung nach 12 Wochen im BAC – Auge von 14,8 +/- 4,3 mm auf 13,6 +/- 4,4 mm zu beobachten (- 1,2 mm). Im Placebo – Auge war die Verkürzung geringer und zwar von 15,1 +/- 5,1 mm auf 14,7 +/- 3,6 mm (-0,4 mm). In der BAC – Gruppe war nach 12 Wochen also ein leichter Rückgang in der Tränenproduktion zu beobachten. Dies war jedoch nicht signifikant ( $p=0,15$ ) und kann lediglich als Trend gewertet werden. Nach Absetzen der Studienmedikation betrug der Schirmertest in der BAC – Gruppe 13,7 mm (-1,1 mm) und in der Placebo – Gruppe 13,1 mm (-2,0 mm).

### 7.2.5. Tränenfilmaufrisszeit (*Break-Up-Time*)

Die Tränenfilmaufrisszeit (BUT) lag bei Aufnahmeuntersuchung in der Placebo – Gruppe bei 12,8 +/- 4,2 s und in der BAC – Gruppe bei 12,4 +/- 3,9 s ( $p=0,513$ ), zum Zeitpunkt der U4 bei 12,5 +/- 3,4 s und 12,7 +/- 3,3 s respektiv ( $p=0,783$ ). Es waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

### 7.2.6. Hornhautsensibilität

Die Hornhautsensibilität betrug in beiden Gruppen zu jedem Zeitpunkt 60 +/- 0 mm. Es bestand keine statistische Differenz zwischen beiden Gruppen ( $p=1,0$ ). Die einzige Ausnahme war bei einem Probanden in der Placebo-Gruppe nach einer Woche bei der U2 zu verzeichnen: 59 +/- 0,5 mm.

**Tab. 3: Übersichtstabelle der erhobenen Parameter**

	baseline	1 Woche	6 Wochen	12 Wochen	16 Wochen
<b>Schirmer Test (mm)</b>					
BAC	14,8+/-4,3	13,1+/-5,7	14,4+/-6,6	13,6+/-4,4*	13,7+/-4,9
Placebo	15,1+/-5,1	13,4+/-5,5	15,4+/-5,6	14,7+/-3,75	13,1+/-5,4
				* p=0,15	
<b>BUT (Sek)</b>					
BAC	12,4+/-3,9	11,4+/-4,7	11,7+/-4,2	12,7+/-3,3	12,6+/-3,8
Placebo	12,8+/-4,2	11,0+/-5,0	11,2+/-4,6	12,5+/-3,4	12,7+/-3,4
<b>Epitheldicke (µm)</b>					
<b>zentral</b>					
BAC	42+/-7	42+/-5	44+/-6	44+/-6	42+/-7
Placebo	41+/-7	43+/-6	43+/-6	44+/-6	45+/-7
<b>peripher</b>					
BAC	40+/-7	39+/-6	42+/-8	42+/-8	40+/-7
Placebo	40+/-6	41+/-5	43+/-9	42+/-8	40+/-6
<b>Korneasensibilität (mm)</b>					
BAC	6,0+/-0	6,0+/-0	6,0+/-0	6,0+/-0	6,0+/-0
Placebo	6,0+/-0	5,9+/-0,5	6,0+/-0	6,0+/-0	6,0+/-0
<b>IOD (mmHg)</b>					
BAC	14,5+/-2,7	13,4+/-2,2	14,4+/-2,9	14,9+/-2,5	14,8+/-2,1
Placebo	14,5+/-2,7	13,3+/-2,4	14,3+/-2,3	14,8+/-2,1	14,3+/-2,1
<b>LIPCOF(%)</b>					
BAC	15,0	25,0	30,0	44,4	22,2
Placebo	15,0	25,0	20,0	27,8	22,2

## 8. Diskussion

Die potentiell toxischen und allergischen Nebenwirkungen von Konservierungsmitteln sind schon seit längerem Gegenstand von ex vivo und klinischen Studien. Da sehr viele Ophthalmika auch ein Konservierungsmittel zur Verlängerung der Haltbarkeit und Wirkstoffstabilität benötigen, ist es wichtig zu evaluieren, ob diese Zusatzmittel kurzfristig oder langfristig eventuell mehr Schaden als Nutzen bringen. Bis jetzt war in vivo kein objektiv messbarer Kontrollparameter bekannt, der eine Immunreaktion in der Kornea verlässlich wiedergeben konnte. Vielmehr wurden manifeste Symptome wie periorbitale Dermatitis, Keratitis und Konjunktivitis bzw. subjektive Symptome wie Brennen und Jucken als Anzeichen der allergischen und toxischen Komponente von Konservierungsstoffen aufgenommen [70;85]. Frühzeitige auf zellulärer Ebene auftretende Schäden konnten nur ex vivo quantifiziert werden [23;51].

In der durchgeführten Studie sollte die Dichte und Verteilung von Langerhanszellen im kornealen Epithel, sowie dessen Veränderung bei kontinuierlicher Stimulation mit 0,01%igem Benzalkoniumchlorid über drei Monate bei gesunden freiwilligen Probanden untersucht werden. Weiterhin wurden Untersuchungsparameter bezüglich der Entwicklung eines trockenen Auges mit aufgenommen.

### 8.1. Veränderung der Langerhanszellzahl im zeitlichen Verlauf

Mit Hilfe der in vivo konfokalen Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Langerhanszellen sowohl zentral als auch peripher in gesunden Hornhäuten vorkommen [76;126]. Sie zeigen sich als große, reife Zellen mit langen Fortsätzen und als kleinere, unreife Zellen ohne Fortsätze (Abb. 7). Zhivov et al. konnten 2005 mit Hilfe der in vivo konfokalen Mikroskopie an insgesamt 112 gesunden Probanden ohne okuläre Entzündungen oder Operationen in der Krankengeschichte zeigen, dass im Hornhautzentrum durchschnittlich 34 Zellen / mm<sup>2</sup> und in der Hornhautperipherie durchschnittlich 98 Zellen / mm<sup>2</sup> vorkommen [126]. Man geht heute davon aus, dass sie in Zusammenarbeit mit dem am Auge assoziierten lymphatischen Gewebe („*eye associated lymphoid tissue*“ – EALT) eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und Immuntoleranz spielen sowohl als antigenpräsentierendes Glied in der Kette der T-Zell

vermittelten Immunantwort als auch als Regulator einer entsprechenden Immunreaktion [63;64].

Die Hornhaut selbst wird noch oft zu einem der immunprivilegierten Gewebe gezählt, weil angenommen wurde, dass hier physiologisch keine lymphatischen Zellen vorkommen. Hamrah et al. konnten 2003 erstmals die dendritischen Langerhanszellen und deren Vorläufer als antigenpräsentierende Zellen ex vivo bei Mäusen nachweisen. Dabei ist die Hornhaut auf weitere Glieder der Immunabwehr des umgebenden Gewebes angewiesen – vor allem auf die von Knop et al. 2003 beschriebenen Mukosa assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT). Diese werden aufgegliedert in das von der Konjunktiva gebildete „*conjunctiva – associated lymphoid tissue*“ (CALT) und das der Tränenfilm – drainierenden Gewebe („*lacrimal drainage – associated lymphoid tissue*“ – LDALT) [61;63]. Knop et al. konnten 2008 auch erstmals nachweisen, dass in der Konjunktiva direkt sekretorisches Immunglobulin A (sIgA) gebildet wird, welches ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Primärabwehr von Antigenen spielt [65]. Bei jedem Vorgang des Augenschlusses, am Tage während des Blinzeln und nachts im Schlaf wird die Hornhaut komplett vom CALT bedeckt [62]. Somit können einerseits korneale Antigene optimal detektiert werden, andererseits Effektorzellen aktiviert bzw. das sIgA auf der Oberfläche verteilt werden. Die sIgA – Moleküle verhindern u. a. die Adhäsion und Invasion von Antigenen, können intrazellulär Viruspartikel neutralisieren und machen Antigene leichter für spezifische Effektorzellen des adaptiven Immunsystems erkennbar.

Da Langerhanszellen als einzige antigenpräsentierende Zellen regelmäßig in der Hornhaut nachgewiesen werden können, wurde vermutet, dass es bei anhaltender Fremdstoffstimulation durch das tief in die Hornhaut eindringende Benzalkoniumchlorid zu einer Reaktion bzw. quantitativen Veränderung der Langerhanszellpopulation in der Hornhaut kommen könnte. Allgemein gilt die Infiltration von dendritischen Zellen als Zeichen einer Immunstimulation und wurde schon nach verschiedenen Stimuli, wie z.B. Kontaktlinsenanwendung, refraktärer Chirurgie und Hornhauttransplantation beschrieben [76;127]. Das vermehrte Vorliegen von Langerhanszellen in der Kornea und Konjunktiva könnte klinische Relevanz bei der Evaluierung der Entwicklung eines trockenen Auges, prä- und postoperativ bei tiefer Sklerektomie und der Immunstimulation des Auges haben.

Bei gesunden Probanden wurden Langerhanszellichten von ca. 30 Zellen / mm<sup>2</sup> im Zentrum und ca. 100 Zellen / mm<sup>2</sup> in der Peripherie der Hornhaut beobachtet [75;127]. Bei Glaukom – patienten, die mit konservierungsmittelhaltigen Augentropfen über mindestens ein Jahr behandelt wurden, fiel die Langerhanszellichte höher aus: Zentral waren hier ca. 196 +/- 22 Zellen / mm<sup>2</sup> zu verzeichnen, peripher 304 +/- 27 Zellen / mm<sup>2</sup> [121]. Die Zelldichten der vorherigen Studien konnten in dieser Studie nachvollzogen werden und stimmten in etwa überein.

Schon nach einer Woche konnte im Zentrum eine geringfügige Erhöhung der LZ – Dichte auf 166 +/- 101 % in der BAC – Gruppe im Vergleich zu 148 % +/- 92,8 % in der Placebo – Gruppe beobachtet werden. Nach 6 und 12 Wochen konnten grenzwertig signifikante Erhöhungen der LZ in der BAC – Gruppe gegenüber der Placebo – Gruppe verzeichnet werden (p=0,034 und p=0,016, Bonferoni korrigiert). Vier Wochen nach Absetzen der Studienmedikation unterschieden sich die beiden Gruppen in den Änderungen der LZ zum Ausgangswert nicht mehr wesentlich.

In der BAC – Gruppe konnten grenzwertig signifikante prozentuale Erhöhungen der LZ in Bezug zum Ausgangswert (100%) nach 1 Woche und 6 Wochen (p=0,016 und p=0,022) sowie eine signifikante Erhöhung nach der 12. Woche (p=0,001) festgestellt werden. In der Placebo – Gruppe konnten grenzwertig signifikante Erhöhungen der LZ nach Woche 1 und Woche 12 (p=0,041 zu beiden Zeiten) bestimmt werden.

In der Peripherie war lediglich nach der 12. Woche eine grenzwertig signifikante Erhöhung der LZ in der BAC – Gruppe zur Placebo – Gruppe zu erkennen (p=0,041). Im zeitlichen Verlauf konnte in beiden Gruppen eine signifikante Erhöhung der LZ prozentual zum Ausgangswert nach 12 Wochen beobachtet werden (BAC – Gruppe: p=0,005; Placebo – Gruppe: p= 0,011).

Ein signifikanter Langerhanszellanstieg (p=0,001) kam zentral selektiv nur in der BAC – Gruppe nach 12 Wochen vor (Abb. 18 B), kann also nicht allein durch den Stimulus Augentropfen oder das Zuführen von isotoner Kochsalzlösung hervorgerufen worden sein. Damit kann von einer immunologischen Stimulation der LZ in der Hornhaut durch toxische bzw. allergische Effekte des Konservierungsmittels Benzalkoniumchlorid ausgegangen werden.

Die prozentualen Veränderungen bei der Erhöhung der LZ waren zwischen Hornhautzentrum und – peripherie unterschiedlich. In der Placebo – Gruppe traten diese Unterschiede nicht auf. In der BAC – Gruppe konnte jedoch eine schnellere Erhöhung der LZ im Zentrum der Hornhaut gegenüber der Peripherie ermittelt werden. Dabei trat hier eine grenzwertige Signifikanz im Vergleich der LZ – Dichte zwischen Zentrum und Peripherie auf (Woche 1:  $p=0,030$ , Woche 6:  $p=0,039$  und Woche 12:  $p=0,021$ ; Abb. 18 B).

Der frühe Anstieg der LZ im zentralen Bereich der Hornhaut und spätere Anstieg in der Peripherie könnte sich so erklären lassen, dass die LZ primär aus peripheren Arealen der Hornhaut ins Zentrum migrieren und es länger dauert, bevor neue hornhautfremde LZ an den Ort der Fremdstoffstimulation rekrutiert werden. In experimentellen Modellen wurde die Migration und Reifung von LZ bereits beobachtet und beschrieben [1;48;109;118]. Es gibt verschiedene Hypothesen über die Langerhanszellmigration: am weitesten verbreitet ist die Annahme der zentripetalen Ausbreitung, einige Studien weisen jedoch auf die Möglichkeit der Zellinvasion aus tiefer liegenden Schichten hin. Thoft et al. stellten dazu die so genannte X, Y, Z – Hypothese auf [110]. Demnach bewegen sich LZ entlang den vorbestehenden kornealen Nervengeflechten und dabei besonders an Fasern des subepithelialen Nervenplexus.

Vier Wochen nach Beendigung der Anwendung von der Studienmedikation fiel die Anzahl der LZ in beiden Gruppen zentral und peripher wieder deutlich ab und näherte sich den ursprünglichen Ausgangswerten bei der Erstuntersuchung.

Der schnelle Rückgang der Langerhanszellzahl zeigt, dass es sich bei der Immunstimulation um ein reversibles Geschehen handelt und nach Wegfall des Fremdstoffstimulus innerhalb von nur vier Wochen die Langerhanszellen nahezu auf ihre ursprünglichen Normwerte abfallen (Abb. 15). Diese Erkenntnis könnte für die Festlegung des Operationszeitpunktes bei Glaukumpatienten genutzt werden: Ein Absetzen von konservierungsmittelhaltigen drucksenkenden Medikamenten präoperativ und Umstellen auf konservierungsmittelfreie Präparate könnte den Vorteil eines immunzellärmeren OP – Feldes haben und zu besseren, nachhaltigeren Operationsergebnissen führen, besonders bei jüngeren, noch sehr immunkompetenten Patienten. Dass die Dauer der Anwendung von konservierungshaltigen Pharmaka am Auge in der Tat einen Einfluss auf den Erfolg von fistulierenden Operationen (z.B. tiefe nicht perforierende Sklerektomie) bei Glaukumpatienten hat, zeigten Broadway et al. bei der Betrachtung von Operationsergebnissen in 106 Fällen. Zu verzeichnen war, dass die Erfolgsrate bei Patienten, die über drei Jahre mit Antiglaukom – Therapeutika behandelt

wurden, mit 55% signifikant unter den kurzfristiger behandelten Patienten (94 %,  $p < 0,001$ ) lag [12]. Anzunehmen ist, dass es aufgrund der schon lange residierenden antigenpräsentierenden Zellen zu einer schnelleren Aktivierung von Fibroblasten und daraufhin folgenden Fibrosierung der operativ geschaffenen filtrierenden Strukturen kommt. Diese lokale Reaktion auf allogene Stoffe wird in Zukunft z.B. auch bei drainierenden Stentimplantationen eine zunehmende Relevanz haben.

Das wissenschaftliche Interesse an dendritischen Zellen in der Hornhaut verdeutlicht eine Pubmed – Suche im Internet: Es wurden im Juli 2010 insgesamt 400 Einträge aufgezeigt. An der Universitätsaugenklinik Rostock wird die Langerhanszellichte bereits als direkter Parameter zur Entscheidungsfindung über therapeutisches Vorgehen und das chirurgische Prozedere beachtet und für weitere Kontrolluntersuchungen hinzugezogen. Letztendlich könnte die Zahl an Entzündungszellen auch Aufschluss über die Prognose einer Therapie oder Operation und die Progression oder Heilung einer Erkrankung (z.B. Hornhautulkus) geben [76;123].

## 8.2. Problematik des Trockenen Auges (Keratokonjunktivitis sicca)

Wie bereits beschrieben reguliert das physiologisch vorhandene lokale Immunsystem der okulären Oberfläche (EALT) maßgeblich die Entzündungsprozesse am Auge. Dazu spielt einerseits die T – Helferzellen – Immunantwort eine wichtige Rolle, andererseits der Tränenfilm selbst als benetzender, verdünnender Film mit IgA zur direkten Antigenabwehr. Bei einer alterierten Tränenfilmzusammensetzung mit folgender Benetzungstörung der okulären Oberfläche kann es zu entzündlichen Veränderungen am Auge und zur Induzierung der schmerzhaften und hornhautschädlichen Symptomatik des trockenen Auges, der Keratokonjunktivitis sicca kommen [107].

Die Funktion von Benzalkoniumchlorid als Lösungsmittel stört die Zusammensetzung des Tränenfilms und dabei vor allem die Lipidschichtkomponente. Dadurch kann die Flüssigkeit aus der mittleren wässrigen Schicht leichter und schneller verdunsten, und die Gefahr der Entstehung eines trockenen Auges ist erhöht. Wilson et al. haben gezeigt, dass die Instillation von drei Tropfen 0,0001 % BAC – Lösung zur Verminderung der Tränenfilmaufrisszeit (BUT) um 50 % führt [5;117]. Auch bei Kaninchen machte sich nach einmonatiger Applikation von konservierungsmittelhaltigem Timolol im Gegensatz zur Anwendung des

konservierungsmittelfreien Präparates eine Verkürzung der BUT bemerkbar [85]. In vitro Schäden an der Hornhaut haben sich als dosisabhängig gezeigt, allerdings liegt die schädliche Schwelle schon bei einer BAC – Konzentration von 0,005 %. Sämtliche handelsübliche Präparationen liegen über dieser Konzentration [22].

In der vorliegenden Studie wurden allerdings keine statistisch relevanten Veränderungen der BUT nach zwölfwöchiger Applikation der Testsubstanz bei gesunden Probanden verzeichnet ( $p=0,78$ ).

Neben der Qualität des Tränenfilms kann auch die Quantität negativ beeinflusst werden. Unsere Daten, die mittels des Schirmer-I-Testes erhoben wurden, zeigen lediglich einen Trend zur Reduktion der Tränenfilmproduktion in der BAC Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe nach 12 Wochen ( $p=0,15$ ).

Konservierungsmittel spielen bei der Anwendung von Präparaten am Auge die wichtigste Rolle bezüglich der ungewollten Nebenwirkungen. Pisella et al. führten dazu eine epidemiologische Studie an 4107 Patienten von 249 Augenärzten durch und fanden einen statistisch relevanten Anstieg an ungewollten Nebenwirkungen wie Fremdkörpergefühl, vermehrten Tränenfluss, Symptome des trockenen Auges, Brennen und Jucken während der Applikation der Augentropfen [85]. Auch Jaenen et al. führten eine ähnliche epidemiologische Studie bei 9658 Patienten in vier europäischen Ländern durch und beschrieben ein signifikant erhöhtes Auftreten an unerwünschten Nebenwirkungen (Brennen, Stechen, Fremdkörpergefühl und andere Sicca – Symptome) in der Gruppe, die konservierungsmittelhaltige Augentropfen anwendete [54].

In der von uns durchgeführten Studie zeigte sich im allgemeinen eine sehr gute Toleranz der Augentropfenanwendung. Während der 12 Wochen beklagten nur 16,7 % (3/18) leichtes Jucken und zwei der Probanden fühlten die Missempfindungen in beiden Augen, was für eine BAC – unabhängige Erscheinung spricht. Die 0,01 %ige BAC – Lösung induzierte keine weiteren Beschwerden verglichen mit der Placebolösung.

Ein weiteres Anzeichen des chronisch trockenen Auges ist die verminderte Dicke der Hornhaut und der Epitheldicke in der Peripherie [31;114]. Wir haben bei keiner der Gruppen, weder zentral noch peripher, eine Änderung in der Epitheldicke nach 12 Wochen festgestellt.

Das Auftreten von lidparallelen konjunktivalen Falten (LIPCOF), das von vielen Autoren im deutschsprachigen Raum ebenfalls bei der Entstehung eines trockenen Auges beschrieben wird, war in der BAC – Gruppe mit 44,4 % gegenüber der Placebo – Gruppe mit 27,8 % nach 12 Wochen nicht signifikant erhöht ( $p=0,49$ ). Allerdings war vier Wochen nach Absetzen der Studienmedikation nur noch bei 22,2 % der Probanden LIPCOF feststellbar, was wiederum für einen Einfluss der Studienmedikation sprechen könnte.

Darüber, warum LIPCOF schon zur Einstellungsuntersuchung bei vielen Probanden auftraten, kann nur spekuliert werden: die Probanden waren überwiegend junge Studenten (mittleres Alter 23,4 +/- 2,01 Jahre) und sind sicherlich einerseits dem intensiven Lernen und der Arbeit am Computerbildschirm täglich ausgesetzt, andererseits muss wahrscheinlich auch das „Partyleben“ in der Studentenschaft mitberücksichtigt werden.

Bis auf die erwähnte dreifache Erhöhung von LIPCOF in der BAC – Gruppe, fanden wir nach zwölfwöchiger Anwendung von 0,01 % BAC keine weiteren Anzeichen für die Entstehung eines trockenen Auges. Auch waren bei der in vivo konfokalen Mikroskopie keine morphologischen Veränderungen wie Zellvergrößerung oder ein reduziertes Zellkern / Zellplasma – Verhältnis (Abb. 4) aufgefallen, die ebenfalls typisch für das trockene Auge sind.

Insgesamt konnten aufgrund von subjektiv angegebenen Symptomen bzw. mittels der erhobenen Befunde keine Anzeichen für die Entstehung einer „Trockenen Auge Symptomatik“ bei BAC – Anwendung über drei Monate festgestellt werden.

Dabei spielte wahrscheinlich die doch noch relativ kurze Dauer der Anwendung der Prüfmedikation einerseits eine Rolle, andererseits konnte nicht geprüft werden wie hoch die Compliance – Rate unter den Probanden tatsächlich war. Da es sich überwiegend um junge (Medizin –) Studenten handelte, kann allerdings von einer relativ guten Compliance ausgegangen werden. Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt ist die BAC – Konzentration von 0,01 %, die der mittleren Konzentration von BAC in derzeit gebräuchlichen Antiglaukompräparaten entspricht (Tab. 2). Viele handelsübliche Medikamente beinhalten eine höhere Konservierungsmittelkonzentration. Eine höhere Konzentration der BAC – Testsubstanz hätte eventuell zum schnelleren Auftreten von Symptomen eines Trockenen Auges geführt.

## 9. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte eine subklinische entzündliche Reaktion im Sinne einer induzierten immunologischen Stimulation der dendritischen Zellen in der Hornhaut durch die Applikation von 0,01 %igem Benzalkoniumchlorid dreimal täglich nachgewiesen werden: nach sechs Wochen ( $p=0,034$ ) und noch deutlicher nach zwölf Wochen ( $p=0,016$ ) zeigte sich im Vergleich zur Anwendung der Placebolösung in der BAC – Gruppe ein statistisch grenzwertig signifikanter Anstieg der Langerhanszellichte im Hornhautzentrum, in der Peripherie zeigte sich dieser Anstieg erst nach 12 Wochen ( $p=0,041$ ).

Zu einem signifikanten Anstieg ( $p=0,001$ ) der LZ kam es im Hornhautzentrum im Vergleich zum Ausgangswert nach zwölf Wochen selektiv nur in der BAC – Gruppe. In der Placebo – Gruppe konnten im Zentrum lediglich grenzwertig signifikante Erhöhungen der LZ nach der 1. und 12. Woche erhoben werden (jeweils  $p=0,041$ ). In der Peripherie war ein signifikanter Anstieg der Zellzahl nach zwölf Wochen sowohl in der BAC – als auch in der Placebo – Gruppe zu verzeichnen ( $p=0,005$  und  $p=0,011$ ).

Die Erhöhung der LZ bei der BAC – Gruppe erfolgte im Zentrum schneller als in der Peripherie. Die unmittelbar wieder Richtung Ausgangswerte rückläufige Langerhanszellzahl vier Wochen nach Absetzen der BAC – Applikation, teilweise auf Werte unterhalb der ursprünglichen LZ – Dichte (peripher), zeigt die Bedeutung des BACs als toxisch und evtl. auch allergisch relevanten Fremdstoff. In der Studie konnten bis auf eine dreifache Erhöhung von LIPCOF in der BAC – Gruppe keine klaren Anzeichen für die Entwicklung eines trockenen Auges bei gesunden, jungen Probanden nach zwölfwöchiger Applikation entdeckt werden.

Die erhobenen Erkenntnisse zur BAC-induzierten Vermehrung der LZ in der Hornhaut geben wichtige Informationen zum immunologischen Abwehrverhalten der Kornea und belegen die subklinisch ablaufende Entzündungsreaktion. Eine Änderung der LZ – Dichte in der menschlichen Hornhaut über einen festgelegten Zeitraum mit mehreren relativ kurz aufeinanderfolgenden in vivo Untersuchungen wurde in dieser Studie erstmalig dokumentiert. Eine kurzfristige Anwendung von konservierungsmittelhaltigen Medikamenten wie z.B. ophthalmologisch relevanten Antibiotika ist sicherlich weiterhin bedenkenlos möglich. Bei

einer Langzeittherapie und bei Patienten mit chronischen okulären Entzündungen, Hornhautoberflächenproblemen, Glaukom und nach Hornhauttransplantation oder vor planbaren Operationen sollten allerdings heute zunehmend konservierungsmittelfreie Präparate Anwendung finden.

## 10. Literaturverzeichnis

- [1] Auran JD, Koester CJ, Kleiman NJ, Rapaport R, Bomann JS, Wirotko BM, Florakis GJ, Koniarek JP: Scanning slit confocal microscopic observation of cell morphology and movement within the normal human anterior cornea. *Ophthalmology* 1995;102:33-41.
- [2] Baines MG, Cai F, Backman HA: Ocular hypersensitivity to thimerosal in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2259-2265.
- [3] Balasubramanian M, Iyengar S, Beuerman R, Reynaud J, Wolenski P. Real-time restoration of white-light confocal microscope optical sections. *J Electron Imaging* . 2007.
- [4] Baudouin C: Dry eye: an unexpected inflammatory disease. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2001;76:205-206.
- [5] Baudouin C: Experimental evidence; in 10 years of preservative-free eyedrops: Laboratories Thea, 2007.
- [6] Baudouin C. 10 Jahre konservierungsfreie Augentropfen. 10 Jahre konservierungsmittelfreie Augentropfen, Théa Pharma . 2009.
- [7] Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K, Goldschild M, Becquet F, de Saint JM, Bechettille A: Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs: human and animal studies. *Ophthalmology* 1999;106:556-563.
- [8] Becker Y: Immunological and regulatory functions of uninfected and virus infected immature and mature subtypes of dendritic cells--a review. *Virus Genes* 2003;26:119-130.
- [9] Becquet F, Goldschild M, Moldovan MS, Ettaiche M, Gastaud P, Baudouin C: Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneoconjunctival surface. *Curr Eye Res* 1998;17:419-425.
- [10] Birbeck M, Breathnach A, Everal J. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol.* 37, 51-64. 1961.
- [11] Borque E, Ferreras A, Polo V, Larrosa JM, Alias E, Honrubia FM: [Evaluation of four new discriminant functions for HRT II in glaucoma diagnosis]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2008;83:349-356.
- [12] Broadway DC, Grierson I, O'Brien C, Hitchings RA: Adverse effects of topical antiglaucoma medication. II. The outcome of filtration surgery. *Arch Ophthalmol* 1994;112:1446-1454.
- [13] Bron AJ. Methoden zur Diagnose und zum Monitoring des Trockenen Auges: Bericht des Diagnostic Methodology Subcommittee des International Dry Eye WorkShop (2007). *The Ocular Surface* April 2007, Vol.5, Nr.2 . 2007.

- [14] Brown KA, Bedford P, Macey M, McCarthy DA, Leroy F, Vora AJ, Stagg AJ, Dumonde DC, Knight SC: Human blood dendritic cells: binding to vascular endothelium and expression of adhesion molecules. *Clin Exp Immunol* 1997;107:601-607.
- [15] Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, Shields W, Lemp MA: Confocal microscopy of the living eye. *CLAO J* 1990;16:65-73.
- [16] Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1-8-1996;184:747-752.
- [17] Champeau E, Edelhauser H: Effect of ophthalmic preservatives on the ocular surface: conjunctival and corneal uptake and distribution of benzalkonium chloride and chlorhexidine digluconate. IN: Holly, FJ, Lamberts, DW, Mackeen, DL, Esquivel, ED - The precocular tear film in health, disease and contact lens wear. Dry Eye Institute Lubbock, Texas. 1986.
- [18] Chou A, Hori S, Takase M: Ocular toxicity of beta-blockers and benzalkonium chloride in pigmented rabbits: electrophysiological and morphological studies. *Jpn J Ophthalmol* 1985;29:13-23.
- [19] Collin HB, Grabsch BE: The effect of ophthalmic preservatives on the healing rate of the rabbit corneal epithelium after keratectomy. *Am J Optom Physiol Opt* 1982;59:215-222.
- [20] Coulombre AJ: Cytology of the developing eye. *Int Rev Cytol* 1961;11:161-194.
- [21] Dabre P, Aljarrah A, Miller W, Coldham N, Sauer M, Pope G: Concentrations of parabens in human breast tumors. *J Appl Toxicol* 2004;24:5-13.
- [22] de Saint JM, Brignole F, Bringuier AF, Bauchet A, Feldmann G, Baudouin C: Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:619-630.
- [23] de Saint JM, Debbasch C, Brignole F, Rat P, Warnet JM, Baudouin C: Toxicity of preserved and unpreserved antiglaucoma topical drugs in an in vitro model of conjunctival cells. *Curr Eye Res* 2000;20:85-94.
- [24] de Saint JM, Debbasch C, Brignole F, Rat P, Warnet JM, Baudouin C: [Toxicity of preserved and unpreserved beta-blocker eyedrops in an in vitro model of human conjunctival cells]. *J Fr Ophtalmol* 2000;23:111-121.
- [25] Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C: Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:642-652.
- [26] Debbasch C, de Saint JM, Pisella PJ, Rat P, Warnet JM, Baudouin C: [Quaternary ammonium cytotoxicity in a human conjunctival cell line]. *J Fr Ophtalmol* 1999;22:950-958.

- [27] Debbasch C, Pisella PJ, Rat P, Warnet JM, Baudouin C: [Cytotoxicity evaluation of three tear substitutes used in the treatment of dry eye syndromes]. *J Fr Ophtalmol* 2000;23:863-869.
- [28] Dormans JA, van Logten MJ: The effects of ophthalmic preservatives on corneal epithelium of the rabbit: a scanning electron microscopical study. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;62:251-261.
- [29] Eckard A, Stave J, Guthoff RF: In vivo investigations of the corneal epithelium with the confocal Rostock Laser Scanning Microscope (RLSM). *Cornea* 2006;25:127-131.
- [30] Egger MD, Petran M: New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. *Science* 1967;157:305-307.
- [31] Erdelyi B, Kraak R, Zhivov A, Guthoff R, Nemeth J: In vivo confocal laser scanning microscopy of the cornea in dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:39-44.
- [32] Falke K, Buttner A, Schittkowski M, Stachs O, Kraak R, Zhivov A, Rolfs A, Guthoff R: The microstructure of cornea verticillata in Fabry disease and amiodarone-induced keratopathy: a confocal laser-scanning microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247:523-534.
- [33] Furrer P, Berger J, Mayer JM, Gurny R: [A comparative study of the ocular tolerance of 3 timolol-based preparations: the influence of preservatives on ocular tolerance]. *J Fr Ophtalmol* 2001;24:13-19.
- [34] Gillette TE, Chandler JW, Greiner JV: Langerhans cells of the ocular surface. *Ophthalmology* 1982;89:700-711.
- [35] Goh CL: Contact sensitivity to topical antimicrobials. (II). Sensitizing potentials of some topical antimicrobials. *Contact Dermatitis* 1989;21:166-171.
- [36] Goto Y, Ibaraki N, Miyake K: Human lens epithelial cell damage and stimulation of their secretion of chemical mediators by benzalkonium chloride rather than latanoprost and timolol. *Arch Ophthalmol* 2003;121:835-839.
- [37] Grant RL, Acosta D: Prolonged adverse effects of benzalkonium chloride and sodium dodecyl sulfate in a primary culture system of rabbit corneal epithelial cells. *Fundam Appl Toxicol* 1996;33:71-82.
- [38] Gray H: *Anatomy of the Human Body*, FIG 871; ed 20. Lea & Febiger, 1918.
- [39] Green K, Chapman J, Cheeks L, Clayton R, Wilson M, Zehir A: Detergent penetration into young and adult rabbit eyes: comparative pharmacokinetics. *Toxicol Cut & Ocular Toxicol* 1987;89-107.
- [40] Grehn F: *Augenheilkunde*, 5.5 Das trockene Auge (Keratoconjunctivitis sicca) Seite 88 - 89; 28. Auflage: Springer, 2003.
- [41] Grehn F: *Augenheilkunde*, 7. Hornhaut Seite 119 - 121; 28. Auflage: Springer, 2003.

- [42] Guthoff R, Baudouin C, Stave J: Atlas of Confocal Laser Scanning In-vivo Microscopy in Ophthalmology. p 31 - 103; Springer, 2006.
- [43] Guthoff R, Stave J: In Vivo Micromorphology of the Cornea: Confocal Microscopy Principles and Clinical Applications; in Reinhard T, Larkin F (eds): Essentials in Ophthalmology. Heidelberg, Springer-Verlag, 2006, p 173-208.
- [44] Hamard P, Blondin C, Debbasch C, Warnet JM, Baudouin C, Brignole F: In vitro effects of preserved and unpreserved antiglaucoma drugs on apoptotic marker expression by human trabecular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241:1037-1043.
- [45] Hamard P, Debbasch C, Blondin C, Brignole F, Loison-Dayma K, Warnet JM, Baudouin C: [Human trabecular cells and apoptosis: in vitro evaluation of the effect of betaxolol with or without preservative]. *J Fr Ophtalmol* 2002;25:777-784.
- [46] Hamrah P, Dana MR: Corneal Antigen-Presenting Cells. *Chem Immunol Allergy* 2007;92:58-79.
- [47] Hamrah P, Huq SO, Liu Y, Zhang Q, Dana MR: Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 2003;74:172-178.
- [48] Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Dana MR: Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:639-646.
- [49] Hatinen A, Terasvirta M, Fraki JE: Contact allergy to components in topical ophthalmologic preparations. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1985;63:424-426.
- [50] Hornova J, Kuntz Navarro JB, Prasad A, Freitas DG, Nunes CM: Correlation of Disc Damage Likelihood Scale, visual field, and Heidelberg Retina Tomograph II in patients with glaucoma. *Eur J Ophthalmol* 2008;18:739-747.
- [51] Ichijima H, Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD: Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea* 1992;11:221-225.
- [52] Imayasu M, Moriyama T, Ohashi J, Ichijima H, Cavanagh HD: A quantitative method for LDH, MDH and albumin levels in tears with ocular surface toxicity scored by Draize criteria in rabbit eyes. *CLAO J* 1992;18:260-266.
- [53] Imperia P, Lazarus H, Botti R, Lass J. An in vitro method for measuring ophthalmic preservative cytotoxicity. *Toxicol Cut Ocular Toxicol* 5, 309-317. 1986.
- [54] Jaenen N, Baudouin C, Pouliquen P, Manni G, Figueiredo A, Zeyen T: Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *Eur J Ophthalmol* 2007;17:341-349.
- [55] Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC: The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 11-5-1995;375:151-155.

- [56] Junqueira L, Carneiro J: Histologie, Kap. 25.7.2 Tunica fibrosa bulbi (äußere Augenhaut), S. 657 - 661; 4. Auflage, Springer, 1996.
- [57] Kaplan G, Walsh G, Guido LS, Meyn P, Burkhardt RA, Abalos RM, Barker J, Frindt PA, Fajardo TT, Celona R, .: Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *J Exp Med* 1-6-1992;175:1717-1728.
- [58] Kikkawa Y: Submicroscopic structure of rabbit cornea studied by polarization optics and thermoelasticity. *Jpn J Physiol* 15-9-1955;5:167-182.
- [59] Kim MS, Choi CY, Kim JM, Chang HR, Woo HY: Microbial contamination of multiply used preservative-free artificial tears packed in reclosable containers. *Br J Ophthalmol* 2008;92:1518-1521.
- [60] Klareskog L, Forsum U, Tjernlund UM, Rask L, Peterson PA: Expression of Ia antigen-like molecules on cells in the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:310-313.
- [61] Knop E, Knop N: Lacrimal drainage-associated lymphoid tissue (LDALT): a part of the human mucosal immune system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:566-574.
- [62] Knop E, Knop N: [Eye-associated lymphoid tissue (EALT) is continuously spread throughout the ocular surface from the lacrimal gland to the lacrimal drainage system]. *Ophthalmologie* 2003;100:929-942.
- [63] Knop E, Knop N: Influence of the eye-associated lymphoid tissue (EALT) on inflammatory ocular surface disease. *Ocul Surf* 2005;3:S180-S186.
- [64] Knop E, Knop N: The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat* 2005;206:271-285.
- [65] Knop E, Knop N, Claus P: Local production of secretory IgA in the eye-associated lymphoid tissue (EALT) of the normal human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2322-2329.
- [66] Lavin MJ, Wormald RP, Migdal CS, Hitchings RA: The influence of prior therapy on the success of trabeculectomy. *Arch Ophthalmol* 1990;108:1543-1548.
- [67] Lekskul M, Aimpun P, Nawanopparatskul B, Bumrungsawat S, Trakulmungkijarn T, Charoenvanichvisit J, Herunpattarawong T, Suksangthong P, Jaiprasat T, Rattananantapat M, Sudprasert T: The correlations between Central Corneal Thickness and age, gender, intraocular pressure and refractive error of aged 12-60 years old in rural Thai community. *J Med Assoc Thai* 2005;88 Suppl 3:S175-S179.
- [68] Lemp A. Definition und Klassifikation des Trockenen Auges: Bericht des Unterausschusses für Definition und Klassifikation des International Dry Eye WorkShop (2007). *The Ocular Surface* April 2007, Vol.5, Nr.2 . 2007.
- [69] Lemp MA, Dilly PN, Boyde A: Tandem-scanning (confocal) microscopy of the full-thickness cornea. *Cornea* 1985;4:205-209.

- [70] Levrat F, Pisella PJ, Baudouin C: [Clinical tolerance of antiglaucoma eyedrops with and without a preservative. Results of an unpublished survey in Europe]. *J Fr Ophtalmol* 1999;22:186-191.
- [71] Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowsky RJ, Michael AF, Sun TT, Kenney MC: Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab Invest* 1995;72:461-473.
- [72] Lopez BD, Ubels JL: Quantitative evaluation of the corneal epithelial barrier: effect of artificial tears and preservatives. *Curr Eye Res* 1991;10:645-656.
- [73] Masters BR, Paddock S: In vitro confocal imaging of the rabbit cornea. *J Microsc* 1990;158:267-274.
- [74] Masters BR, Thaeer AA: Real-time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea. *Appl Opt* 1994;33:695-701.
- [75] Mastropasqua L, Nubile M, Lanzini M, Carpineto P, Ciancaglini M, Pannellini T, Di NM, Dua HS: Epithelial dendritic cell distribution in normal and inflamed human cornea: in vivo confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol* 2006;142:736-744.
- [76] Mastropasqua L, Nubile M, Lanzini M, Carpineto P, Ciancaglini M, Pannellini T, Di NM, Dua HS: Epithelial dendritic cell distribution in normal and inflamed human cornea: in vivo confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol* 2006;142:736-744.
- [77] Maurice DM: A scanning slit optical microscope. *Invest Ophthalmol* 1974;13:1033-1037.
- [78] Mayer WJ, Irschick UM, Moser P, Wurm M, Huemer HP, Romani N, Irschick EU: Characterization of antigen-presenting cells in fresh and cultured human corneas using novel dendritic cell markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4459-4467.
- [79] Messmer E, Schmid-Tannwald C, Zapp D, Kampik A: In vivo confocal microscopy of corneal small fiber damage in diabetes mellitus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248:1307-1312.
- [80] Mietz H, Schlotzer-Schrehardt U, Lemke JH, Krieglstein GK: Early conjunctival changes following treatment with metipranolol and preservatives are not reversible with dexamethasone. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235:452-459.
- [81] Minsky M: Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 1988;10:128-38.
- [82] Miyake K, Ibaraki N, Goto Y, Oogiya S, Ishigaki J, Ota I, Miyake S: ESCRS Binkhorst lecture 2002: Pseudophakic preservative maculopathy. *J Cataract Refract Surg* 2003;29:1800-1810.
- [83] Pavli P, Maxwell L, Van de PE, Doe F: Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol* 1996;104:124-132.
- [84] Pisella PJ, Fillacier K, Elena PP, Debbasch C, Baudouin C: Comparison of the effects of preserved and unpreserved formulations of timolol on the ocular surface of albino rabbits. *Ophthalmic Res* 2000;32:3-8.

- [85] Pisella PJ, Pouliquen P, Baudouin C: Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication. *Br J Ophthalmol* 2002;86:418-423.
- [86] Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA: Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 16-10-1998;282:480-483.
- [87] Reis e Sousa, Stahl PD, Austyn JM: Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 1-8-1993;178:509-519.
- [88] Richter A, Slowik C, Somodi S, Vick HP, Guthoff R: [In vivo imaging of corneal innervation in the human using confocal microscopy]. *Ophthalmologie* 1997;94:141-146.
- [89] Risdall RJ, Dehner LP, Duray P, Kobrinsky N, Robison L, Nesbit ME, Jr.: Histiocytosis X (Langerhans' cell histiocytosis). Prognostic role of histopathology. *Arch Pathol Lab Med* 1983;107:59-63.
- [90] Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM: Systemic lipopolysaccharide recruits dendritic cell progenitors to nonlymphoid tissues. *Transplantation* 15-5-1995;59:1319-1324.
- [91] Rodrigues MM, Rowden G, Hackett J, Bakos I: Langerhans cells in the normal conjunctiva and peripheral cornea of selected species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:759-765.
- [92] Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1-7-1994;180:83-93.
- [93] Saarinen-Savolainen P, Jarvinen T, raki-Sasaki K, Watanabe H, Urtti A: Evaluation of cytotoxicity of various ophthalmic drugs, eye drop excipients and cyclodextrins in an immortalized human corneal epithelial cell line. *Pharm Res* 1998;15:1275-1280.
- [94] Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1-8-1995;182:389-400.
- [95] Sallusto F, Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1-4-1994;179:1109-1118.
- [96] Salonen E, Vaheri A, Tervo T, Beuerman R. Toxicity of ingredients in artificial tears and ophthalmic drugs in a cell attachment and spreading test. *Toxicol Cut & Ocular Toxicol* [10], 157-166. 1991.
- [97] Samples JR, Binder PS, Nayak S: The effect of epinephrine and benzalkonium chloride on cultured corneal endothelial and trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 1989;49:1-12.

- [98] Satthaporn S, Eremin O: Dendritic cells (I): Biological functions. *J R Coll Surg Edinb* 2001;46:9-19.
- [99] Scholz M. In vitro-Permeationsstudien von hydrophilen und lipophilen Arzneistoffen an okularen Geweben und Zellkulturen. Dissertation , 27-31. 2003.
- [100] Schuler G, Steinman RM: Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1-3-1985;161:526-546.
- [101] Stachs O, Zhivov A, Kraak R, Stave J, Guthoff R: In vivo three-dimensional confocal laser scanning microscopy of the epithelial nerve structure in the human cornea. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:569-575.
- [102] Stave J, Guthoff R: [Imaging the tear film and in vivo cornea. Initial results with a modified confocal laser scanning ophthalmoscope]. *Ophthalmologie* 1998;95:104-109.
- [103] Stave J, Slowik C, Somodi S, Hahnel C, Grummer G, Guthoff R: [Keratinocyte density of the cornea in vivo. Automated measurement with a modified confocal microscopy Microphthal]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1998;213:38-44.
- [104] Stave J, Zinser G, Grummer G, Guthoff R: [Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of in vivo presentation of corneal structures]. *Ophthalmologie* 2002;99:276-280.
- [105] Steinman RM: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-296.
- [106] Steinman RM, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1-5-1973;137:1142-1162.
- [107] Stern ME, Siemasko KF, Gao J, Calonge M, Niederkorn JY, Pflugfelder SC: Evaluation of ocular surface inflammation in the presence of dry eye and allergic conjunctival disease. *Ocul Surf* 2005;3:S161-S164.
- [108] Strunk D, Egger C, Leitner G, Hanau D, Stingl G: A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* 17-3-1997;185:1131-1136.
- [109] Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S: Conjunctival inflammation induces Langerhans cell migration into the cornea. *Curr Eye Res* 2000;21:550-553.
- [110] Thoft RA, Friend J: The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1442-1443.
- [111] Tian YJ, Liu Y, Zou HD, Jiang YJ, Liang XQ, Sheng MJ, Li B, Xu X: [Epidemiologic study of dry eye in populations equal or over 20 years old in Jiangning District of Shanghai]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2009;45:486-491.
- [112] Tomii S, Kinoshita S: Observations of human corneal epithelium by tandem scanning confocal microscope. *Scanning* 1994;16:305-306.

- [113] Tripathi BJ, Tripathi RC, Kolli SP: Cytotoxicity of ophthalmic preservatives on human corneal epithelium. *Lens Eye Toxic Res* 1992;9:361-375.
- [114] Villani E, Galimberti D, Viola F, Mapelli C, Ratiglia R: The cornea in Sjogren's syndrome: an in vivo confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2017-22.
- [115] Vogt A: *Lehrbuch und Atlas der Spaltlampenmikroskopie des lebenden Auges*, S.50; ed 2. Springer, Berlin, 1930.
- [116] Wessels IF, Bekendam P, Calvin WS, Zimmerman GJ. Open drops in ophthalmology offices: expiration and contamination. *Ophthalmic Surg Lasers* 1999 Jul-Aug; 30(7): 540-6.
- [117] Wilson WS, Duncan AJ, Jay JL: Effect of benzalkonium chloride on the stability of the precorneal tear film in rabbit and man. *Br J Ophthalmol* 1975;59:667-669.
- [118] Yamagami S, Hamrah P, Miyamoto K, Miyazaki D, Dekaris I, Dawson T, Lu B, Gerard C, Dana MR: CCR5 chemokine receptor mediates recruitment of MHC class II-positive Langerhans cells in the mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1201-1207.
- [119] Yamagami S, Tomohiko U, Amano S, Ebihara N: Bone Marrow-Derived Cells in Mouse and Human Cornea. *Cornea* 2005;24:71-74.
- [120] Young TL, Higginbotham EJ, Zou XL, Farber MD: Effects of topical glaucoma drugs on fistulized rabbit conjunctiva. *Ophthalmology* 1990;97:1423-1427.
- [121] Zhivov A, Beck R, Stachs O, Guthoff RF: In vivo confocal microscopic study of Langerhans cells in the corneal epithelium after preservatives holding local therapy in glaucoma patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2007; Poster 4303.
- [122] Zhivov A, Blum M, Guthoff RF, Stachs O: Real-time mapping of the subepithelial nerve plexus by in vivo confocal laser scanning microscopy. *Br J Ophthalmol* 2010;94:1133-1135.
- [123] Zhivov A, Stachs O, Kraak R, Guthoff R. Zelluläre Lasermikroskopie zur Detektion von Infiltraten und Ulzera der Hornhaut. *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 2008.
- [124] Zhivov A, Stachs O, Kraak R, Stave J, Guthoff RF: In vivo confocal microscopy of the ocular surface. *Ocul Surf* 2006;4:81-93.
- [125] Zhivov A, Stachs O, Stave J, Guthoff RF: In vivo three-dimensional confocal laser scanning microscopy of corneal surface and epithelium. *Br J Ophthalmol* 2009;93:667-672.
- [126] Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R: In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:1056-1061.
- [127] Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R: In vivo confocal microscopic evaluation of langerhans cell density and distribution in the corneal epithelium of healthy volunteers and contact lens wearers. *Cornea* 2007;26:47-54.

## 11. Thesen

1. In der doppelblinden, placebokontrollierten klinischen Studie wurden 20 gesunde Probanden über einen Zeitraum von 12 Wochen mit 0,01 %igem Benzalkoniumchlorid als Testsubstanz in Augentropfen an jeweils einem randomisiert festgelegten Auge ausgesetzt. Alle Probanden wurden zu Studienbeginn, nach einer Woche, sechs und zwölf Wochen sowie vier Wochen nach Absetzen der Studienmedikation einer ausgiebigen allgemeinen ophthalmologischen Untersuchung zugeführt, vor allem zur Erhebung von Parametern, die eine Sicca – Symptomatik zeigen. Im Anschluss daran wurde die Hornhaut jedes Auges konfokal mikroskopisch auf Unterschiede in der Langerhanszellzahldichte untersucht.
2. Bei allen Probanden konnten schon zur Studienaufnahmeuntersuchung Langerhanszellen in der Kornea konfokal mikroskopisch dargestellt werden: in der Placebogruppe  $59 \pm 46$  Ze /  $\text{mm}^2$  zentral und  $102 \pm 28$  Ze /  $\text{mm}^2$  peripher; in der BAC – Gruppe  $37 \pm 29$  Ze /  $\text{mm}^2$  zentral und  $92 \pm 24$  Ze /  $\text{mm}^2$  peripher. Damit werden vorhergehende Studien zur Präsenz von Langerhanszellen auch in gesunden Hornhäuten bestätigt.
3. Im Vergleich zur Anwendung der Placebolösung war schon nach sechswöchiger und noch deutlicher nach 12-wöchiger Applikation der BAC – haltigen Augentropfen ein statistisch grenzwertig signifikanter Anstieg der Langerhanszellzahl im Zentrum zu beobachten (6 Wochen :  $p=0,034$  bzw. 12 Wochen:  $p=0,016$ ), in der Peripherie stellte sich dieser verzögert nach zwölf Wochen ein ( $p=0,041$ ). Im Vergleich zum Ausgangswert kam es im Zentrum nur bei der BAC – Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der LZen nach 12 Wochen ( $p=0,001$ ). Peripher war ein signifikanter Anstieg sowohl bei der BAC – als auch bei der Placebo – Gruppe zu verzeichnen ( $p=0,005$  und  $p=0,011$ ) Vier Wochen nach Absetzen der Medikation sank die Langerhanszellzahl sowohl im Zentrum als auch in der Peripherie nahezu auf die Ausgangswerte wieder ab.
4. Es wird vermutet, dass es sich bei den relativ schnellen Änderungen in der LZ – Dichte während der Studie unter dem Einfluss von BAC um eine Migration der Zellen

5. Die von vielen Autoren benannten und in epidemiologischen Studien valide geprüften unerwünschten Arzneimittelwirkungen durch BAC konnten nach der zwölfwöchigen BAC – Exposition in einer Konzentration von 0,01 % nicht bestätigt werden. Es kam zu keinen nennenswerten Arzneimittelunverträglichkeiten. Es war lediglich ein Abwärtstrend in der Tränenfilmproduktion detektierbar.
6. Die Entstehung einer Keratokonjunktivitis sicca konnte nach dreimonatiger Anwendung von BAC in einer Konzentration von 0,01 % nicht gefunden werden. Bei kurzfristiger Applikation von BAC scheint dieses nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Tränenfilmproduktion und – stabilität zu haben.
7. Mit der durchgeführten Studie konnte eine subklinische Reaktion auf einen allogenen Reiz, hier als BAC, mit der Variabilität der Expression von Langerhanszellen nachgewiesen werden. Nur vier Wochen nach Absetzen der Prüfmedikation normalisierte sich die LZ – Zahl wieder auf sonst physiologisch vorkommende Werte.
8. Zur Planung von operativen Eingriffen am Auge lässt sich die Untersuchung auf Langerhanszellen in der Cornea in Zukunft evtl. nutzen, um die immunologische Situation am Auge abzuschätzen. Durch Absetzen von konservierungsmittelhaltigen Ophthalmika könnte ein für die Operation optimaler entzündungsfreier Zeitpunkt gewählt werden. Des weiteren wird die Bedeutung von konservierungsmittelfreien Präparaten für Patienten mit okulären Oberflächenproblemen, wie z.B. nach Keratoplastik und Patienten mit chronischen entzündlichen Erkrankungen deutlich. Hier könnten solche Präparate eine wichtige Rolle für einen schnelleren Heilungsprozess einnehmen.

## 12. Veröffentlichungen

### **Wissenschaftliche Publikation:**

Zhivov, A., Kraak, R., Bergter, H., Kundt, G., Beck, R., Guthoff, R.F.:

“Influence of benzalkonium chloride on langerhans cells in corneal epithelium and development of dry eye in healthy volunteers”; Curr Eye Res. 2010 Aug;35(8):762-9.

### **Kongressbeiträge:**

Zhivov A., Kraak R., Bergter H., Beck R., Guthoff R.F.:

“Influence of benzalconium chloride on langerhans cells in corneal epithelium and deveStopment of dry eye in healthy volunteers. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology 2008; Abstract 441.

Zhivov A., Kraak R., Bergter H., Kundt G., Beck R.,Guthoff R. F.:

„Stimulierung von Langerhanszellen im Hornhautepithel und Sicca – Syndrom durch Benzalkoniumchlorid“; Klinische Doppelblindstudie

Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) 2008

### **Förderpreis:**

Preis der Sicca – Forschungsförderung 2007 des Ressorts Trockenes Auge im BVA in der Forschungsgruppe um Dr. A. Zhivov: „Stimulierung von Langerhanszellen im Hornhautepithel beim Sicca – Syndrom durch Applikation von konservierungsmittelhaltigen Augentropfen“

### **13. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift „Die Stimulierung von Langerhanszellen im Hornhautepithel und Evaluation der Entstehung einer Sicca – Symptomatik durch die Benzalkoniumchlorid – Applikation bei gesunden Probanden“ selbstständig und ohne Hilfe Dritter verfasst habe. Die Dissertationsschrift stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Ich habe bisher an keiner in – oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift