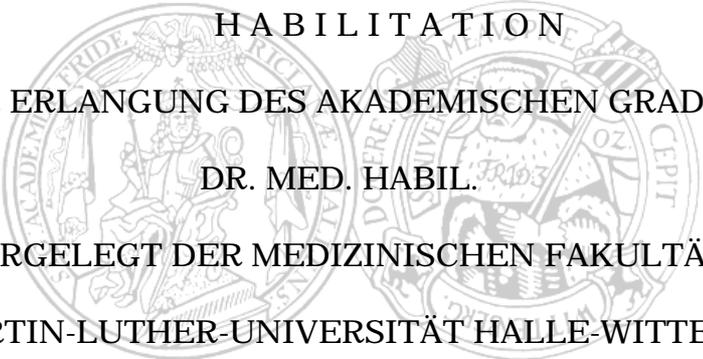


AUS DER UNIVERSITÄTSKLINIK UND POLIKLINIK FÜR  
AUGENHEILKUNDE

KORNEALE WUNDHEILUNG NACH  
FEMTOSEKUNDEN-LASER-ASSISTIERTER  
INTRASTROMALER GEWEBEABLATION

HABILITATION  
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES  
DR. MED. HABIL.  
VORGELEGT DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG



VON DR. MED. CHRISTIAN GERHARD ULRICH MELTENDORF  
GEBOREN AM 12. OKTOBER 1972 IN BERLIN

# GUTACHTER

PROF. DR. MED. THOMAS REINHARD

PROF. DR. MED. BERTHOLD SEITZ

DATUM DER VERTEIDIGUNG: 15. MAI 2012

---

# REFERAT UND

## BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG

### **Hintergrund.**

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die korneale Wundheilung nach isolierter intrastromaler Keratotomie mittels Femtosekunden (fs)-Laser zu untersuchen. Ferner sollte bestimmt werden, ob durch intrastromale Photodisruption eine Gewebeablation der Hornhaut erreicht werden kann.

### **Material und Methoden.**

Zwölf Kaninchen erhielten eine fs-Laser-assistierte monokulare intrastromale Keratotomie in einer präoperativ festgelegten Tiefe von 160 bis 200  $\mu\text{m}$ . Das Ergebnis der anschließenden Wundheilung wurde verglichen mit der von nicht behandelten Augen und Augen die einer Photorefraktiven Keratektomie (PRK) unterzogen worden waren. Nachbeobachtungen erfolgten 1, 3, 7 und 28 Tage nach dem Eingriff. Die Hornhäute wurden mittels Spaltlampenmikroskopie, in vivo Konfokalmikroskopie und Lichtmikroskopie untersucht. Fibronectin und Tenascin als Komponenten der extrazellulären Matrix wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Thy-1-,  $\alpha\text{SMA}$ -Antikörper und Phalloidin dienten der Darstellung von Fibroblasten. Die Detektion von Zell-Proliferation und DNA-Fragmentation erfolgte mit Ki-67-Antikörpern und einem TUNEL-Assay. Neben dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von TGF- $\beta$ 1-Protein wurden durch Verwendung der Laser-Mikrodissektion epitheliale, stromale und endotheliale Zellverbände gewonnen und Veränderungen der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

Darüber hinaus wurden bei Kaninchenaugen 14 übereinanderliegende intrastromale Keratotomien (fs-Keratektomie) mit dem fs-Laser erzeugt. Ausgewachsene Tiere (Gruppe 1, 10 Augen) erhielten eine beidseitige Behandlung, Heranwachsende Kaninchen (Gruppe 2, 4 Augen) wurden einseitig behandelt. Spaltlampenuntersuchung, Pachymetrie und Keratometrie wurden 9, 31 und 86 Tage (Gruppe 1) bzw. 12, 29, 69, 176 und 318 Tage (Gruppe 2) nach der Behandlung bestimmt.

### **Ergebnisse.**

Die intrastromale Keratotomie mit dem fs-Laser führte zu einer hypozellulären Narbe, die als strichförmiges Band erhöhter Reflektivität bei der Spaltlampenuntersuchung erkennbar wurde. Sowohl eine Ablagerung von Fibronectin und Tenascin, als auch der Zelltod und die Proliferation von Keratozyten wurden beobachtet. Eine Differenzierung von Keratozyten in Thy-1- oder  $\alpha\text{SMA}$ -positive Fibroblasten konnte hingegen nicht detektiert werden. Die TGF- $\beta$ 1-mRNA- und Protein-Expression stieg nach der intrastromalen Keratotomie nicht signifikant an. Im Gegensatz dazu fanden sich nach der PRK, die eine epitheliale und stromale Verletzung bewirkte, aktivierte Fibroblasten im subepithelial gelegenen Stroma. Bei der Spaltlampenuntersuchung zeigte sich eine ausgeprägte subepitheliale Narbenbildung. Die TGF- $\beta$ 1-Expression wurde in epithelialen und stromalen Zellen nach PRK induziert und es konnten bis zu 23-fach höhere TGF- $\beta$ 1-mRNA-Level im Vergleich zu nicht behandelten Augen nachgewiesen werden. Der Anstieg der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Level führte zu einer vermehrten TGF- $\beta$ 1-Protein-Expression.

Die fs-Keratektomie führte 9 Tage nach der Behandlung sowohl zur Schwellung der Hornhaut und einer damit einhergehenden Zunahme der mittleren Hornhautdicke (Gruppe 1:  $+4,40 \pm 5,56 \mu\text{m}$ ), als auch zu einer Abnahme der mittleren Hornhauradien (Gruppe 1:  $-0,18 \pm 0,02 \text{ mm}$ ). Im Gegensatz dazu zeigte sich einen Monat postoperativ eine Abnahme der mittleren Hornhautdicke (Gruppe 2:  $-21,0 \pm 2,5 \mu\text{m}$ ). 6 Monate nach der Behandlung hatte die Hornhautdicke weiter abgenommen (Gruppe 2:  $-36,3 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ), um bis zum Ende des Nachbeobachtungszeitraumes stabil zu bleiben. 176 Tage postoperativ fand sich eine Abnahme der mittleren Hornhauradien (Gruppe 2:  $-0,21 \pm 0,10 \text{ mm}$ ).

### **Diskussion.**

Die fs-Laser-assistierte intrastromale Keratotomie geht mit einer günstigen Wundheilungsreaktion und einem Transparenzverlust der Hornhaut einher. Durch die isolierte stromale Verletzung kann die Induktion des profibrotischen Zytokins TGF- $\beta$ 1 und dadurch die Transformation von Keratozyten in Fibroblasten verhindert werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass durch intrastromale fs-Laser Applikation eine Gewebeablation der Hornhaut zuverlässig erreicht werden kann. Diese Befunde sprechen für eine Weiterentwicklung selektiv intrastromaler Laserbehandlungen zur Korrektur von Refraktionsfehlern.

Meltendorf, Christian G. U.:

Korneale Wundheilung nach Femtosekunden-Laser-assistierter intrastromaler Gewebeablation

Halle, Univ., Med. Fak, Diss., 91 Seiten, 2011

---

# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Hornhaut .....	1
1.1.1	Anatomie der menschlichen Kornea .....	1
1.1.2	Spezielle Anatomie der Kaninchenhornhaut .....	5
1.1.3	Optische Eigenschaften der Hornhaut .....	6
1.1.4	Biomechanik der Hornhaut .....	9
1.1.5	Korneale Wundheilung .....	11
1.2	Refraktive Hornhautchirurgie .....	21
1.2.1	Entwicklung der refraktiven Hornhautchirurgie .....	21
1.2.2	Etablierte refraktiv-chirurgische Laser-Techniken .....	22
1.2.3	Wundheilungsstörungen nach refraktiver Hornhautchirurgie .....	24
1.3	Femtosekunden-Laser .....	25
1.3.1	Grundlagen der Femtosekunden-Laser-Technologie .....	26
1.3.2	Einsatz des Femtosekunden-Lasers in der Hornhautchirurgie .....	28
1.3.3	Intrastromale refraktive Chirurgie mit ultrakurzen Laserpulsen .....	30
2	ZIELSTELLUNG .....	33
3	MATERIAL UND METHODEN .....	35
3.1	Versuchstiere .....	35
3.2	Chirurgische Eingriffe .....	35
3.2.1	Femtosekunden- und Excimer-Laser .....	35
3.2.2	Intrastromale Keratotomie .....	36
3.2.3	Intrastromale Keratektomie .....	37
3.2.4	Photorefraktive Keratektomie .....	38
3.3	Klinische Untersuchungstechniken .....	39
3.3.1	Spaltlampenuntersuchung .....	39
3.3.2	Konfokale in vivo Mikroskopie .....	39
3.3.3	Pachymetrie .....	40

---

3.3.4	Keratometrie.....	40
3.3.5	Optische Kohärenztomographie.....	40
3.4	Laboruntersuchungen .....	40
3.4.1	Fixierung und Herstellung von Gewebeschnitten .....	40
3.4.2	Histochemie und Lichtmikroskopie .....	41
3.4.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	41
3.4.4	TUNEL-Assay.....	43
3.4.5	Laser-Mikrodissektion, RNA-Isolierung und Transkription.....	43
3.4.6	Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	43
3.5	Statistik .....	45
4	ERGEBNISSE.....	47
4.1	Korneale Wundheilung nach intrastromaler Keratotomie.....	47
4.1.1	Transparenz der Hornhaut bleibt erhalten.....	47
4.1.2	Keratozyten-Aktivierung und Ausbildung einer hypozellulären Narbe.....	47
4.1.3	Expression provisorischer extrazellulärer Matrix .....	52
4.1.4	Ausbleibende Transformation von Keratozyten in Myofibroblasten.....	54
4.1.5	Ausbleibende Induktion des Fibrosemarkers TGF- $\beta$ 1 .....	56
4.1.6	Apoptose und Proliferation von Keratozyten.....	59
4.2	Gewebeablation durch intrastromale Keratektomie .....	61
4.2.1	Resorption intrastromaler Kavitationsblasen .....	61
4.2.2	Abnahme der zentralen Hornhautdicke.....	62
4.2.3	Modellierung der Hornhautkrümmung .....	64
5	DISKUSSION .....	66
6	SCHLUSSFOLGERUNG .....	76
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	77
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	79
9	THESEN.....	90

---

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ArF	Argon-Fluorid
bFGF	(engl.) <u>B</u> asic <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
CCT	(engl.) <u>C</u> entral <u>C</u> orneal <u>T</u> hickness
cDNA	(engl.) <u>C</u> omplementary <u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid
DEPC	<u>D</u> iethylpyrocarbonat
DNA	(engl.) <u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid
ECM	(engl.) <u>E</u> xtracellular <u>M</u> atrix
EDA	(engl.) <u>E</u> xtra <u>D</u> omain <u>A</u>
EGF	(engl.) <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
EGFR	(engl.) <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor
FGF	(engl.) <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
FGFR	(engl.) <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor
Fs	Femtosekunde
HGF	(engl.) <u>H</u> epatocyte <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
IGF	(engl.) <u>I</u> nsulin-like <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
IL	Interleukin
KGF	(engl.) <u>K</u> eratocyte <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
LASEK	<u>L</u> aser subepitheliale <u>K</u> eratomileusis
LASIK	<u>L</u> aser in situ <u>K</u> eratomileusis
LMD	<u>L</u> aser- <u>M</u> ikrodissektion
M-CSF	(engl.) <u>M</u> acrophage <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
MMP	<u>M</u> atrix- <u>M</u> etalloproteasen
mRNA	(engl.) <u>M</u> essenger <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
PCR	(engl.) <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PDGF	(engl.) <u>P</u> latelet- <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
PET	<u>P</u> olyethylenterephthalat
PRK	<u>P</u> hotorefraktive <u>K</u> eratektomie
Ps	Pikosekunde
RT-PCR	(engl.) <u>R</u> eal- <u>T</u> ime <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
SMA	(engl.) <u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>A</u> ctin
TGF	(engl.) <u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
Thy-1	<u>T</u> hymozyten-Antigen (CD90)

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Hornhaut

### 1.1.1 Anatomie der menschlichen Kornea

Die Kornea (Hornhaut) ist das optische Fenster des Auges. Sie ist wie ein Uhrglas in die schwächer gekrümmte Sklera (Lederhaut) eingefügt. Zusammen bilden sie die fibröse Hülle des Auges. Eine anatomische Besonderheit stellt die Gefäßfreiheit der Hornhaut dar. Ernährt wird die Kornea aus den Gefäßen der Umgebung, dem Kammerwasser und durch den Tränenfilm.

Der reguläre, durchschnittliche horizontale Hornhautdurchmesser des Erwachsenen beträgt 11,8 mm [1], der vertikale 10,6 mm [2]. Im Zentrum ist die Hornhaut im Mittel 0,55 mm [3], in der Peripherie 0,67 mm dick [2]. Im Horizontalschnitt zeigt die Hornhaut mikroskopisch einen fünfschichtigen Aufbau [4]. Von außen nach innen werden unterschieden:

- vorderes Hornhautepithel (Epithelium anterius)
- Basalmembran des Epithels
- Bowman-Lamelle (Lamina limitans anterior)
- Stroma (Substantia propria)
- Descemet-Membran (Lamina limitans posterior)
- Endothel (Epithelium posterius)

Das Epithel der Hornhaut ist mehrschichtig, platt und unverhornt. Es ist im Mittel 55 µm dick [5]. In den basalen Zellschichten kommen zahlreiche Mitosen vor, die auf die ausgeprägte Regenerationsfähigkeit des Hornhautepithels hinweisen. Während der Embryonalentwicklung entsteht das Hornhautepithel aus dem Oberflächenektoderm des Kopfes [6]. Zusammen mit dem Tränenfilm bildet das Epithel eine glatte Oberfläche, eine Voraussetzung für die Abbildung eines

scharfen Bildes auf der Netzhaut. Darüber hinaus ist die Unversehrtheit des Epithelverbandes für die Keimabwehr notwendig [4].

Unter dem Epithel mit seiner Basalmembran liegt eine etwa 8-14  $\mu\text{m}$  dicke, homogene, zellfreie Schicht, die Bowman-Lamelle. Diese Lamelle stellt eine modifizierte Stromalamelle dar, deren kollagene Fibrillen stärker miteinander verwoben sind als im übrigen Stroma [2,7]. Ober- und unterhalb der Bowman-Lamelle befindet sich ein subepithelialer Nervenplexus. Er wird aus Nervenfasern gebildet, die die Hornhaut im Bereich des Limbus in radiärer Anordnung erreichen und dort das tiefe Hornhautstroma penetrieren [8].

Unter der Bowman-Lamelle beginnt das Stroma der Hornhaut, das etwa 90% der Hornhautdicke ausmacht. Es wird aus Keratozyten und extrazellulärer Matrix (ECM; Kollagenfasern, amorphe Grundsubstanz) gebildet und besitzt einen Wassergehalt von etwa 78% [9]. Daneben sind im Stroma vereinzelt Makrophagen und wandernde lymphatische Zellen nachweisbar.

Die Keratozyten, die nur 9 bis 17% des Stromavolumens einnehmen [10], stammen im Gegensatz zu den Epithelzellen von Mesenchymzellen der Neuralleiste ab [11]. Es handelt sich um modifizierte Fibroblasten [2]. Bei einer Gesamtzahl von 2,0-3,5 Millionen Keratozyten beträgt die Keratozytendichte im Mittel  $20522 \pm 2981$  Zellen/ $\text{mm}^3$ , wobei sie in den vorderen 10% des Stromas am höchsten ist. Die Keratozytendichte korreliert mit dem Alter und nimmt um 0,45% pro Jahr ab [12]. Im physiologischen „Ruhezustand“ besteht bei Keratozyten eine stark reduzierte mitotische Aktivität („*turn over*“ von etwa 2 Jahren) [13]. Die Keratozyten erscheinen als abgeflachte sternförmige Zellen, die parallel zur Hornhautoberfläche liegen. Über mehrere Zellfortsätze stehen sie in Kontakt mit benachbarten Keratozyten. Ein einzelner Keratozyt deckt in etwa eine Fläche von  $1000 \mu\text{m}^2$  ab [10]. Durch Nexus (gap junctions) sind die Keratozyten untereinander verbunden. Diese plaqueartigen Bereiche der Zellkommunikation dienen der metabolischen und der ionalen Koppelung benachbarter Zellen. Auf diese Weise bilden die Keratozyten ein kontinuierliches Synzytium [14]. Über Transmembranproteine (Integrine) bestehen darüber hinaus auch Verbindungen mit der umgebenden ECM [11,15].

Neben der Synthese von Bestandteilen der ECM, scheinen die Keratozyten auch Eigenschaften von Makrophagen zu übernehmen, wenn es zu einer Infektion der Hornhaut kommt [16]. Im avaskulären Gewebe der Hornhaut transportieren die Keratozyten Nährstoffe und andere Metaboliten in das Zentrum der Hornhaut und sorgen für den Abtransport von metabolischen Abfallprodukten.

Die Keratozyten sind zwischen Lamellen paralleler Kollagenfaserbündel eingebettet. Die Faserbündel sind in Lamellen von etwa 2  $\mu\text{m}$  Dicke angeordnet [2]. Im Zentrum der Hornhaut beträgt die Zahl an Lamellen etwa 300, nahe dem Limbus sind es etwa 500 [17]. Die Kollagenfaserbündel der posterior gelegenen Lamellen durchziehen die Kornea in der Frontalebene vollständig und sind im Bereich des Limbus verankert [18,19]. Etwa 50% der Lamellen sind orthogonal entlang des senkrechten oder horizontalen Meridians ausgerichtet [20]. Eine Verzweigung der Kollagenfasern in anteroposteriorer Richtung findet man nur im vorderen Drittel des Stromas [7]. Die Kollagenfasern des Stromas bestehen aus Kollagen Typ I (50-55%), III (25-30%) und V [21-24]. Daneben kommen noch Kollagene vor, die keine Fasern bilden (u.a. Typ VI und XII) [25,26].

Keratozyten und Kollagenfasern des Stromas sind in eine amorphe Grundsubstanz eingebettet, die sich vornehmlich aus Proteoglykanen zusammensetzt. Proteoglykane sind Makromoleküle, die aus einem *core*-Protein bestehen, an das Seitenketten aus Glycosaminoglykanen kovalent gebunden sind (Tab. 1).

**Tabelle 1** Proteoglykane der stromalen Grundsubstanz [27].

Proteoglykane	Glycosaminoglykane
Lumican	Keratansulfat
Keratocan	
Mimecan	
Decorin	Chondroitin- / Dermatansulfat
Perlecan	Heparansulfat

Das Hornhautstroma enthält zwei Klassen an Proteoglykanen: die eine enthält Keratansulfat-Seitenketten und die andere Chondroitin- / Dermatansulfat-Seitenketten. Keratansulfate enthalten die Proteoglykane Lumican, Keratocan, und

Mimecan [28]. Diese drei Proteoglykane unterscheiden sich im Aufbau ihrer *core*-Proteine [29]. Lumican, Keratocan, und Mimecan scheinen den Durchmesser der Kollagenfibrillen regulieren zu können. Decorin, das Dermatansulfat-Seitenketten enthält, hat hingegen die Aufgabe, die kollagenen Fasern in einem regelmäßigen Abstand zueinander zu halten. Das Heparansulfat enthaltene Perlecan kommt nur in geringen Mengen in der Hornhaut vor und wird vom Epithel gebildet [27].

Die Descemet-Membran befindet sich zwischen dem Stroma der Hornhaut und dem Endothel und bildet die Basalmembran der Endothelzellen. Ultrastrukturell besteht sie aus der embryonalen und der im Laufe des Lebens von den Endothelzellen sezernierten Schicht. Ihre Dicke, die daher mit dem Alter zunimmt, beträgt beim Erwachsenen durchschnittlich 10-12  $\mu\text{m}$  [2]. Die Membran besteht aus einer homogenen Grundsubstanz, die ein dreidimensionales Netz zarter Kollagenfibrillen enthält. Dieses bedingt eine hohe Elastizität der Membran.

Das Endothel ist ein typisches einschichtiges Plattenepithel (4-6  $\mu\text{m}$  dick [2]), dessen Zellen eine hexagonale Form besitzen. Wie bereits für die Keratozyten beschrieben, sind die Endothelzellen durch Nexus miteinander verbunden. An seiner Rückfläche wird das Endothel vom Kammerwasser der vorderen Augenkammer umspült. In den ersten Lebensjahren beträgt die durchschnittliche Zelldichte etwa 4000 Zellen/ $\text{mm}^2$  und sinkt dann im Erwachsenenalter auf Werte zwischen 2000-3000 Zellen/ $\text{mm}^2$ . Im Vergleich zum Epithel besitzt das Endothel kaum Fähigkeiten zur Regeneration. Zwar konnten in einzelnen Studien auch beim Endothel des Menschen Mitosen nachgewiesen werden [30,31], jedoch reagiert das Endothel auf Schädigungen vornehmlich durch Abflachung der Zellen, sowie durch Bildung von Riesenzellen [32]. Durch einen aktiven Transport von Ionen und nachfolgendem Wasser aus dem Stroma in das Kammerwasser sorgt das Endothel für eine leichte Dehydrierung der Hornhaut. Zugleich strömen jedoch auch Wasser und Ionen durch die Schlussleisten des Endothels wieder zurück in das Stroma, so dass sich ein Fließgleichgewicht einstellt [33].

### 1.1.2 Spezielle Anatomie der Kaninchenhornhaut

Aufgrund einer im Vergleich zur menschlichen Hornhaut ähnlichen makro- und mikroskopischen Morphologie bietet sich die Kaninchenhornhaut als experimentelles Modell für ophthalmologische Fragestellungen an.

Der mittlere Hornhautdurchmesser beim Kaninchen beträgt horizontal 15,6 mm und vertikal 13,8 mm [34]. Im Zentrum ist die Hornhaut beim adulten Tier  $407 \pm 20$   $\mu\text{m}$  dick [35]. Zu einer Zunahme der Hornhautdicke zur Peripherie hin kommt es im Gegensatz zur humanen Hornhaut nicht. Ihr mittlerer Krümmungsradius an der Vorderfläche beträgt 7,3 mm [34]. Die Krümmungsradien und entsprechend die Brechkraft der Hornhaut sind jedoch stark von Gewicht und Alter des Tieres abhängig (Tab. 2). Nach der Geburt kommt es innerhalb der ersten 30 Wochen zu einer Abnahme der Brechkraft von 60 dpt auf 50 dpt [36]. Zwischen der 60. und 80. Woche stabilisiert sich die Brechkraft bei Werten zwischen 40 und 43 dpt [37].

**Tabelle 2** Brechkraft der Kaninchenhornhaut in Abhängigkeit vom Alter [38].

Alter (Wochen)		Brechkraft der Hornhaut (dpt)	
		Mittelwert $\pm$ SD	Spannweite
20	N=29	46,61 $\pm$ 0,75	44,98 bis 48,17
40	N=34	43,11 $\pm$ 0,76	41,77 bis 44,74
60	N=31	41,72 $\pm$ 0,94	39,44 bis 43,34
80	N=32	41,04 $\pm$ 0,87	39,59 bis 42,74

Das mehrschichtige Epithel hat beim Kaninchen eine Dicke von 30-40  $\mu\text{m}$  [38]. An das Epithel mit seiner Basalmembran grenzt auch beim Kaninchen eine Bowman-Lamelle. Bei niederen Vertebraten ist diese jedoch dünner als beim Menschen. Beim Kaninchen hat sie eine Dicke von 3  $\mu\text{m}$  [39]. Die Dicke der Substantia propria inklusive der Bowman-Lamelle beträgt etwa 250  $\mu\text{m}$ . Die Substantia propria besteht aus Kollagenfibrillen, deren Durchmesser (20-30  $\mu\text{m}$ ) dem der humanen Hornhaut entspricht. Auch die Dicke der Descemet-Membran entspricht mit ca. 5,6  $\mu\text{m}$  in etwa der des Menschen. Eine vergleichende Übersicht über die Größenverhältnisse der verschiedenen Hornhautschichten bietet Tabelle 3.

**Tabelle 3** Mittlere Dicke ( $\mu\text{m}$ ) der Hornhautschichten beim Kaninchen und beim Menschen [2,5,39].

	<b>Epithel</b>	<b>Bowman-Lamelle</b>	<b>Substantia propria (inkl. Bowman-Lamelle)</b>	<b>Descemet- Membran</b>
Kaninchen	30-40	3	250	5,6
Mensch	55	8-14	485	10-12

Die Hauptunterschiede in der mikroskopischen Anatomie zwischen der humanen und der Kaninchenhornhaut bestehen in der Anordnung der Kollagenfibrillen in der epithelialen und endothelialen Basalmembran, kleinen Fenestrierungen in den Keratozyten des posterioren Stromas und der Dichte des subepithelialen Nervenplexus [40].

### 1.1.3 Optische Eigenschaften der Hornhaut

Mit 43 Dioptrien hat die humane Hornhaut den stärksten Anteil an der Gesamtbrechkraft des Auges. Neben der Wölbung der Hornhaut wird diese hohe Brechkraft durch die unterschiedlichen Brechungsindizes der Hornhaut gegenüber den angrenzenden Medien Luft (1,0) und Kammerwasser (1,33) hervorgerufen [41]. Der Tränenfilm hat zwar eine von der Hornhaut abweichende Brechzahl, sein Beitrag zur optischen Wirkung ist wegen der geringen Dicke und weitgehenden Parallelität der Schichtgrenzen im Vergleich zur Hornhaut vernachlässigbar [42]. Die Oberflächenrauigkeit der Hornhautvorderfläche (mittlerer Abstand von Erhebungen und Tälern in der Oberfläche) dürfen  $0,3 \mu\text{m}$  nicht übersteigen, um eine optisch einwandfreie Abbildung zu erreichen [42].

Der für die optische Abbildung wichtige Krümmungsradius der Hornhautvorderfläche beträgt in der Mitte  $7,86 \pm 0,26 \text{ mm}$ , der der Hornhaurückfläche 6,5 bis 6,8 mm. Die mittlere Brechzahl des Hornhautstromas beträgt 1,377. Die Brechkraft der Hornhaut beträgt an der Vorderfläche etwa 48 dpt und an der Rückfläche etwa -6 dpt [42].

Nur eine maximal etwa 2-3 mm große zentrale optische Zone der Hornhaut kann näherungsweise als sphärisch angenommen werden. Der periphere Hornhautbereich besitzt in der Regel einen größeren Krümmungsradius und ist damit flacher

als das Zentrum (prolate Geometrie). Außerdem kann die gesamte Hornhaut in einem bestimmten Meridianschnitt etwas stärker gekrümmt sein als in einem Schnitt senkrecht dazu (natürlicher Astigmatismus). Die Hornhaut hat doppelbrechende Eigenschaften, welche jedoch für die optische Abbildung keine wesentliche Rolle spielen [42]. Eine der wichtigsten Eigenschaften der Hornhaut ist ihre Transparenz. Verschiedenene Faktoren gewährleisten diese Eigenschaft. Dazu gehören [43]:

- (1) regelmäßiger Durchmesser, Abstand und Ausrichtung der Kollagenfibrillen
- (2) stabile Hydratation des Gewebes
- (3) glatte Oberfläche und intakter Tränenfilm
- (4) geringe Reflektivität der Keratozyten
- (5) Avaskularität

Die Hornhaut besitzt die Fähigkeit, fast das gesamte einfallende Licht im sichtbaren Spektrum zu transmittieren. Im Vergleich zu den anderen brechenden Medien des Auges hat die Hornhaut einen relativ großen spektralen Durchlässigkeitsbereich. Er beginnt bei 293 nm und endet im nahen Infrarotbereich [42]. Bis heute gibt es jedoch keine allgemein anerkannte Erklärung für diese Eigenschaft der Hornhaut [44]. Alle Erklärungsversuche müssen die Struktur der Hornhaut berücksichtigen, das heißt die Größe und Form ihrer Bestandteile und deren Brechungsindizes. Die meisten der modernen Erklärungsansätze basieren auf der „*lattice theory*“ von Maurice [45], nach der es aufgrund der regelmäßigen, gitterförmigen Anordnung der Kollagenfibrillen zu einer gegenseitigen Auslöschung der streuenden Lichtwellen kommt (destruktive Interferenz). Im Endeffekt verlässt demnach fast das gesamte einfallende Licht die Hornhaut in gerader Richtung. Jedoch findet sich weder in der Elektronenmikroskopie, noch in der Röntgenbeugungsanalyse die dafür notwendige reguläre Anordnung der Kollagenfibrillen [46,47]. Unbestritten hingegen ist, dass die einzelne Fibrille kaum zur Lichtstreuung beiträgt, da ihr Durchmesser ( $30,8 \pm 0,8$  nm) kürzer als die Wellenlänge des durchfallenden Lichts ist und ihr Brechungsindex ( $1,411 \pm 0,001$ ) fast dem der

Grundsubstanz ( $1,365 \pm 0,003$ ) entspricht [18]. Die zu beobachtende Transmission durch die Hornhaut kann aber aufgrund der großen Zahl an Fibrillen und die dadurch hervorgerufene Streustrahlung nur durch das Auftreten destruktiver Interferenzen erklärt werden [48].

Ferner hängt die Transparenz von der Hydratation der Hornhaut ab [33]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass sich der Durchmesser der Kollagenfibrillen in geschwollenen Hornhäuten nicht wesentlich von dem bei normalen Fibrillen unterscheidet. Dies legt nahe, dass die Schwellung der Hornhaut eher auf eine Volumenzunahme der wasserbindenden Glykosaminoglykane zurückzuführen ist [49]. Die maximale Transparenz der Hornhaut ist bei einem hydrostatischen Druck von  $-40$  mmHg, also einer leichten Dehydrierung, gegeben. Die Dehydrierung wird durch den aktiven Transport von Ionen und nachfolgendem Wasser aus dem Stroma in das Kammerwasser aufrechterhalten [33]. Von besonderer Bedeutung für diese Transportvorgänge ist die im Hornhautendothel lokalisierte  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$  [4]. Zugleich strömen jedoch auch Wasser und Ionen durch die Schlussleisten des Endothels wieder zurück in das Stroma und verringern den negativen Druck, so dass sich ein Fließgleichgewicht einstellt. Erst die Balance zwischen aktivem Transport und Leckfluss gewährleistet die normale leichte Dehydratation und damit die Transparenz der Hornhaut. Im Hornhautendothel sind sowohl der Leckfluss, als auch der dem aktiven Ionentransport folgende Wassertransport um etwa eine Dekade größer als im Hornhautepithel. Schädigungen des Hornhautendothels verursachen daher stärkere Veränderungen der Hornhauttransparenz als vergleichbare Schädigungen des Hornhautepithels [33]. Die optischen Eigenschaften der Hornhaut hängen dennoch sehr von einem intakten Hornhautepithel ab. Jede Unregelmäßigkeit der Oberfläche führt aufgrund des bereits genannten großen Unterschiedes in den Brechungsindizes des Tränenfilms / Hornhautepithels gegenüber dem angrenzenden Medium Luft zu einer deutlichen Minderung der Abbildungsqualität des Auges. Bereits bei einer glatten, normalen Hornhautoberfläche tritt jedoch an dieser Grenzfläche zusammen mit der Grenzfläche Endothel / Kammerwasser der größte Teil der kornealen Lichtstreuung auf. Andere Strukturen wie beispielsweise die Zellkerne der

Keratozyten oder die Nervenfasern bedingen nur ein geringes Maß an Streuung [50]. Die geringe Reflektivität der Keratozyten wird auf ihren hohen Gehalt an sogenannten „kornealen Kristallinen“ (Transketolase und Aldehyddehydrogenase) zurückgeführt [50]. Die Expression an Kristallinen ist während kornealer Wundheilungsprozesse in den Keratozyten reduziert und mag zum Transparenzverlust der Zellen beitragen [51-53].

Die Avaskularität, das Fehlen von Blutgefäßen in der Hornhaut, ist eine weitere Voraussetzung für die Transparenz der Kornea. In jüngsten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression eines löslichen Angiogenesefaktor-Rezeptors (*vascular endothelial growth factor receptor-1*) eine Voraussetzung für die Gefäßfreiheit der Hornhaut ist [54].

#### 1.1.4 Biomechanik der Hornhaut

Die biomechanischen Eigenschaften der Hornhaut schränken die Vorhersagbarkeit der Ergebnisse und Stabilität refraktiv-chirurgischer Eingriffe ein und können dazu beitragen, dass es zu Diskrepanzen zwischen präoperativ angestrebten und postoperativ erzielten Refraktionsergebnissen kommt. Das der Laser in situ keratomileusis (LASIK) und der Photorefraktiven Keratektomie (PRK) zugrundeliegende „*shape-subtraction*“-Model beruht auf der Annahme, dass die Hornhaut biologisch und biomechanisch inert ist [55,56]. Durch empirische Modifikationen der verwendeten Algorithmen hat sich jedoch die Vorhersagbarkeit der refraktiv-chirurgischen Verfahren LASIK und PRK deutlich verbessert. Die individuelle Reaktion des Gewebes auf den refraktiv-chirurgischen Eingriff wird dabei jedoch nach wie vor nicht berücksichtigt. So nimmt beispielsweise die Steifigkeit der Hornhaut durch zunehmende Quervernetzung der Kollagenfibrillen mit dem Alter zu [57]. Bei prädisponierten Patienten kann die mit einem refraktiv-chirurgischen Eingriff verbundene biomechanische Schwächung der Hornhaut zu einer Keratektasie führen [58].

Die bei einer Myopiebehandlung mittels LASIK oder PRK zu beobachtende Abflachung der zentralen Hornhaut beruht auf einer komplexen biomechanischen Antwort der Hornhaut. Würde die Hornhaut einfach nur eine elastische Schale

darstellen, würde der bei der Behandlung erfolgende Gewebeabtrag zu einer Vorwölbung und damit zu einer Aufsteilung der zentralen Hornhaut führen. Durch den zentralen Gewebeabtrag kommt es jedoch auch zu einer Abnahme der Zugkräfte peripher gelegener Lamellen und zu einer peripheren Schwellung der Hornhaut [59]. Es wird vermutet, dass die Ausdehnung des peripheren Stromas Zugkräfte auf tieferliegende Lamellen ausübt und so eine zentrale Abflachung resultiert [58].

Eine Änderung der Biomechanik kann dabei zu einer unmittelbaren Formänderung der Hornhaut führen. Es ist aber auch möglich, dass es zu einer Instabilität der Form oder zu einer vermehrten Empfindlichkeit für Formänderungen durch Hydratation oder Hypoxie kommt.

Von den fünf Schichten der Hornhaut enthalten nur die Bowman-Lamelle und das Stroma Kollagenfasern. Damit tragen vor allem diese beiden Schichten zur Zugfestigkeit bei. Im vorderen Stroma sowie in der Hornhautperipherie sind die Lamellen stärker miteinander verwoben [60,61]. Dies bedingt eine größere Widerstandskraft gegenüber Scherkräften [62] und führt zu einer Übertragung der einwirkenden Kräfte auf die benachbarten Lamellen [56,59]. Die Descemet-Membran ist hingegen sehr dehnbar und besitzt nur eine geringe Steifigkeit. Diese Eigenschaft soll das Endothel gegenüber biomechanischen Belastungen schützen.

In der Sprache der Werkstoffkunde ist die Hornhaut ein anisotroper Verbundstoff mit nicht-linearen elastischen und viskoelastischen Eigenschaften. Die Hornhaut kann als Verbundstoff beschrieben werden, da das Hornhautstroma aus den beiden Materialien Kollagen und Grundsubstanz zusammengesetzt ist. Die Elastizität der Hornhaut besteht darin, dass sie unter Krafteinwirkung ihre Form verändert und bei Wegfall der einwirkenden Kraft in die Ursprungsform zurückzukehrt. Die Verformung der Hornhaut erfolgt dabei jedoch nicht linear zu der angelegten äußeren Kraft. Anisotropie besagt, dass die elastischen Eigenschaften von der Richtung der einwirkenden Kraft abhängig sind. Die Elastizität der Hornhaut zeigt ferner lokale Unterschiede [63]. Neben elastischen Eigenschaften zeigt die Hornhaut auch ein visköses Verhalten. Die Hornhaut relaxiert nach Entfernen der externen Kraft zunächst nur unvollständig, da die verbleibende Energie teilweise in

Form von Fließvorgängen abgebaut wird [58]. Das Deformationsverhalten der viskoelastischen Hornhaut kann durch Bestimmung der kornealen Hysterese beschrieben werden. Die korneale Hysterese wird mit dem *Ocular response analyzer* (ORA) bestimmt [64-66].

Um die biomechanische Antwort der Hornhaut auf refraktiv-chirurgische Eingriffe voraussagen zu können, wurden zahlreiche Modelle entwickelt. Moderne Computersimulationen integrieren dabei strukturelle, biomechanische und optische Eigenschaften der Hornhaut [67]. Die Genauigkeit einer solchen Simulation hängt jedoch immer von der Validität der zugrundeliegenden Daten ab. Die Fortschritte in der Bildgebung des vorderen Augenabschnittes haben in den letzten Jahren dazu geführt, dass die Geometrie der Hornhaut sehr präzise bestimmt werden kann. Mit Hilfe der Finite-Elemente-Methode kann die Geometrie der Hornhaut in eine bestimmte Anzahl von Elementen endlicher (finiter) Größe aufgeteilt werden [68,69]. Die Auswirkungen eines chirurgischen Eingriffs oder einer Hornhauterkrankung auf die Geometrie der Hornhaut können dann zunächst für jedes einzelne Element und schlussendlich für die gesamte Hornhaut durch Iteration bestimmt werden. Die Einbeziehung der Materialeigenschaften in solche Computersimulationen, wie die Heterogenität der Hornhaut, der Schwellungszustand und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherkräften ist für die Voraussage der Auswirkungen operativer Eingriffe dabei von großer Bedeutung [70,71]. Der Einsatz von Computersimulationen hat aber bislang noch nicht Einzug in den klinischen Alltag gefunden.

#### 1.1.5 Korneale Wundheilung

Als Wunde bezeichnet man eine mit Substanzverlust einhergehende Zusammenhangstrennung von Geweben. Nach einem Gewebsdefekt kann es zur Wiederherstellung der normalen Histoarchitektur des Gewebes kommen. Dies wird als Regeneration bezeichnet. In den Fällen, in denen postmitotische Zellen von Ruhewebe irreversibel untergegangen sind oder der Defekt so erheblich ist, dass die Basalmembran und die Stromastruktur zerstört sind, wird der Gewebsdefekt jedoch durch Ersatzgewebe geschlossen [72]. Das Ergebnis ist eine

Narbenbildung. Bei der Hornhaut führt eine Narbenbildung zum Verlust an Transparenz. Ob es nach einer Hornhautverletzung zur Ausbildung einer Narbe kommt oder nicht, hängt nach Meinung einiger Autoren auch davon ab, inwieweit es zu einer Aktivierung der an der Bindegewebsbildung beteiligten Fibroblasten kommt [73].

Die korneale Wundheilung ist ein komplexer Vorgang, bei dem es zu zytokinvermittelten Interaktionen von Epithelzellen, Keratozyten und Endothelzellen kommt. Daneben wird die korneale Wundheilung vom Nervensystem der Hornhaut, dem Tränenapparat und den Zellen des Immunsystems beeinflusst [74]. Um die korneale Wundheilung gezielt medikamentös beeinflussen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die komplexen Kaskaden auf molekularer und zellulärer Ebene zu verstehen [75].

#### **1.1.5.1 Epitheliale Wundheilung**

Nach Verletzung bzw. Entfernung des Epithels kommt zu einer Regeneration. Die Regeneration erfolgt durch die basalen Zellschichten. Bereits innerhalb der ersten Stunde wird eine Ausbreitung der benachbarten Epithelzellen beobachtet [76]. Bei einer vollständigen Entfernung des Epithels wird ein Epithelschluss nach 3-6 Tagen erreicht. Damit erfolgt der Epithelschluss an der Hornhaut deutlich schneller als nach Hautverletzungen [77,78]. Im Rahmen der Regeneration kommt es zunächst zu einer Verdickung des Epithels, die sich im Verlauf aber wieder zurückbildet.

Voraussetzung für eine regelrechte epitheliale Wundheilung ist eine Exsudation von Serumproteinen aus den umgebenden konjunktivalen Kapillaren sowie aus der Tränenflüssigkeit. Dies bewirkt die Ausbildung einer die Wundfläche bedeckenden Fibronektinschicht [78]. Fibronektin dient als Matrix der Epithelmigration und aktiviert die Phagozytose von zellulärem Debris durch neutrophile Granulozyten [13]. Aus den an den Wundrand grenzenden epithelialen Basalzellen sowie aus neutrophilen Granulozyten der Tränenflüssigkeit werden Metalloproteinasen (MMP) freigesetzt, die für die Beseitigung von pathogenen Keimen und Zelldebris verantwortlich sind [79]. Anschließend migrieren die Epithelzellen über den Wundbereich und sorgen für eine einschichtige Reepithelisierung der Wundfläche.

Anschließend erfolgt der Wiederaufbau eines mehrschichtigen Epithels. Substanzdefekte des Stromas können dabei durch das Epithel ausgeglichen werden [13]. Eine neue Basalmembran wird etwa eine Woche nach der Verletzung durch die basalen Epithelzellen gebildet. Die vollständige Wiederherstellung der für die Stabilität der Adhäsion wichtigen epithelialen Adhäsionskomplexe dauert jedoch Monate. Nur im Fall einer Verletzung der Bowman-Lamelle kommt es zu einer Narbenbildung in diesem Bereich [13].

### 1.1.5.2 Stromale Wundheilung

Im Rahmen der stromalen Wundheilung kommt es initial zu einer Schwellung der stromalen Lamellen und zu einer Ablagerung von Fibrin und Fibronectin im Wundbereich. Bereits 4 Stunden nach Verletzung kommt es in der Umgebung der Wunde zu einem kompletten Verlust an Keratozyten [80]. Zwölf bis 24 Stunden nach Läsionierung beginnen Entzündungszellen (Makrophagen und Monozyten) den Wundbereich zu infiltrieren [81]. Zu dieser Zeit kommt es im Randbereich des zellfreien Stromas zu einer Proliferation von Keratozyten und zu deren Migration in den Wundbereich [76]. Sie formen dort ein dichtes Netzwerk um die Wunde [13]. Nach 44 Stunden werden die höchsten Mitoseraten nachgewiesen [80]. Migration und Mitoseraten werden dabei durch Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF) und *fibroblast growth factor* (FGF) reguliert [82].

Die im epithelialisierten Randbereich der Wunde sowie in tieferen Stromaschichten vorhandenen Keratozyten zeigen früh (24-48h nach Trauma) ultrastrukturelle Zeichen einer Aktivierung (z.B. Aktivierung des endoplasmatischen Retikulums, Mikrotubuli, Prominenz des Golgi-Apparats, kortikale Mikrofilamente) sowie einen Umbau ihrer gap junctions, wobei insbesondere das Connexin-43 verlorenght. Verbunden sind diese Veränderungen mit einem Verlust der zytoplasmatischen Ausläufer und einem Abrunden der Keratozyten [83]. Damit zeigen sie deutliche ultrastrukturelle Veränderungen gegenüber den normalen Keratozyten [84,85] und werden als Fibroblasten bezeichnet. Neben den Keratozyten transdifferenzieren aber auch zirkulierende Monozyten in Fibroblasten. Die Fibroblasten wandeln sich ab dem 3. Tag nach Verletzung in Myofibroblasten um [86]. Myofibroblasten sind charakterisiert durch intrazellulär

nachzuweisendes  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) [86]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Transdifferenzierung durch *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  induziert wird [87-89]. Die kontraktile Eigenschaften der Myofibroblasten ermöglichen eine Wundkontraktion mit konsekutiver Reduktion der Wundspaltengröße [85].

Neben der Wundkontraktion sorgen die Myofibroblasten auch für die Neusynthese extrazellulärer Matrix (Tab. 4). Zwischen den Myofibroblasten und der ECM kommt es zu zahlreichen Interaktionen: So sezernieren die Myofibroblasten nicht nur Fibronectin als Bestandteil der provisorischen ECM, sondern auch einen Fibronectin Rezeptor ( $\alpha 5 \beta 1$  Integrin), möglicherweise um ihre eigene Migration zu ermöglichen [90]. Neue ECM wird relativ rasch synthetisiert. Kollagenfibrillen konnten in transmissionselektronen-mikroskopischen Untersuchungen bereits 72 Stunden nach Verletzung nachgewiesen werden [13,91]. Das neu gebildete Kollagen entspricht in seiner Zusammensetzung und Anordnung jedoch nicht dem ursprünglichen Zustand. Dies führt dazu, dass die Transparenz verlorenght [76,82,92,93]. Auch die Zusammensetzung der sezernierten Glycosaminoglykane entspricht nicht den physiologischen Verhältnissen. So wird die Produktion der Keratansulfate zunächst herunter reguliert, während Chondroitinsulfate vermehrt synthetisiert werden [94,95]. Der hohe Gehalt an Chondroitin 4- und 6-sulfaten sowie an Hyaluronsäure mögen für den hohen Wassergehalt des frischen Narbengewebes verantwortlich sein [94]. Die Zusammensetzung der Glycosaminoglykane im Narbengewebe ähnelt der während der Ontogenese [94,96-98].

Neben Kollagenen und Glycosaminoglykanen gehören Fibronectin und Tenascin zu den Komponenten der synthetisierten provisorischen ECM. Zelluläres Fibronectin (cFN) wird von Fibroblasten gebildet und besitzt einerseits eine Art Brückenfunktion zwischen Kollagenfibrillen und anderen Molekülen der ECM [99,100]. Andererseits dient es als Adhäsionsmolekül für verschiedene Zellen während ihrer Migration. Um diese Funktionen erfüllen zu können enthält Fibronectin Bindungsregionen für Fibrin, Heparin und Kollagen sowie eine Zellbindungsregion. Die Expression von Fibronectin kann *in vitro* durch

verschiedene Substanzen gefördert werden. Dazu gehören Serum, cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Glucokortikoide, EGF, TGF- $\beta$  und *platelet-derived growth factor* (PDGF) [101].

**Tabelle 4** Komponenten der provisorischen extrazellulären Matrix der Kornea [28].

Komponenten	Lokalisation	Literatur
Kollagen III	Wundgebiet	Chen et al. (2000) [102], Ljubimov et al. (1998) [103]
Kollagen IV	Stroma	Kaji et al. (2000) [104]
Fibrillin	Stroma	Ljubimov et al. (1998) [103]
Fibrin	Stroma	Drew et al. (2000) [105]
Fibronectin	Stroma	Iglesia et al. (2000) [106]
Laminin-1	Basalmembran	Suzuki et al. (2000) [107]
Laminin-5	Basalmembran	Iglesia et al. (2000) [106]
Lumican	Basalmembran	Saika et al. (2000) [108]
Perlecan	Stroma	Iglesia et al. (2000) [106]
Tenascin-C	Stroma	Ljubimov et al. (1998) [103], Iglesia et al. (2000) [106]

Tenascin-C wird ebenfalls nach einer stromalen Läsion bereits am ersten Tag exprimiert [109]. Im nicht verletzten Stroma ist es nicht nachweisbar [110]. Beim Menschen wird es zudem im Bereich des Limbus sezerniert [111]. Beim Kaninchen findet es sich physiologischerweise auch im Epithel [109]. Während der Ontogenese spielt Tenascin-C eine regulatorische Rolle bezüglich der Morphologie. Ferner ist es an Umbauprozessen von Geweben beteiligt und reguliert die Adhäsionseigenschaften von Zellen [112]. Seine genaue Funktion während der kornealen Wundheilung ist jedoch bislang nicht geklärt [113]. Die Synthese von Tenascin C kann durch Serum und TGF- $\beta$ 1 angeregt werden [114]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass auch veränderte biomechanische Beanspruchungen des Gewebes einen Einfluss auf seine Expression haben [115]. Neben der Neusynthese von provisorischer ECM werden in aktivierten Fibroblasten auch Enzyme synthetisiert, die die ECM abbauen. Dazu gehören die MMP wie beispielsweise Kollagenase (MMP-1), Stromelysin (MMP-3) und Gelatinase B (MMP-9) [116-122].

In dem sich regenerierenden Hornhautstroma kommt es durch Abbau und Neusynthese extrazellulärer Matrixbestandteile über Monate hinweg zu Umbauprozessen. Elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass während dieser Umbauprozesse die Größe der Kollagenfibrillen einheitlicher und ihre Anordnung regelmäßiger werden [123].

Seine ursprüngliche Festigkeit erlangt das Gewebe außerordentlich langsam zurück. Die Remodulierung eines entstandenen Narbengewebes durch eine „quasi-adulte“ ECM führt im Laufe von Jahren zur teilweisen Wiederherstellung der Resistenz und Transparenz des Gewebes [13].

### 1.1.5.3 Epitheliale-stromale Interaktionen

Die nach einer ausschließlich epithelialen Verletzung zu beobachtende Wundheilung scheint sich von der zu unterscheiden, die nach einer kombinierten epithelial-stromalen Verletzung auftritt. Einige Autoren vermuten daher, dass die Intaktheit der Basalmembran für die zu beobachtenden unterschiedlichen Reparaturmechanismen verantwortlich sein könnte [124]. Sie vermuten, dass eine Unterdrückung der epithelial-stromalen Interaktionen der Schlüssel dafür sein könnte, eine stromale Narbenbildung zu vermeiden [73].

Bei einer Schädigung des Epithels werden Zytokine freigesetzt, unter denen TGF- $\beta$ , Interleukin (IL)-1, Fas-Ligand und PDGF eine besondere Rolle zu spielen scheinen [13]. Die Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptoren der stromalen Keratozyten mag an folgenden Prozessen beteiligt sein, die im Sinne einer „epithelial-stromalen Interaktion“ verstanden werden können [13]:

- Apoptose von Keratozyten
- Expression von chemotaktisch wirksamen Zytokinen durch Keratozyten
- Transdifferenzierung von Keratozyten zu Myofibroblasten
- Umbau der ECM („stromales remodeling“)

Beispielhaft für eine epitheliale-stromale Interaktion sei das „*phenomenon of disappearing keratocytes*“ genannt, das auf eine Beobachtung von Dohlmann aus dem Jahr 1968 zurückgeht [13,125]. Er beschrieb den Untergang von Keratozyten in den vorderen und mittleren Schichten des Hornhautstromas unterhalb einer

mechanischen Epithelverletzung, für den es zunächst keine pathophysiologische Erklärung gab [85,126]. Im Jahr 1996 zeigte Wilson et al. durch Nachweis nuklearer Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Fragmentation, dass es sich dabei um apoptotische Prozesse handelt [127,128]. Ein ähnliches Phänomen, ist nach Verletzungen des Zentralnervensystems zu beobachten. Im Falle einer Verletzung von Astrozyten und Neuronen kommt es zu einem Anstieg der interstitiellen Kalium- und Glutamat-Konzentrationen. Dieser Anstieg induziert die Ausbreitung zytosolischer „Kalzium-Wellen“ die über gap-junctions auch benachbarte gesunde Astrozyten erreichen. Dieser Vorgang kann zum Zelltod primär unbeteiligter Zellen führen (*bystander effect*) [129,130]. Möglicherweise ist der zu beobachtende Verlust an Keratozyten auf einen ähnlichen Effekt zurückzuführen [131]. Bislang wird jedoch vor allem die These vertreten, das die Apoptose durch IL-1 und *tumor necrosis factor- $\alpha$*  ausgelöst wird, die von verletzten Epithelzellen freigesetzt werden [132,133].

Einen weiteren Hinweis auf epithelial-stromale Interaktionen finden sich bei Betrachtung des Wundheilungsverhaltens nach einer LASIK. Bei der Präparation des LASIK-Flaps (s. Kap. 1.2.2.) wird die Basalmembran kreisförmig durchtrennt. Nur in diesem Bereich kommt es zu einem Kontakt von Epithel und Stroma und auch nur in diesem Bereich konnten Myofibroblasten und eine vermehrte Expression von TGF- $\beta$  nachgewiesen werden [124].

#### **1.1.5.4 Endotheliale Wundheilung**

Das Korneaendothel ist die gegenüber mechanischen Beanspruchungen empfindlichste Zellschicht der Hornhaut [134]. Die Endothelzellen bilden eine einlagige Schicht terminal differenzierter Zellen mit fast vollständig fehlender Teilungsfähigkeit. Ihr Verlust kann nur durch eine Vergrößerung der Zellfläche und Migration von verbleibenden Zellen kompensiert werden [13]. Jeder Endothelzellverlust (degenerativ, entzündlich, traumatisch) führt zu einer Abnahme der Zelldichte. Die Grenze zur Dekompensation der endothelialen Funktion mit nachfolgendem irreversiblen Stromaödem liegt bei etwa 400 bis 700 Zellen/mm<sup>2</sup> [2].

Im Fall einer perforierenden Hornhautverletzung synthetisieren Endothelzellen eine neue Descemet-Membran, beginnend am 8. Tag nach Läsionierung [13].

#### 1.1.5.5 Regulation der Wundheilung durch Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind biologisch hochwirksame Zytokine, die eine Regulation von Genen induzieren können, die an der Differenzierung, Zellalterung, Migration und Proliferation von Zellen beteiligt sind. Wachstumsfaktoren entfalten ihre Wirkung am Ort der Synthese (auto- oder parakrine Sekretion) [13]. Ein einzelner Wachstumsfaktor kann dabei mehrere Funktionen im Rahmen unterschiedlicher Prozesse (z.B. Abbau oder Produktion extrazellulärer Matrix, Chemotaxis, Proliferation, Angiogenese, Induktion der Expression anderer Zytokine) übernehmen [135].

Die Wirkungsweise von Wachstumsfaktoren folgt einem einheitlichen Schema: Zunächst wird durch einen Stimulus, beispielsweise eine Läsionierung, die Synthese und Ausschüttung eines Wachstumsfaktors ausgelöst. Sodann wirkt der Wachstumsfaktor auf seine Zielzellen ein und löst in diesen eine spezifische Reaktion aus. In Folge von Rückkoppelungsmechanismen durch die Zielzellen kann die Produktion der Wachstumsfaktoren gefördert oder gehemmt werden. Durch einen spezifischen Reiz wird der Prozess dann beendet [136].

In der Hornhaut wirksame Wachstumsfaktoren können nach dem Ort ihrer eigenen Expression und dem ihrer korrespondierenden Rezeptoren (Tab. 5) in folgende vier Gruppen eingeteilt werden [137]:

**Typ I:** TGF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and PDGF-B werden ausschließlich von Epithelzellen exprimiert, während die zugehörigen Rezeptoren EGFR und IL-1R vorwiegend und PDGFR-beta ausschließlich von Fibroblasten exprimiert werden.

**Typ II:** *Insulin-like growth factor* (IGF-I), TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, *leukemia inhibitory factor* (LIF) und *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und ihre Rezeptoren werden sowohl vom Epithel als auch von Fibroblasten exprimiert. FGFR-1 und FGFR-2 werden dabei vorwiegend von Fibroblasten und bFGF vor allem von Epithelzellen exprimiert.

**Tabelle 5** Expression und Funktion von Wachstumsfaktoren in der Kornea.

	Zytokine	Fibroblasten	Epithelzellen	Funktion
<b>Typ I</b> Rezeptoren auf Fibroblasten	<b>TGF-<math>\alpha</math> / EGF</b>	<input type="checkbox"/> [137]	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ stimuliert Proliferation von Fibroblasten [138] und Epithelzellen [13]</li> <li>▪ inhibiert Apoptose von Fibroblasten [138]</li> <li>▪ beschleunigt die Reepithelisierung [13]</li> <li>▪ stimuliert die epitheliale Migration und die Synthese von Fibronektin [13]</li> </ul>
	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<input type="checkbox"/> [137] [139]	<input checked="" type="checkbox"/> [137] [139]	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ moduliert Apoptose von Keratozyten [128]</li> <li>▪ negative chemotaktische Effekte ggü. Keratozyten [140]</li> <li>▪ primärer Regulator der HGF und KGF Synthese durch Keratozyten [141]</li> <li>▪ induziert Expression von Kollagenasen und MMPs durch Keratozyten [118,119]</li> <li>▪ induziert Expression von IL-8 in Keratozyten und Epithelzellen [142,143]</li> </ul>
	<b>PDGF</b>	<input type="checkbox"/> [137]	<input checked="" type="checkbox"/> [137,140,144]	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ moduliert Proliferation und Chemotaxis von Fibroblasten [136,144]</li> <li>▪ fördert die Kontraktion der ECM [13]</li> </ul>
<b>Typ II</b> Rezeptoren auf Epithelzellen und Fibroblasten	<b>bFGF</b>	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ stimuliert Proliferation von Fibroblasten [138] und Epithelzellen [13]</li> <li>▪ beschleunigt die Reepithelisierung [13]</li> </ul>
	<b>IGF-1</b>	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fibroblasten-Proliferation [138]</li> <li>▪ inhibiert Apoptose von Fibroblasten [138]</li> </ul>
	<b>TGF-<math>\beta</math>1 / TGF-<math>\beta</math>2</b>	<input checked="" type="checkbox"/> [137,145]	<input checked="" type="checkbox"/> [137,145]	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Transdifferenzierung von Keratozyten zu Myofibroblasten [87,146,147]</li> <li>▪ stimuliert die Synthese der ECM [13]</li> <li>▪ inhibieren die epitheliale Proliferation [13]</li> <li>▪ inhibieren die Wirkung von EGF [13]</li> </ul>
<b>Typ III</b> Rezeptoren auf Epithelzellen	<b>KGF</b>	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	<input type="checkbox"/>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proliferation von Epithelzellen [148]</li> <li>▪ Inhibition der epithelialen Differenzierung [13]</li> </ul>
	<b>HGF</b>	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	<input type="checkbox"/>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proliferation von Fibroblasten [138]</li> </ul>
<b>Typ IV</b> Rezeptoren auf Immun-/ Entzündungs- zellen	<b>M-CSF</b>	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	<b>Legende:</b> <input checked="" type="checkbox"/> nachgewiesene Expression <input type="checkbox"/> keine Expression
	<b>IL-8</b>	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	<input checked="" type="checkbox"/> [137]	

**Typ III:** *Keratocyte growth factor* (KGF) und *hepatocyte growth factor* (HGF) werden ausschließlich von Fibroblasten exprimiert und ihre korrespondierenden Rezeptoren werden überwiegend von Epithelzellen exprimiert.

**Type IV:** *Macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) und IL-8 werden zwar von Fibroblasten bzw. Epithelzellen exprimiert, ihre Rezeptoren hingegen werden weder von Fibroblasten bzw. Epithelzellen exprimiert, sondern von Immunzellen oder Entzündungszellen.

Zwei Wachstumsfaktoren, IL-1 $\alpha$  und TGF- $\beta$ , scheinen im Rahmen der kornealen Wundheilung von besonderer Bedeutung zu sein. IL-1 $\alpha$  ist der stärkste Stimulus und TGF- $\beta$  ist der stärkste Inhibitor für die Expression von Kollagenasen, die vom Epithel synthetisiert werden [119]. Beide sind chemotaktische Lockstoffe für Fibroblasten und beide stimulieren die Proliferation von Fibroblasten. IL-1 spielt vor allem eine Rolle im Zusammenhang mit inflammatorischen und degenerativen Erkrankungen.

TGF- $\beta$  induziert die Proliferation [149] und Migration [150,151] von Keratozyten und führt zur Transdifferenzierung von Keratozyten zu Myofibroblasten [87,146,147,152-154]. Ferner ist eine der wichtigsten Funktionen von TGF- $\beta$  die Expression von Proteinen der ECM, einschließlich fibrillärer Kollagene und Fibronectin, während der Wundheilung zu regulieren [152]. TGF- $\beta$  unterdrückt ferner den Abbau der ECM durch Inhibition von Metalloproteinasen und Serin-Proteasen und durch Stimulation von Protease-Inhibitoren wie beispielsweise *tissue inhibitors of metalloproteinase* und *plasminogen activator inhibitor* [117]. Unter der Wirkung von TGF- $\beta$  kommt es zu einer Zunahme der Heparan- und Dermatansulfate und zu einer Abnahme der Keratansulfate sowohl in vitro als auch in vivo [146]. TGF- $\beta$  ist damit ein potenter anaboler Faktor, der die Bildung und Reparatur von Bindegewebe verstärkt und Narbenbildung induzieren kann [155].

Die in humanen Geweben vorkommenden Isoformen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 werden von drei unterschiedlichen Genen kodiert, die sich auf den Chromosomen 19q13, 1q41 und 14q24 befinden [155,156]. Sie werden zunächst als inaktive latente Form (*latent transforming growth factor*, LTGF- $\beta$ ) exprimiert.

LTGF- $\beta$  besteht aus drei Anteilen: einem Signal-Peptid, einem *latent associated peptid* und dem eigentlichen aktiven Anteil. Durch mehrschrittige proteolytische Dissoziation wird das aktive TGF- $\beta$  freigesetzt. Die Dissoziation kann durch Plasmin, Thrombin, Transglutaminasen oder Thrombospondin-1 initiiert werden [155,157]. Nach seiner Aktivierung kann TGF- $\beta$  sein Signal durch spezifische Serin/Threonin-Kinasen (T $\beta$ RI und T $\beta$ RII) vermitteln [155]. Nach Bindung werden die Rezeptoren mit dem gebundenen TGF- $\beta$  als Endosomen internalisiert. Die Signaltransduktion zum Nukleus, erfolgt über die zytoplasmatischen Proteine der Smad-Familie. Im Nukleus kommt es dann zur spezifischen Genexpression.

In immunhistochemischen Untersuchungen fanden einige Autoren TGF- $\beta$ 1 im Epithel [156,158-160], andere nicht [73,145]. In keiner Studie konnte TGF- $\beta$ 1 immunhistochemisch im Stroma nachgewiesen werden [145,158]. Die variierenden Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass nicht-spezifische Antikörper verwendet wurden, speziesspezifische Unterschiede bestehen oder die geringe Zelldichte im Stroma eine Detektion verhindern. Studien in denen die Boten-RNA (mRNA)-Expression von TGF- $\beta$ 1 untersucht wurde lieferten dessen Nachweis im Epithel, dem Stroma und dem Endothel der intakten Hornhaut [137,161,162]. Auch die latente Form von TGF- $\beta$ 2 kommt in allen drei Schichten vor [73,156]. Manche Autoren halten TGF- $\beta$ 2 für die in der Hornhaut [156] und im Kammerwasser [159] bedeutendste der drei Isoformen. TGF- $\beta$ 3 wurde bislang nicht im vorderen Augenabschnitt nachgewiesen [156,159]. Rezeptoren für TGF- $\beta$  werden sowohl auf Keratozyten als auch auf Epithelzellen exprimiert [137].

## 1.2 Refraktive Hornhautchirurgie

### 1.2.1 Entwicklung der refraktiven Hornhautchirurgie

Erste Berichte über korneale Inzisionen zur Korrektur von hohen Astigmatismen stammen aus dem Jahr 1885 [163]. Die meisten der frühen Versuche refraktiv-chirurgischer Eingriffe beschränkten sich auf den Einsatz kornealer Inzisionen zur Astigmatismusbehandlung [164]. Seit den 1930er Jahren wurde versucht, mittels

inzisionaler refraktiver Chirurgie auch die Myopie behandeln zu können. Der russische Ophthalmologe Fyodorov entwickelte die anteriore radiale Keratotomie und behandelte Tausende von Patienten mit dieser Methode [165]. Lamelläre refraktiv-chirurgische Verfahren wurden erstmals durch Barraquer eingeführt. Er berichtete Ende der 1950er Jahre erstmals von der Idee, Hornhautlamellen in tiefgefrorenem Zustand zu bearbeiten. Es sollte aber noch bis zum Beginn der 1970er Jahre dauern, Lentikel von der Hornhaut abzutrennen und nach der Bearbeitung auf einer Gefrier- Drehbank wieder aufzunähen [166,167]. Zum Durchbruch ablativer refraktiv-chirurgischer Verfahren kam es durch die Entwicklung der Excimer-Laser-Technologie. Die erfolgreichste und am weitesten verbreitete Technik zur Behandlung von Refraktionsfehlern ist seitdem die Abtragung von Hornhautgewebe mit dem Excimer-Laser. Excimer-Laser erzeugen elektromagnetische Strahlung im ultravioletten Wellenlängenbereich (193 nm). Als Lasermedium dient Argon-Fluorid (ArF). 1983 konnte Trokel zeigen, dass es möglich ist, mit dem Excimer-Laser Hornhautstroma abzutragen [168]. Erste Behandlungen an erblindeten Augen führten Seiler und L'Esperance durch [169,170]. McDonald operierte als Erster ein sehendes Auge mit dem Excimer-Laser [171]. Die von Barraquer entwickelten lamellären Operationstechniken und die Entwicklung der ersten Mikrokeratome waren die Grundlage für die Entwicklung der LASIK [166,172]. In den frühen 1990er Jahren beschrieben Pallikaris und Buratto unabhängig voneinander die Technik einer lamellierenden Keratektomie mit einer nachfolgenden stromalen Gewebeabtragung mit dem Excimer-Laser [173,174]. Pallikaris gab der Methode den Namen LASIK, einer heutzutage weit verbreiteten Technik der refraktiven Chirurgie.

### 1.2.2 Etablierte refraktiv-chirurgische Laser-Techniken

Für die effektive Behandlung von Refraktionsfehlern stehen heutzutage verschiedene lasergestützte Therapieverfahren zur Verfügung. Das breite Spektrum an Therapieoptionen ermöglicht es, ein für den individuellen Patienten geeignetes Verfahren auszuwählen. Die Verfahren, bei denen zur Fehlsichtigkeitskorrektur ein Excimer-Laser zur Anwendung kommt, gliedern sich in [175,176]:

- Verfahren zur Oberflächenbehandlung
  - Photorefraktive Keratektomie (PRK) [177-179]
  - Laser subepitheliale Keratomileusis (LASEK) [180]
  - Epi-LASIK [181]
- Lamelläre Behandlungsverfahren
  - Laser in situ Keratomileusis (LASIK) [182,183]

Bei allen genannten Verfahren wird mit dem Excimer-Laser Hornhautgewebe in der Weise abgetragen, dass die sphärischen und zylindrischen Anteile des bestehenden Refraktionsfehlers ausgeglichen werden [184]. Zur Korrektur der Myopie wird im Zentrum der Hornhaut ein zirkulärer Lentikel (Gewebestück) mit dem Excimer-Laser entfernt. Die Ablation zur Korrektur der Hyperopie erfolgt in der Hornhautperipherie, sodass die Krümmung der zentralen Hornhaut verstärkt und die Hornhautbrechkraft erhöht wird. Moderne asphärische und wellenfrontgeführte Ablationsprofile verringern die Induktion von Abbildungsfehlern höherer Ordnung des Auges [182,184]. Zur genaueren Anpassung des Ablationsprofils erfassen „*eye tracker*“ mit Iriserkennung neben horizontalen und vertikalen Augenbewegungen auch Zyklorotationsbewegungen des Auges [185]. Der „*eye tracker*“ stellt sicher, dass das Hornhautgewebe am vorgesehenen Ort abgetragen wird und eine Dezentrierung der Ablationszone vermieden wird [175].

Bei den Verfahren zur Oberflächenbehandlung erfolgt der Abtrag des Hornhautgewebes mit dem Excimer-Laser direkt unter dem Epithel. Das Hornhautepithel wird vorher entweder entfernt (bei der PRK) oder mit einer Alkohollösung (bei der LASEK) beziehungsweise einem Mikrokeratom (bei der Epi-LASIK) von der Unterlage abgelöst und nach der Behandlung wieder zurückgelegt. Der Erhalt des Epithelverbandes bei der LASEK bzw. Epi-LASIK soll die Wundheilung günstig beeinflussen und die Schmerzen des Patienten nach dem Eingriff reduzieren. Durch den nur im vorderen Anteil der Hornhaut erfolgenden Gewebeabtrag wird im Vergleich zu den lamellären Verfahren die Biomechanik der Hornhaut nur geringgradig geschwächt. Jedoch führt die

Verletzung des Epithels und der Bowman-Lamelle in einigen Fällen zu einer ausgeprägten Wundheilungsreaktion.

Die Kombination eines lamellierenden stromalen Hornhautschnittes mit einer Excimer-Laser-Ablation bezeichnet man als LASIK. Hierbei wird mit einem Mikrokeratom oder einem Femtosekunden (fs)-Laser eine dünne Hornhautlamelle (Flap) geschnitten und zur Seite geklappt. Im Unterschied zu den Oberflächenbehandlungen erfolgt der Laserabtrag dadurch in einer tieferen Schicht des Hornhautstromas. Bislang wurde für die Präparation des Flaps ein Mikrokeratom eingesetzt. Das Mikrokeratom ist ein mechanisch angetriebenes oszillierendes Messer, das mit Hilfe eines Saugringes fest auf dem Auge adaptiert werden kann. Die eingesetzten Mikrokeratome können oberflächenparall in einer Tiefe zwischen 100 bis 200  $\mu\text{m}$  schneiden. In jüngster Zeit wird zur Flap-Präparation auch der fs-Laser eingesetzt. Nach erfolgter Flappräparation und dem Gewebeabtrag mit dem Excimer-Laser wird das Wundbett gespült und die Lamelle an ihre ursprüngliche Stelle zurückgeklappt, wo sie infolge von Adhäsionskräften und dem Pumpeffekt des Endothels selbstständig an der Hornhaut anhaftet und innerhalb weniger Stunden anwächst [175].

Aufgrund der kontinuierlichen Weiterentwicklung der refraktiven Hornhautchirurgie ist ein Vergleich der eingesetzten Verfahren erschwert. In Bezug auf die Effektivität der Behandlung scheinen sich die Verfahren zur Oberflächenbehandlung und die LASIK jedoch kaum zu unterscheiden [186-188].

### 1.2.3 Wundheilungsstörungen nach refraktiver

#### Hornhautchirurgie

Die starke Verbreitung und die routinemäßige Anwendung refraktiv-chirurgischer Verfahren haben zu einem verstärkten Interesse an der Erforschung von Wundheilungsreaktionen der Hornhaut geführt [28]. Denn refraktiv-chirurgische Verfahren müssen so erfolgen, dass es nur zu einer minimalen Wundheilungsreaktion kommt und eine Narbenbildung der Hornhaut vermieden wird [73]. Zwei Aspekte sind von besonderer Wichtigkeit: der Erhalt der kornealen Transparenz und die Beeinflussung des Refraktionsergebnisses durch die

Wundheilungsreaktion [136]. Ernsthafte Komplikationen nach refraktiver Hornhautchirurgie sind zwar selten [189], dennoch kann eine überschießende Wundheilungsreaktion aufgrund der generell zu beobachtenden biologischen Diversität bei Wundheilungsreaktionen nicht ausgeschlossen werden. Da es sich um einen elektiv-chirurgischen Eingriff an gesunden Augen handelt, bedarf es einer besonderen Risiko-Nutzen-Abwägung.

Zu den postoperativen Komplikationen nach refraktiv-chirurgischen Eingriffen, die mit Wundheilungsstörungen assoziiert sind, gehören die diffuse lämelläre Keratitis [190-193], eine Dislokation des Flaps [194], Epitheleinwachsungen [195-198], infektiöse Keratitiden [199-201], sowie Eintrübungen und Narbenbildung der Hornhaut.

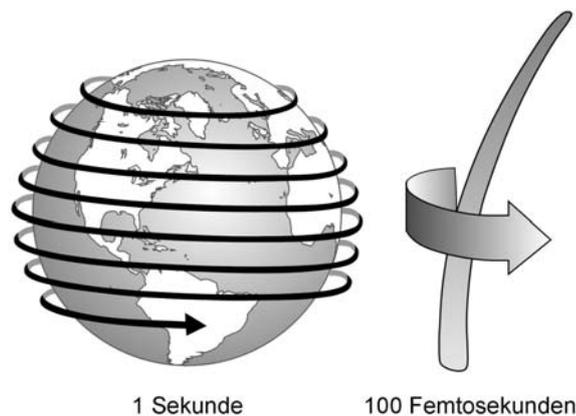
Eine postoperativ auftretende Narbenbildung ist häufiger bei Einsatz der Verfahren zur Oberflächenbehandlung zu beobachten. Dies gilt vor allem für die Behandlung hochgradiger Myopien, bei denen größere Gewebeanteile abladiert werden müssen. Eine feine retikuläre Trübung wird häufiger beobachtet. Sie hat jedoch in der Regel keinen Einfluss auf die Sehschärfe.

### 1.3 Femtosekunden-Laser

Femtosekunden-Laser sind fokussierbare Laser, die Lichtpulse aussenden, deren Pulsdauer im fs-Bereich liegt. Fs-Laser ermöglichen eine sehr präzise und schonende Abtragung biologischer Gewebe. Seit 2001 stehen in der Ophthalmologie fs-Laser für den klinischen Einsatz zur Verfügung, die eine Durchtrennung und Ablation von Hornhautgewebe ermöglichen [202]. Aufgrund der frei wählbaren und steuerbaren Focusebene des Lasers können Schnitte beliebiger Konfiguration erzeugt werden [203]. Der fs-Laser ist damit ein sehr vielseitig einsetzbares, präzises, minimal invasives Skalpel [204,205], mit dem Potential, etablierte Operationsmethoden zu ersetzen und neue Operationsverfahren zu ermöglichen.

### 1.3.1 Grundlagen der Femtosekunden-Laser-Technologie

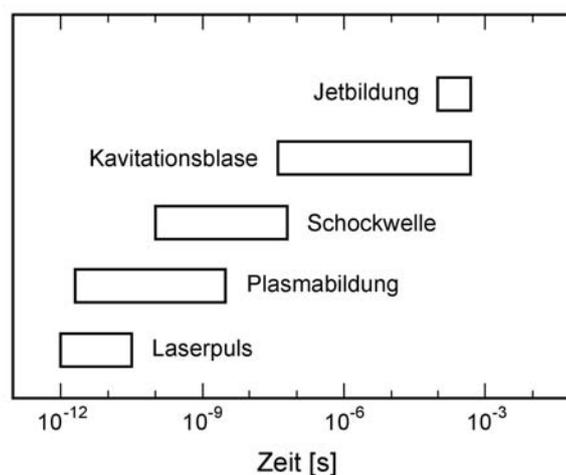
Die von fs-Lasern erzeugten Pulse werden als ultrakurz bezeichnet. Ultrakurze Pulse haben eine Dauer zwischen einer Pikosekunde ( $1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$ ) und einer Femtosekunde ( $1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$ ) und sind folglich nur einige milliardstel einer Millionstel-Sekunde lang.



**Abbildung 1** Die Dauer einer Femtosekunde (fs) kann an der Distanz illustriert werden, die Licht während der Pulsdauer eines fs-Lasers zurücklegt; Licht umrundet zwar in einer Sekunde die Erde etwa 7,5-mal, jedoch umrundet es ein menschliches Haar in 100 fs nur zur Hälfte [206].

Zur Veranschaulichung kann der Vergleich dienen, dass Licht zwar in einer Sekunde die Erde etwa 7,5-mal umrundet, es jedoch nicht schafft in 100 fs ein menschliches Haar komplett zu umrunden (Abb. 1) [206]. Der fs-Laser arbeitet im Infrarot-Wellenbereich ( $\lambda=1053 \text{ nm}$ ), so dass die Laserpulse das transparente Hornhautgewebe durchdringen können. Eine Wechselwirkung zwischen Laserpuls und Gewebe tritt nur im Fokus des Lasers auf. Zur Erzielung eines hohen Wirkungsgrades ist eine aberrationsminimierte Optik des Lasers notwendig [207]. Wenn im Fokus die pro Fläche eingestrahlte Energie eine bestimmte Schwelle (Leistungsdichte  $\geq 10^{11} \text{ W/cm}^2$ ) überschreitet, kommt es aufgrund des hohen Photonenflusses zu einer Photonenionisation von Atomen bzw. Molekülen. Dieser Vorgang wird als laser-induzierter optischer Durchbruch (*laser-induced optical breakdown*; LIOB) bezeichnet [208]. Bei diesem Vorgang entstehen freie

Elektronen, die eine Plasmabildung auslösen. Die Elektronen geben ihre Energie an andere Atome durch Stoßionisation ab. Die Atome werden dadurch ihrerseits ionisiert. Durch diesen Prozess kommt es zu einer rapiden Zunahme an freien Ladungsträgern. Das entstandene Plasma nimmt weitere Energie aus dem Strahlungsfeld auf, wodurch es zu einer Aufheizung des Plasmas kommt. Der Aggregatzustand Plasma wird für eine Dauer von ca. 10–20 ns beibehalten. In dieser kurzen Zeit kann keine thermische Diffusion auftreten, durch die das umliegende Gewebe geschädigt würde [209]. Die Aufheizung des Plasmas ist mit dessen schneller Expansion verbunden, die zur Ausbreitung einer Druckwelle führt. Diese Druckwelle besitzt eine sehr hohe Druckamplitude. Durch die mechanische Belastung des umgebenden Gewebes kann es zu dessen Zerstörung bzw. dessen Aufbruch kommen. Die Druckwelle ist daher für die Gewebeablation mitverantwortlich [209]. Nach der Expansion des Plasmas kommt es auch zu einer Expansion entstandener Gase und Dämpfe. Die Folge ist eine Ausbildung von Kavitationsblasen [209]. Die Kavitationsblasen enthalten Kohlenstoffdioxid, Kohlenstoffmonoxid, Wasserdampf, Sauerstoff und Stickstoff [210]. Der zeitliche Verlauf der beschriebenen Laser-Gewebe-Interaktionen während der Photodisruption ist in Abb. 2 dargestellt.

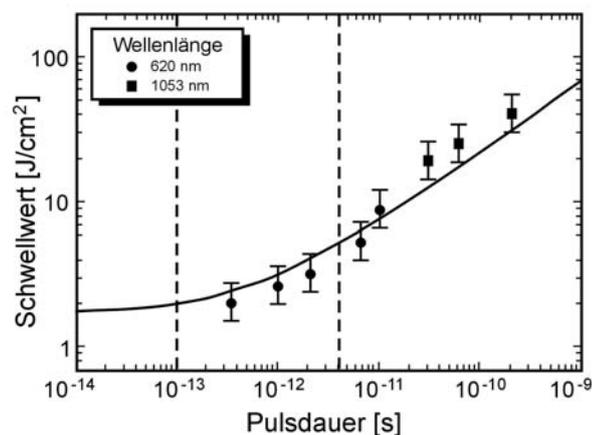


**Abbildung 2** Approximierter zeitlicher Verlauf der Laser-Gewebe-Interaktionen bei der Photodisruption (30 ps Laserpuls) [211].

Die Laserleistung ( $P$ ) ist der Quotient aus aufgewendeter Energie ( $\Delta E$ ) und der dazu benötigten Zeit ( $\Delta t$ ):

$$P = \frac{\Delta E}{\Delta t}$$

Durch Verkürzung der Pulsdauer wird folglich die Leistung des Lasers erhöht bzw. der optische Durchbruch (LIOB) bereits bei Verwendung sehr geringer Energien ermöglicht (Abb. 3) [212]. Durch die geringen Energien ist die Stoßwellenemission beim optischen Durchbruch deutlich schwächer als die bei längeren Laserpulsen. Damit nimmt auch die Größe der entstehenden Kavitationsblasen ab [213,214]. Schäden im umgebenden Gewebe (Kollateralschäden) treten dadurch nur in einem Randbereich von  $\leq 1 \mu\text{m}$  um die Abtragungsebene auf [215]. Die Anwendung von fs-Laserpulsen ist also überall dort interessant, wo eine lokale Materialbeeinflussung ohne Schädigung der Umgebung gewünscht ist [207]. In der Augenheilkunde wird der fs-Laser daher in der Hornhautchirurgie eingesetzt.



**Abbildung 3** Messung des Schwellwertenergieflusses für die plasmainduzierte Ablation als Funktion der Pulsdauer. Die Messungen wurden an menschlichen Hornhäuten bei 620 und 1053 nm Wellenlänge durchgeführt [209].

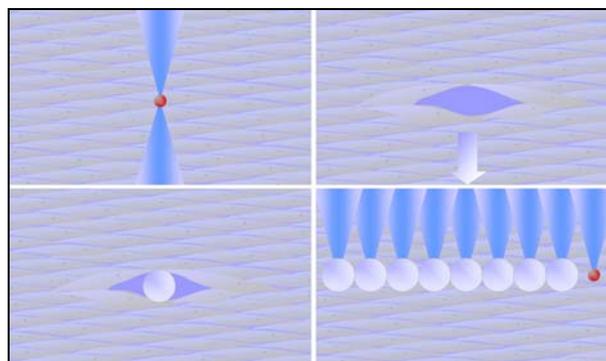
### 1.3.2 Einsatz des Femtosekunden-Lasers in der Hornhautchirurgie

Seit der Markteinführung des ersten fs-Lasers in der Augenheilkunde im Jahr 2001 hat sich sein Einsatzspektrum im Bereich der Hornhautchirurgie kontinuierlich

erweitert. Zunächst nur zur Flap-Präparation im Rahmen der LASIK-Operation verwendet, wird er nun bereits routinemäßig für die perforierende [216,217] und lamelläre Keratoplastik [218-222], die Implantation von kornealen Ringsegmenten [223,224] und für astigmatische Keratotomien [212,225,226] eingesetzt.

Bei allen operativen Verfahren dient der fs-Laser dabei als hochpräzises Schneidgerät. Die Durchtrennung des Gewebes wird dabei durch dicht nebeneinander angeordnete und dadurch konfluierende Blasen erreicht (Abb.4). Das entstandene Gas entweicht durch Diffusion aus dem Hornhautgewebe.

Die Ankoppelung des Lasers an die Hornhautoberfläche erfolgt dabei über ein Kontaktglas. Je nach Form des Kontaktglases wird die Hornhaut während der Laseranwendung applaniert oder weitgehend in seiner natürlichen Konvexität belassen. Die Laserpulse werden dann computergesteuert im gewünschten Muster in der Hornhaut appliziert. Die Steuereinheiten des Lasersystems ermöglichen das Anlegen verschiedenster Schnittgeometrien. Form, Tiefe und Winkel der Schnittebenen können frei gewählt werden [212]. Der Operateur kann individuell die Größe der Laserpulse und deren Abstand zueinander bestimmen und damit die Schnittqualität individuell optimieren [205]. In beschränktem Maße ist der fs-Laser auch bei getrübbten Hornhäuten und im Bereich der perilibalen Sklera einsetzbar, da die Strahlabschwächung für Infrarotstrahlung geringer ist als für sichtbares Licht [212].



**Abbildung 4** Laser-Gewebe-Wechselwirkung: Im Focus des fs-Lasers kommt es zur Plasmabildung, einem aus Ionen und Elektronen bestehenden Gases. Die damit verbundene explosionsartige Temperatur- und Druckerhöhung erzeugt Kavitationsblasen, die zur punktuellen Photodisruption führen. Das entstandene Gas entweicht durch Diffusion [Abbott Laboratories Inc.].

Folgende fs-Laser werden derzeit für den Einsatz in der Ophthalmochirurgie auf dem Markt angeboten [227]:

- IntraLase FS Laser, Abbott Medical Optics (AMO), Santa Ana, CA, USA
- FEMTEC, Technolas Perfect Vision, München, Deutschland
- Femto LDV, Ziemer, Port, Schweiz
- VisuMax, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Deutschland

Die angebotenen Lasersysteme unterscheiden sich hinsichtlich des Aufbaus der zur Ankoppelung an das Auge verwendeten Kontaktgläser (plan versus konkav), der Laserpulsfrequenz und der Anfälligkeit gegenüber Veränderung der Umgebungstemperatur [212,227].

### 1.3.3 Intrastromale refraktive Chirurgie mit ultrakurzen

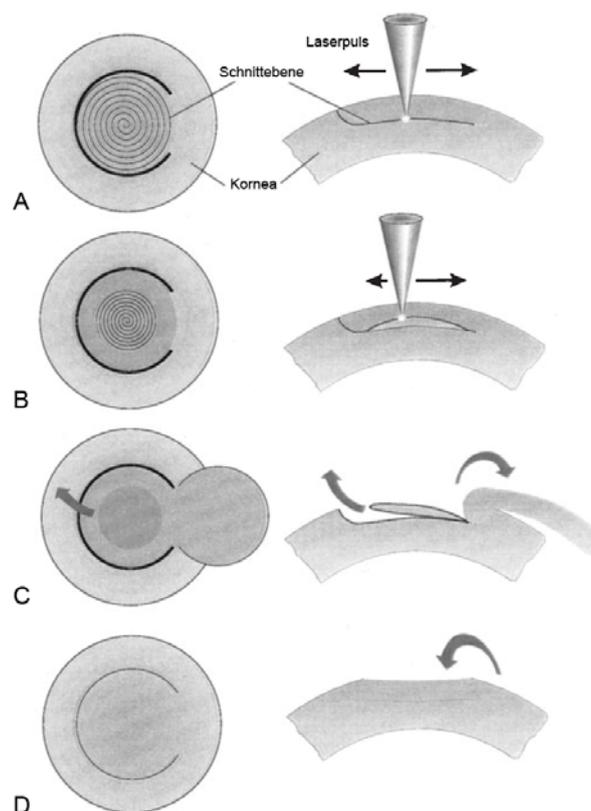
#### Laserpulsen

Da das Hornhautgewebe von der Laserstrahlung durchdrungen werden kann, bieten fs-Laser erstmals die Möglichkeit einer „*subsurface*“-Chirurgie. So ist es möglich, Schnitte im Hornhautstroma zu erzeugen, ohne die Oberfläche zu verletzen. Bei bislang etablierten refraktiv-chirurgischen Verfahren (LASIK, PRK) können durch die notwendige Verletzung der Augenoberfläche Komplikationen auftreten. Neben Schnittkomplikationen können Infektionen und Wundheilungsstörungen das Sehvermögen stark beeinträchtigen (Kap. 1.2.3). In der Hoffnung diese Komplikationen umgehen zu können, zielt die Weiterentwicklung von refraktiv-chirurgischen Operationstechniken darauf ab, die gewünschte Refraktionsänderung durch selektiven Abtrag des Hornhautstromas ohne Alteration des Epithels zu erreichen. Die intrastromale refraktive Chirurgie scheint das Potential zu besitzen, mit einer minimalen Wundheilungsreaktion, geringer Regression der Refraktions-ergebnisse, verbesserter Vorhersagbarkeit des Refraktionsergebnisses und einer reduzierten Infektionsrate einherzugehen.

Troutman et al. berichtete 1986 als erster über eine isolierte intrastromale Gewebeablation bei Verwendung eines modifizierten Excimer-Lasers [228]. Er konnte zeigen, dass eine intrastromale Laser-Gewebe-Wechselwirkung ex vivo ohne Schädigung des Epithels oder des Endothels möglich ist. In der Folge wurden

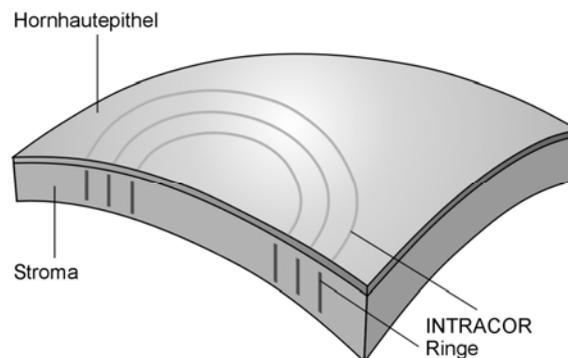
experimentell Pikosekunden (ps)-Laser zur intrastromalen Ablation verwendet [229]. Diese initialen Versuche einer intrastromalen Ablation waren jedoch aufgrund der unzureichenden Präzision der verwendeten Pikosekunden-Laser nicht erfolgreich.

Mit Einführung des fs-Lasers wurde die Idee der intrastromalen Gewebeablation wieder aufgegriffen. Es konnte gezeigt werden, dass der fs-Laser im Vergleich zu ps-Lasern eine deutlich geringere Schädigung des umgebenden Gewebes bewirkt [215]. Erste inkonsistente Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass durch eine intrastromale Gewebeablation eine Abnahme der Hornhautdicke erreicht werden kann [230].



**Abbildung 5** Prinzip der fs-Laser-assistierten Lentikel-Extraktion: (A) Anlegen eines lamellären intrastromalen Schnittes. (B) Präparation des Lentikels durch Anlegen eines zweiten Schnittes. Die Lentikelgröße wird entsprechend dem vorliegenden Refraktionsfehler gewählt. (C) Mechanisches Anheben der vorderen Hornhautlamelle und Extraktion des Lentikels. (D) Reposition der vorderen Hornhautlamelle. Aufgrund des Volumendefizites kommt es zur Abflachung der Hornhautvorderfläche [215] (mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags).

Bislang wurde nur an 13 amblyopen (schwachsichtigen) Augen eine intrastromale Ablation mit dem fs-Laser durchgeführt. Dabei konnten Refraktionsänderungen um bis zu 2 dpt erreicht werden [231]. Neben dem Versuch Gewebe mit dem fs-Laser intrastromal abzutragen, wird auch der Ansatz verfolgt mit dem fs-Laser einen stromalen Lentikel zu schneiden, der dann manuell aus dem Stroma extrahiert wird (Abb. 5). Die ersten klinischen Ergebnisse zeigen, dass auch auf diesem Weg eine Myopiebehandlung möglich ist [232]. Der jüngste Ansatz Refraktionsänderungen durch intrastromale refraktive Chirurgie zu erreichen, ist die INTRACOR-Behandlung. Das INTRACOR-Verfahren soll bei Patienten mit Altersweitsichtigkeit (Presbyopie) die Lesefähigkeit wieder herstellen. Zu diesem Zweck werden einseitig auf dem nicht-dominanten Auge Laserherde in ringförmiger Anordnung intrastromal appliziert (Abb. 6).



**Abbildung 6** Bei der INTRACOR-Behandlung werden Laserpulse in ringförmiger Anordnung intrastromal appliziert, ohne die Oberfläche der Hornhaut zu verletzen. Durch eine Zunahme der zentralen Krümmung soll die Behandlung zu einer multifokalen Optik führen.

Bei weitgehend erhaltenem Fernvisus erreichen die Patienten dabei einen Anstieg des unkorrigierten Nahvisus. Neben einer Zunahme der zentralen Krümmung soll die Behandlung zu einer multifokalen Optik führen [233,234]. Bislang ist jedoch nicht ausreichend geklärt auf welchen Mechanismen diese Presbyopiebehandlung beruht und ob die Behandlungsergebnisse stabil sind.

## 2 ZIELSTELLUNG

Bei bislang etablierten refraktiv-chirurgischen Verfahren (LASIK, PRK) können durch die notwendige Verletzung der Augenoberfläche Komplikationen auftreten. Neben Schnittkomplikationen durch die verwendeten mechanischen Schneidgeräte (Mikrokeratome) können Infektionen und Wundheilungsstörungen das Sehvermögen stark beeinträchtigen. Operative Verfahren bei denen die gewünschte Refraktionsänderung durch einen selektiv intrastromalen Gewebeabtrag erfolgt, erscheinen besonders attraktiv, da sie möglicherweise mit einer minimalen Wundheilungsreaktion und einem geringen postoperativen Infektionsrisiko einhergehen [235,236].

In der vorliegenden Studie wurde daher die fs-Laser-Technologie verwendet, um die korneale Wundheilung nach intrastromaler Gewebeablation zu untersuchen. Dazu wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich bei einer ausbleibenden Verletzung des Epithels nur eine primitive stromale Narbe ausbildet [237]. Dem Modell einer isolierten intrastromalen Verletzung (fs-Keratotomie) wurde das Modell einer kombinierten epithelial-stromalen Verletzung (PRK) zum Vergleich gegenübergestellt. Beim Vergleich der Wundheilungsprozesse wurde besonderes Augenmerk auf die unterschiedlichen Phänotypen stromaler Zellen, ihre Aktivierung und Proliferation, sowie deren Zelluntergang gelegt. Der Nachweis einer Differenzierung von ruhenden Keratozyten (Fibrozyten) in aktivierte Phänotypen [11,238,239] erfolgte durch Nachweis von Stressfasern, Fibroblasten-Markern (Thy-1) [240,241] und Myofibroblasten-Markern ( $\alpha$ -SMA) [86,242]. Aufgrund der Annahme, dass eine Epithelverletzung zu einer vermehrten Expression des profibrotischen Zytokins TGF- $\beta$ 1 führt, wohingegen eine selektive intrastromale Verletzung keine solche Induktion hervorruft, wurde die TGF- $\beta$ 1-mRNA- und Protein-Expression nach fs-Keratotomie mit der nach PRK verglichen. In früheren klinisch-experimentellen Studien fanden sich erste Hinweise, dass der erwünschte Effekt eines Gewebeabtrags durch intrastromale Photodisruption bei Verwendung von ps- oder fs-Lasern erreicht werden kann [229-231]. Aufgrund

kontroverser Ergebnisse bislang durchgeführter Studien bezüglich dieser Fragestellung [230,243,244], wurde im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit unter Einsatz modernster fs-Laser-Technologie erneut untersucht, ob mittels intrastromaler Photodisruption ein intrastromaler Gewebeabtrag (fs-Laser Keratektomie) sicher möglich ist.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer. Alle chirurgischen Maßnahmen wurden an Kaninchen mit einem Körpergewicht von 3 bis 4 kg vorgenommen. Diese Tiere stammten von Harlan Winkelmann (Borchen) und wurden unter Standard-Laborbedingungen untergebracht. Für die Versuche zur intrastromalen Keratektomie wurden auch ausgewachsene Tiere mit einem Gewicht von 5 kg verwendet. Diese stammten aus der Tierzucht Wenzel (Detmold). Die Behandlung der Kaninchen erfolgte unter Anästhesie mit Xylazin (5 mg/kg i.m., Rompun, Bayer, Leverkusen) und Ketamin (50 mg/kg i.m., Ketavet, Pharmacia, Erlangen). Zusätzlich wurden unkonservierte Oxybuprocain Augentropfen (Benoxinat SE 0,4%, Alcon Pharma, Freiburg) unmittelbar vor dem Eingriff appliziert. Tiere bei denen eine PRK durchgeführt wurde erhielten Buprenorphin 0,05 mg/kg s.c. nach der Operation. Das Einschlafen der Tiere erfolgte am jeweils letzten Tag der Nachbeobachtung und wurde in Narkose durch intrakardiale Injektion von 5 ml Embutramid 0,2 g/ml, Mebezonium 0,05 g/ml und Tetracain 0,005 g/ml, (T61, Intervet, Unterschleißheim) vorgenommen. Im Anschluss daran wurden alle operierten und nicht operierten Augen enukleiert. Alle Tiere wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und den Richtlinien der Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) zum Gebrauch von Versuchstieren in der ophthalmologischen Forschung behandelt.

### 3.2 Chirurgische Eingriffe

#### 3.2.1 Femtosekunden- und Excimer-Laser

Der eingesetzte fs-Laser FEMTEC (20/10 Perfect Vision, Heidelberg) ist ein gepulster Festkörperlaser (Nd:Glas) mit einer Repetitionsrate von 10 kHz der Licht

einer Wellenlänge von 1059 nm emittiert (Abb. 7). Die Pulsdauer beträgt 600 bis 800 fs. Die Ankoppelung der Kaninchenaugen an den Laser erfolgte über ein konkav geformtes Kontaktglas mit einem Krümmungsradius von 10,5 mm (20/10 Perfect Vision). Das Kontaktglas wurde über der Pupille zentriert aufgesetzt. Durch Verwendung eines speziell für das Kaninchenauge entwickelten Saugrings konnte eine genaue Positionierung des Kontaktglases und eine Ruhigstellung des Auges bewirkt werden.



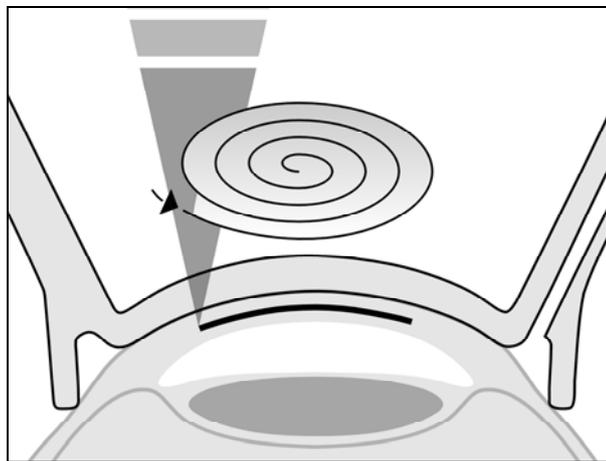
**Abbildung 7** Fs-Laser FEMTEC (20/10 Perfect Vision, Heidelberg)

Als Excimer-Laser kam der VISX Star S3 (VISX, Santa Clara, CA, USA) zum Einsatz. Dabei handelt es sich um einen Gas-Laser (ArF), der Laserpulse einer Wellenlänge von 193 nm und einer Pulsdauer von 20 ns generiert. Die Repetitionsrate beträgt 10 kHz, die Fluenz  $160 \text{ mJ/cm}^2$ .

### 3.2.2 Intrastromale Keratotomie

Präoperativ wurde die Hornhautdicke durch Ultraschall-Pachymetrie (SP 100, Tomey, Erlangen) bestimmt. Ein lamelläre Schnitt (Keratotomie) wurde bei 12 Kaninchen in einer Tiefe von 160-200  $\mu\text{m}$  (50% der Hornhautdicke) mit dem FEMTEC -Laser angelegt (Abb. 8). Für die Keratotomie wurden eine Pulsenergie von 2,8  $\mu\text{J}$ , eine Laserspotgröße von 5  $\mu\text{m}$  und ein Abstand zwischen den einzelnen

Laserspots von 8  $\mu\text{m}$  gewählt. Die Kaninchen erhielten eine einseitige Behandlung. Die behandelte Seite wurde nach dem Zufallsprinzip gewählt. Das jeweils kontralaterale Auge diente als Kontrolle. Der Durchmesser der scheibenförmigen Keratotomie betrug 6,5 mm. Nach der Laser-Anwendung wurde Dexpanthenol Augensalbe (Bepanthen, Roche, Grenzach-Wyhlen) in die untere Bindehautumschlagfalte gegeben. Postoperative Nachbeobachtungszeiten betragen 1, 3, 7 und 28 Tage.

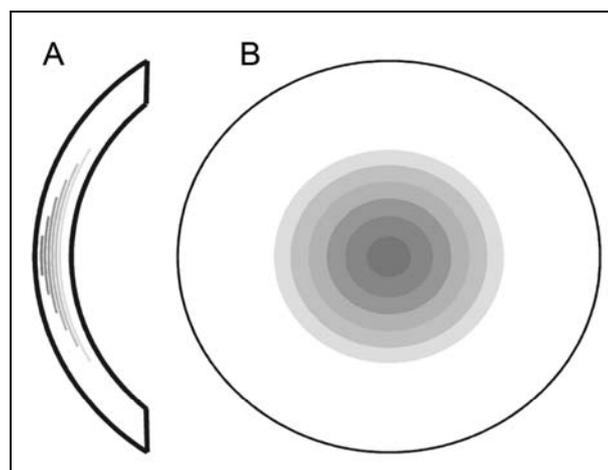


**Abbildung 8** Die intrastromale Keratotomie erfolgte durch zirkuläre Applikation von Laserpulsen parallel zur Hornhautvorderfläche; die Oberfläche eines konkav gekrümmten Kontaktglases diente als Referenz für die Bestimmung der Schnittebene.

### 3.2.3 Intrastromale Keratektomie

Die intrastromale Keratektomie wurde an zwei Versuchstiergruppen durchgeführt. In Gruppe 1 wurde an ausgewachsenen Kaninchen eine beidseitige Behandlung durchgeführt. Die Kontrolluntersuchungen fanden 9, 31 und 86 Tage nach dem Eingriff statt. In Gruppe 2 wurden noch im Wachstum befindliche Tiere einseitig behandelt. Die Seitenwahl wurde nach dem Zufallsprinzip getroffen. Das jeweils unbehandelte Auge diente als Kontrolle. Die Kontrolluntersuchungen fanden 12, 29, 69, 176 und 318 Tage nach dem Eingriff statt. Präoperativ wurde die Hornhautdicke durch Ultraschall-Pachymetrie (SP 100, Tomey) bestimmt. Das

Muster der intrastromalen Ablation bestand aus 14 parallel übereinanderliegenden kreisförmigen Scheiben (Abb. 9). Der Abstand zwischen der Hornhaurückfläche und der am tiefsten gelegenen Ablationsebene betrug  $146\pm 47\ \mu\text{m}$  (Gruppe 1) bzw.  $108\pm 10\ \mu\text{m}$  (Gruppe 2) und hatte einen Durchmesser von 4 mm. Die oberflächlichste Ablationsebene hatte einen Durchmesser von 2 mm. Der Abstand zwischen den einzelnen Ablationsebenen betrug  $8\ \mu\text{m}$ . Bei der Keratektomie wurden Laserpulsenergien von  $1,3\ \mu\text{J}$ , eine Laserspotgröße von  $5\ \mu\text{m}$  und ein Abstand zwischen den Laserspots von  $9\ \mu\text{m}$  gewählt. Nach der Laser-Anwendung wurde Dexpanthenol Augensalbe (Bepanthen, Roche) in die untere Bindehautumschlagfalte gegeben.

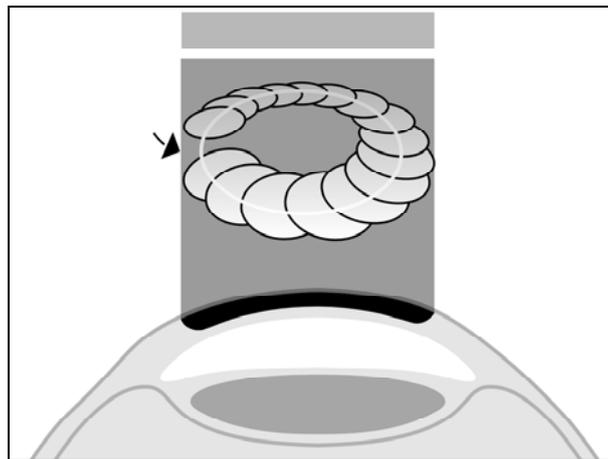


**Abbildung 9** Schematische Darstellung des Musters der Laserapplikation bei der intrastromalen Keratektomie; (A) Sagittalschnitt, (B) Frontalschnitt; das Muster bestand aus 14 intrastromalen horizontal gelegenen scheibenförmigen Schichten, die parallel zueinander liegen. Der Abstand zwischen Hornhaurückfläche und der tiefsten Schnittebene betrug  $146\pm 47\ \mu\text{m}$  (Gruppe 1) bzw.  $108\pm 10\ \mu\text{m}$  (Gruppe 2) und hatte einen Durchmesser von 4 mm. Die am oberflächlichsten gelegene Schicht besaß einen Durchmesser von 2 mm. Der Abstand zwischen zwei Schichten betrug  $8\ \mu\text{m}$ .

### 3.2.4 Photorefraktive Keratektomie

Nach Einsetzen eines Lidserrers erfolgte eine transepitheliale Laserablation mit dem Excimer-Laser (VISX Star S3, Santa Clara, CA, USA). Die präoperativ festgelegte Ablationstiefe betrug  $150\ \mu\text{m}$  bei einem Durchmesser der optischen

Zone von 6,0 mm (Abb. 10). Nach dem Lasereingriff wurde Ofloxacin Augensalbe (Floaxal, Alcon Pharma) appliziert. Kontrolluntersuchungen fanden am 1., 3., 7. und 28. postoperativen Tag statt.



**Abbildung 10** Die Photorefraktive Keratektomie wurde transepithelial mittels eines „flying spot“ Excimer-Lasers durchgeführt.

### 3.3 Klinische Untersuchungstechniken

#### 3.3.1 Spaltlampenuntersuchung

Spaltlampen-Fotografien wurden mit einer an eine Spaltlampe (Model 100/16; Carl Zeiss, Oberkochen) adaptierte Digitalkamera (PowerShot G6, Canon, Tokyo, Japan) aufgenommen. Zu jedem Zeitpunkt der Nachuntersuchung (s.o.) wurden Aufnahmen sowohl mit diffuser als auch fokaler Beleuchtung durchgeführt.

#### 3.3.2 Konfokale in vivo Mikroskopie

Nach intrastromaler Keratotomie und PRK wurden Aufnahmen mit einem konfokalen Weißlicht-Mikroskop (Confoscan 4, NIDEK, Gamagori, Japan) gemacht. Das Mikroskop ist mit einem 40x Immersionsobjektiv (Achromplan, Carl Zeiss) ausgestattet. Der Bildausschnitt hat eine Größe von 460x345  $\mu\text{m}$ . Als Immersionsmedium wurde ein Carbomer-Gel (Vidisic, Mann Pharma, Berlin)

verwendet. Die Untersuchung erfolgte immer im zentralen Bereich der Hornhaut. Um sicherzustellen, dass die Ausrichtung parallel zur Hornhautoberfläche erfolgt wurde zunächst das Endothel dargestellt. Anschließend wurden drei Bildsequenzen in posterior-anteriorer Richtung aufgenommen.

### 3.3.3 Pachymetrie

Die Hornhautdicke wurde mit einem Ultraschall-Pachymeter (SP-100, TOMEY) gemessen. Bei jeder Untersuchung wurden acht Einzelmessungen durchgeführt. Eine Hornhautpachymetrie wurde vor Durchführung der intrastromalen Keratotomie und Keratektomie vorgenommen. Ferner erfolgte die Pachymetrie nach intrastromaler Keratektomie zu allen Nachbeobachtungszeitpunkten.

### 3.3.4 Keratometrie

Die Krümmungsradien der Hornhaut wurden mit einem handgehaltenen Keratometer (KM 500, NIDEK) bestimmt. Bei jeder Untersuchung wurden sechs Einzelmessungen durchgeführt. Die Keratometrie erfolgte vor der intrastromalen Keratektomie sowie postoperativ zu den angegebenen Nachbeobachtungszeitpunkten.

### 3.3.5 Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie (SL-OCT, Heidelberg Engineering, Heidelberg) wurde unmittelbar nach der intrastromalen Keratektomie eingesetzt. Sie diente der morphologischen Darstellung des intrastromalen Schnittmusters.

## 3.4 Laboruntersuchungen

### 3.4.1 Fixierung und Herstellung von Gewebeschnitten

Für die histologische Untersuchung wurden die enukleierten Bulbi in flüssiges Gefriermedium (Tissue Freezing Medium, Leica Microsystems, Nussloch)

eingebettet und in 2-Methyl-Butan bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung des Gewebes bis zur histologischen Aufbereitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Im Kryostaten (Leica CM 3050S, Leica Microsystems) wurden serielle Sagittalschnitte ( $14\ \mu\text{m}$  dick) angefertigt. Für die Licht- und Fluoreszenzmikroskopie wurden die Gefrierschnitte auf Glas-Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel, Braunschweig) aufgebracht und luftgetrocknet. Die Gefrierschnitte für die Laser-Mikrodissektion (LMD) wurden hingegen auf autoklavierte Polyethylenterephthalat- (PET) Objektträger (Leica Microsystems) aufgezogen, in gekühltem Aceton ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) für 3 Minuten fixiert, bei  $40^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten getrocknet und histochemisch gefärbt.

### 3.4.2 Histochemie und Lichtmikroskopie

Die Gefrierschnitte für die LMD wurden mit Toluidinblau 1% (Merck, Darmstadt) gefärbt. Toluidinblau wurde zuvor in Ribonuklease-freiem Wasser gelöst, das zu diesem Zweck mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt worden war. Der gelöste, mit einem  $0,22\ \mu\text{m}$  Millex<sup>TM</sup> GP Filter filtrierte Farbstoff wurde auf die Gefrierschnitte für 3 Minuten bei Raumtemperatur aufgebracht und mit DEPC-Wasser abgespült. Nach der Differenzierung der Schnitte in 75% Ethanol (DEPC-Wasser) für 3 Minuten wurden die Schnitte bei  $40^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten getrocknet und direkt mittels LMD weiterbearbeitet.

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die Gefrierschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) entsprechend eines Routineprotokolls gefärbt. Es erfolgte eine fotografische Dokumentation der lichtmikroskopischen Befunde. (Mikroskop IX50, Olympus, Tokyo, Japan; SPOT RT, digitale Farbbild-Kamera, Diagnostic Instruments, MI, USA).

### 3.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Gefrierschnitte wurden mit dem primären Antikörper in einer feuchten Kammer über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Folgende Antikörper und Verdünnungen wurden benutzt:

- Mouse Anti-Human cellular EDA Fibronectin (EDA-Fn, Klon DH1, 1:400, Biohit, Helsinki, Finland)
- Mouse Anti-Human Tenascin-Cytotactin (TN-C, Klon EB2, 1:200, Biohit)
- Mouse Anti-Human  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA, Klon 1A4, 1:50, DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
- Mouse Anti-Human Ki-67 (Klon 7B11, vorverdünnt, Zymed, San Francisco, CA, USA)
- Goat Anti-Human Thy-1 (CDw90, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- Mouse Anti-Human Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1, Klon 9016, 1:50, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Eine Alexa Fluor 488-konjugierte Phalloidin-Sonde (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) wurde verwendet, um filamentöses Aktin zu detektieren. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alexa 488 Donkey Anti-Mouse, Alexa 568 Donkey Anti-Goat, Alexa 568 Goat Anti-Mouse, 1:1000, Molecular Probes) erfolgte für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Für die Gegenfärbung zur Darstellung der Zellkerne diente Hoechst 33258 (1  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich, München). Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Fluorescent Mounting Medium (Dako, Hamburg) eingedeckelt. Um die Spezifität der Antikörper zu verifizieren, wurden separate Färbungen mit und ohne primären oder sekundären Antikörper durchgeführt.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde das inverse Mikroskop IX50 (Olympus) verwendet, das für die Befunddokumentation mit einer digitalen Farbkamera (SPOT RT Colour Digital Camera, Diagnostic Instruments) ausgestattet wurde. Die Bilder wurden mit einer kommerziell erhältlichen Graphik-Software (Adobe Photoshop CS 8.0.1) in Bezug auf Kontrast, Helligkeit und Schärfe digital nachbearbeitet. Die einzelnen Fluoreszenzbilder eines Schnittes wurden digital überlagert.

#### 3.4.4 TUNEL-Assay

Die Detektion von DNA-Fragmenten zum Nachweis von Apoptose erfolgte mit einem TUNEL Assay (ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit S7165, Chemicon, Temecula, CA, USA), der nach Herstellerangaben verwendet wurde.

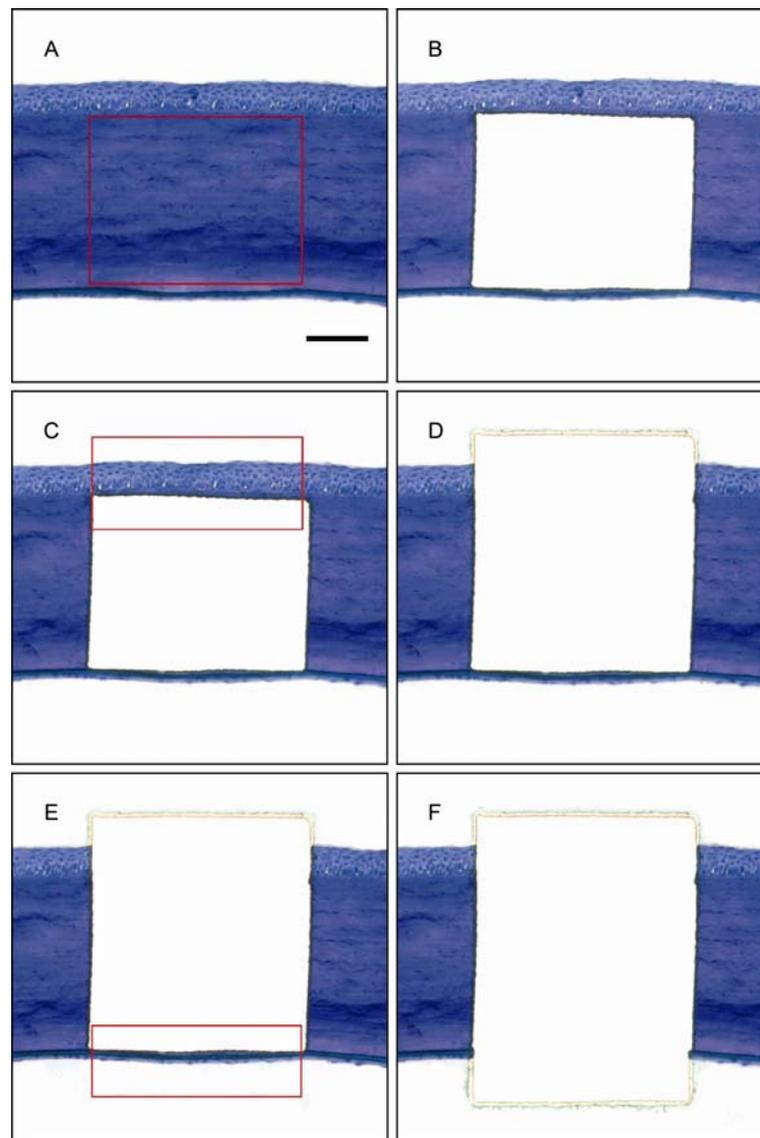
#### 3.4.5 Laser-Mikrodissektion, RNA-Isolierung und Transkription

Die gefärbten und auf PET-Folie aufgebrachten Gefrierschnitte wurden auf dem Objektisch des Leica AS LMD Systems (Leica Microsystems) befestigt. Nach Einstellung der Laserintensität und -apertur sowie der Geschwindigkeit des Schneidevorgangs wurde der gepulste UV-Laserstrahl entlang der Grenzen des zentralen (5 mm) Stromas, Epithels und Endothels geführt (Abb. 11). Mit Hilfe der LMD wurde Material aus jeder der drei Zellschichten für jeden der Untersuchungszeitpunkte aus jeweils drei Gefrierschnitten gewonnen. Sechs unbehandelte Hornhäute dienten als Kontrollgruppe.

Das ausgeschnittene Zellareal wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, das Guanidiniumthiocyanat-haltige Pufferlösung (Buffer RLT, RNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden) zur Zell-Lyse enthielt. Die erfolgreiche Überführung des Gewebes in das Röhrchen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Die Zentrifugenröhrchen wurden dann unmittelbar auf Eis gelagert und dreimal in einem Eis- / Ethanol-Bad eingefroren und wieder aufgetaut. Die gesamte RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben einschließlich einer DNase Behandlung isoliert. Im Anschluss daran wurde die RNA unter Verwendung von TaqMan Reverse-Transkription-Reagentien (Applied Biosystems, Darmstadt) transkribiert.

#### 3.4.6 Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die gewonnene *complementary DNA* (cDNA) wurde mittels PCR unter Einsatz des Abi Prism 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) und dem TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) vervielfältigt.



**Abbildung 11** Lichtmikroskopie (Toluidinblau) und selektive Laser-Mikrodissektion der drei Hornhautschichten: (A, B) Hornhautstroma, (C, D) Epithel und (E, F) Endothel. Die roten Rechtecke markieren die vorgegebene Schnittführung des UV-Lasers. Maßstabsbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

TGF- $\beta$ 1-Primer und -Sonden wurden mit Hilfe der Primer-Express-Software (Applied Biosystems) designt. Die Normalisierung der *cycle-threshold* (Ct)-Werte erfolgte gegenüber einer endogenen Kontrolle, der eukaryoten 18S ribosomalen RNA. Zur Detektion wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Primer und Sonden genutzt. Die Sonden wurden mit 6-Carboxyfluoreszein (FAM) am 3'-Ende und mit

6-Carbox-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) am 5'-Ende markiert. Für die Amplifikation wurde ein Standard-Amplifikationsprogramm gewählt (1 Zyklus bei 50°C für 2 Minuten, 1 Zyklus bei 95°C für 10 Minuten, 45 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und bei 60°C für 1 Minute).

**Tabelle 6** qPCR-Assay für die Detektion von TGF- $\beta$ 1.

Target	Bezeichnung	Primer- und Sonden-Sequenzen (5'→3')	Größe des Amplikons
TGF- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 1F	AAGGGCTACCACGCCAACTT	102 Basenpaare
	TGF- $\beta$ 1R	CGGGTTGTGCTGGTTGTACA	
	TGF- $\beta$ 1 Probe	TGCCCTACATCTGGAGCCTGGAC	
18S rRNA	18SF	CGGCTACCACATCCAAGGAA	181 Basenpaare
	18SR	GCTGGAATTACCGCGGCT	
	18S Probe	TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC	

### 3.5 Statistik

Eine Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte für:

- (1) die Änderung der Expression von TGF- $\beta$ 1-mRNA in der Hornhaut nach intrastromaler Keratotomie und PRK
- (2) die Änderung der Hornhautdicke und  $\kappa$ -radien nach intrastromaler Keratektomie.

(1) Die relative Quantifizierung der cDNA wurde mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode vorgenommen, wohingegen die  $2^{-\Delta C_t}$  Methode verwendet wurde, um die TGF- $\beta$ 1-mRNA-Level im Stroma und im Endothel mit denen im Epithel zu vergleichen [245]. Alle Quantifizierungen wurden in Bezug auf die endogene Kontrolle (18S rRNA) normalisiert, um der Variabilität der initialen Konzentration und Qualität der RNA und der Effektivität der reversen Transkription Rechnung zu tragen. Die  $\Delta C_t$ -Daten wurden für die statistische Auswertung verwendet [246]. Aufgrund der Größe der Stichprobe und der Annahme einer nicht homogenen Verteilung wurde

der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test für den Gruppenvergleich verwendet.

(2) Student's T-Test für gepaarte Stichproben wurde verwendet, um die präoperativen Werte von Hornhautdicke und -radien mit den postoperativen Werten der Gruppe 1 (86. Tag), als auch die unterschiedlichen Hornhautdicken und -radien von behandelten und unbehandelten Hornhäuten der Gruppe 2 (176. Tag und 318. Tag) zu vergleichen. Für jede der Nullhypothesen wurde die Voraussetzung für die Anwendung des T-Testes (Gauß-Verteilung) überprüft. Daneben wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Unter Berücksichtigung der geringen Fallzahl wurde keine alpha-Korrektur vorgenommen.

Für die statistische Analyse wurde SPSS für Windows (SPSS, Version 15.0, München) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Korneale Wundheilung nach intrastromaler Keratotomie

#### 4.1.1 Transparenz der Hornhaut bleibt erhalten

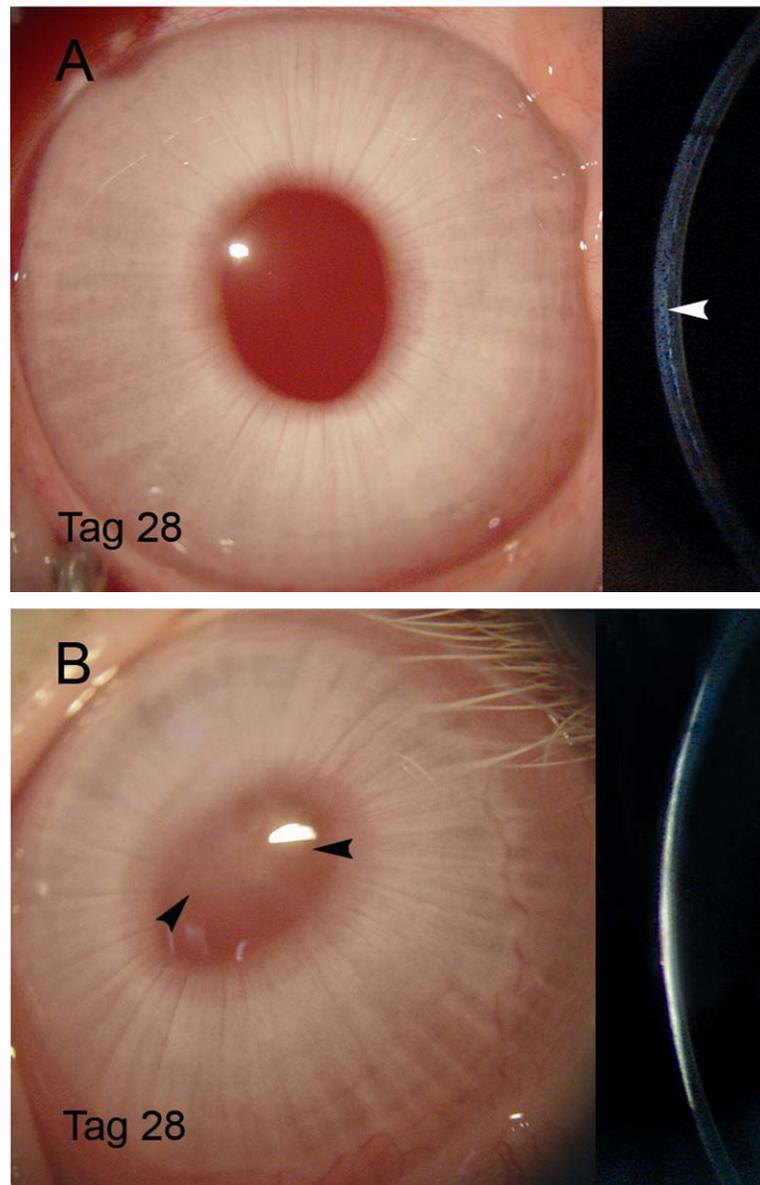
Alle Hornhäute wiesen vor Durchführung der intrastromalen fs-Keratotomie bzw. der PRK bei der Spaltlampenuntersuchung eine regelrechte Morphologie auf. Auch einen Tag nach der intrastromalen fs-Keratotomie zeigte sich die Hornhaut bei diffuser Beleuchtung weiterhin transparent. Im Bereich der Keratotomie-Zone fand sich jedoch im optischen Schnitt eine feine strichförmige Hyper-Reflektivität. Die Reflektivität erschien dabei in ihrer Intensität vergleichbar mit der der epithelialen und endothelialen Basalmembran. Das Areal erhöhter Reflektivität war auch noch 28 Tage nach dem chirurgischen Eingriff zu erkennen (Abb. 12A).

Nach der PRK fand sich am ersten postoperativen Tag ein zirkulärer Epitheldefekt und ein Ödem der vorderen zwei Drittel des zentralen Stromas. Bei allen Tieren erfolgte ein kompletter Epithelschluss. Nach 28 Tagen bestand eine ausgeprägte scheibenförmige, subepithelial gelegene Narbe (Abb. 12B).

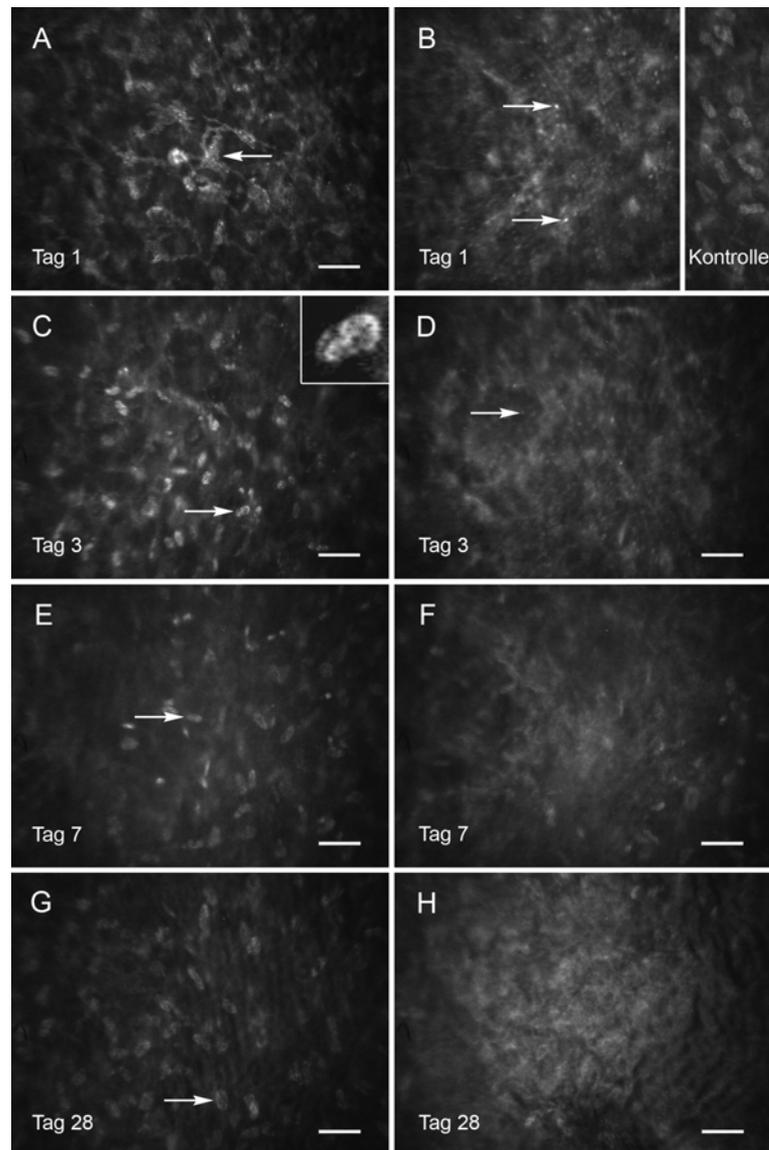
#### 4.1.2 Keratozyten-Aktivierung und Ausbildung einer hypozellulären Narbe

Bei der konfokalmikroskopischen Untersuchung einen Tag nach der intrastromalen fs-Keratotomie fand sich ein unverletztes Epithel. In den stromalen Schichten, die in anteriorer und posteriorer Richtung direkt an die Keratotomie-Zone angrenzten, fanden sich Keratozyten mit hoch-reflektiven Kernen und Zellleibern (Abb. 13A). Zahlreiche Kerne zeigten ein granuläres Reflexionsmuster. Im Gegensatz dazu stellten sich die Kerne von Keratozyten unbehandelte Hornhäute nur niedrig-reflektiv dar (Abb. 13 Kontrolle). Die Ebene der Keratotomie selbst war aufgrund

rasterförmig angeordneter Punkte erkennbar, die vermutlich durch die Lasereinwirkung bedingt waren (Abb. 13B).



**Abbildung 12** Spaltlampenmikroskopie nach (A) intrastromaler fs-Keratotomie und (B) PRK. (A) 28 Tage nach der intrastromalen fs-Keratotomie fand sich bei diffuser Beleuchtung eine transparente Hornhaut. Im optischen Schnitt zeigte sich hingegen eine feine strichförmige Hyper-Reflektivität (Pfeilspitze) im mittleren Hornhautstroma. (B) Eine stark ausgeprägte subepitheliale Narbe im zentralen vorderen Stroma (schwarze Pfeilspitzen) war 28 Tage nach der PRK zu beobachten.



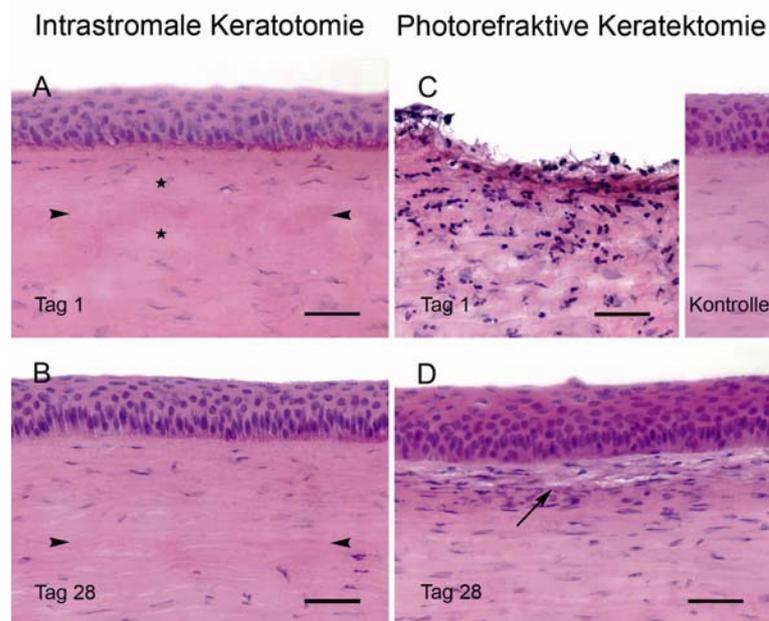
**Abbildung 13** In vivo Konfokalmikroskopie von stromalen Zellen in Nachbarschaft zur Ebene der fs-Keratotomie (linke Spalte) sowie in der Ebene der fs-Keratotomie (rechte Spalte). (A) Einen Tag nach der Keratotomie fanden sich im anterioren Stroma aktivierte Keratozyten (Pfeil) mit hyperreflektiven Kernen und Zellfortsätzen. Das anteriore Stroma nicht operierter Augen (Kontrolle) zeigte hingegen ruhende Keratozyten mit Kernen, die eine mittlere Reflektivität aufwiesen. (B) Die Keratotomie selbst war an rasterförmig angeordneten Punkten erkennbar (Pfeile), die wahrscheinlich den einzelnen Laser-Spots entsprachen. (C) Drei Tage postoperativ fanden sich hoch-reflektive fragmentierte Keratozytenkerne (Pfeil, Ausschnittvergrößerung). (D) Rückgang der punktförmigen Hyper-Reflektivität in der Ebene der Keratotomie. (E) Am 7. postoperativen Tag nahm die Zahl der hochreflektiven fragmentierten Keratozytenkerne ab, (F) wohingegen die diffuse Reflektivität des Hintergrunds in der Ebene der Keratotomie zunahm. (G) Nach 28 Tagen entsprach das Erscheinungsbild der Keratozyten weitgehend dem präoperativen Status. (H) Die azelluläre Substanz zeigte eine weitere Zunahme der Reflektivität und ein wellenförmiges Erscheinungsbild. Maßstabsbalken 50  $\mu\text{m}$ .

Der Abstand der Punkte zueinander betrug etwa 9  $\mu\text{m}$  und entsprach damit weitgehend dem präoperativ gewählten Abstand der Laserpulse. In der Ebene der Keratotomie konnten keine Keratozytenkerne detektiert werden. Drei Tage nach dem Eingriff fanden sich weiterhin hoch-reflektive fragmentierte Keratozytenkerne in den an die Keratotomie angrenzenden stromalen Schichten (Abb. 13C). Die Reflektivität des Punktrasters in der Ebene der Keratotomie nahm ab. Stattdessen nahm die diffuse Reflektivität des Hintergrundes zu (Abb. 13D). Sieben Tage nach dem Eingriff nahm die Zahl hyperreflektiver fragmentierter Zellkerne neben der Keratotomiezone ab (Abb. 13E). Die diffuse Reflektivität des Hintergrundes auf der Ebene der Keratotomie nahm weiter zu (Abb. 13F). Nach 28 Tagen entsprach die Reflektivität der neben der Keratotomie befindlichen Keratozyten denen unbehandelter Hornhäute (Abb. 13G). Zu diesem Zeitpunkt hatte die Hyperreflektivität der azellulären Substanz in der Ebene der Keratotomie weiter zugenommen und zeigte ein wellenförmiges Muster (Abb. 13H).

Einen Tag nach Durchführung der fs-Keratotomie stellte sich in der konventionellen Lichtmikroskopie der Bereich der fs-Keratotomie als eosinophiles azelluläres Band mit einer Breite von 50-70  $\mu\text{m}$  dar. Benachbarte Kollagenfibrillen blieben intakt, zeigten jedoch eine schwächer ausgeprägte Eosinfärbung, möglicherweise als Ausdruck eines geringen Ödems (Abb. 14A). Kavitationsblasen konnten zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Kernfrakturen und zellulärer Debris waren in der konventionellen Lichtmikroskopie nicht detektierbar. Die azelluläre Zone war nach 28 Tagen zwar immer noch sichtbar, jedoch wurde diese mit der Zeit im sagitalen Durchmesser immer kleiner (Abb. 14B). Eine Infiltration mit Entzündungszellen fand sich während der gesamten postoperativen Nachbeobachtungszeit nicht. Die mit dem fs-Laser behandelten Hornhäute zeigten keine Veränderungen im Bereich des Epithels, der Basalmembran oder des Endothels.

Im Gegensatz dazu führte die PRK zu einer Zerstörung der äußeren Hornhautschichten mit einem vollständigen Verlust des zentralen Epithels. Die oberflächlichen Kollagenfibrillen des zentral verdünnten Stromas zeigten eine verstärkte Eosinfärbung einen Tag nach der Behandlung. Eine dichte Infiltration

polymorphkerniger Leukozyten fand sich in der anterioren Hälfte der zentralen Hornhaut, die sich bis in die subepithelial gelegenen Stromalamellen am Wundrand ausbreiteten. Die Oberfläche des Defektes war bedeckt mit zellulärem Debris, der reich an polymorphkernigen Leukozyten war (Abb. 14C). Nach drei Tagen war eine aufgelockerte Textur des sich regenerierenden Epithels zu erkennen und die basalen Epithelzellen zeigten eine Pseudostratifizierung. 28 Tage nach dem chirurgischen Eingriff war das sich regenerierende Epithel teilweise verdickt und wieder regulär stratifiziert. Entsprechend einer stromalen Narbe beobachteten wir eine hohe Dichte an Fibroblasten im subepithelialen leicht ödematösen Stroma. Die Infiltration mit Leukozyten hatte sich zurückgebildet (Abb. 14D).

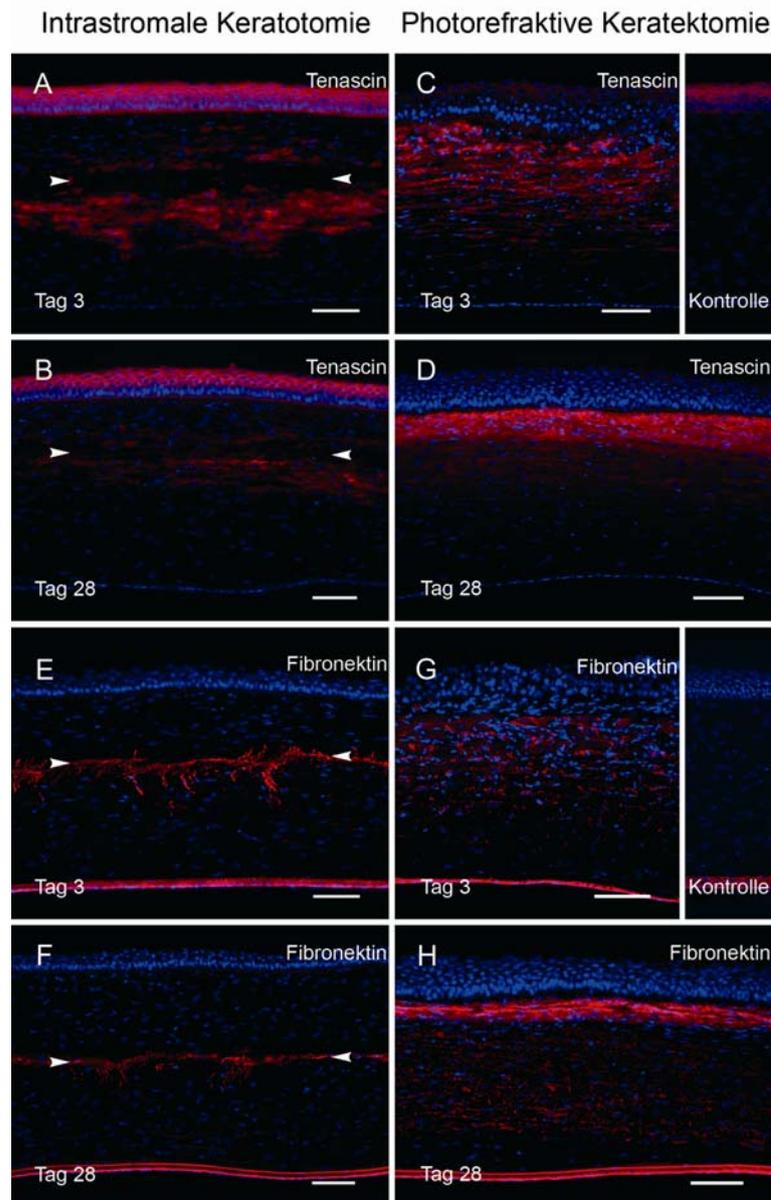


**Abbildung 14** Lichtmikroskopie (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) (A) Einen Tag nach intrastromaler fs-Keratotomie zeigte sich die Keratotomie-Zone als ein eosinophiles azelluläres Band (Pfeilspitzen). Benachbarte Kollagenfibrillen wiesen eine verminderte Eosin-Färbung auf (Sterne). (B) Nach 28 Tagen fand sich weiterhin eine azelluläre Zone (Pfeilspitzen), die mit der Zeit schmaler wurde. (C) Einen Tag nach PRK zeigten sich ein vollständiger Verlust des zentralen Epithels und eine dichte Infiltration mit polymorphkernigen Leukozyten. (D) Nach 28 Tagen stellte sich ein regeneriertes, partiell verdicktes und regulär stratifiziertes Epithel dar. Im leicht ödematösen subepithelial gelegenen Stroma fand sich eine hohe Dichte an Fibroblasten (Pfeile). Die Infiltration durch polymorphkernige Leukozyten bildete sich zurück. Maßstabsbalken 50 µm.

#### 4.1.3 Expression provisorischer extrazellulärer Matrix

Eine Expression von Tenascin und Fibronectin als Bestandteile provisorischer ECM wurde bereits am ersten Tag nach der fs-Keratotomie beobachtet. Die Tenascin-Ablagerungen erfolgten dabei in einem charakteristischen Muster: in einer 50 bis 70  $\mu\text{m}$  breiten, nahezu azellulären Zone im Bereich der Keratotomie fand sich keine Ablagerung von Tenascin. Oberhalb dieses Bereichs stellte sich in der Fluoreszenzmikroskopie eine schmale bandförmige Reaktion gegenüber Tenascin im anterioren Stroma dar. Eine ausgeprägtere Reaktion zeigte sich unmittelbar unterhalb des Lasereintrags. Drei Tage nach der intrastromalen Keratotomie nahm die Intensität der Immunfluoreszenz gegenüber Tenascin zu (Abb. 15A). Bis zum 28. Tag nach dem chirurgischen Eingriff blieb die Lokalisation der Immunfluoreszenz-Reaktion stabil jedoch nahm die Intensität der Färbung ab (Abb. 15B). Auch Fibronectin konnte im Stroma mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie am ersten Tag nach der Keratotomie nachgewiesen werden. Bis zum 28. postoperativen Tag fand sich keine Veränderung in der Intensität der Färbung. Das Verteilungsmuster differierte zwischen Tenascin und Fibronectin: während Tenascin sich diffus in der unmittelbaren Umgebung der Keratotomie ablagerte beschränkte sich die Fibronectin-Ablagerung auf die Fokusebene des Lasers. Fibronectin stellte sich in der Fluoreszenzmikroskopie als feine Linie parallel zur Hornhautoberfläche dar (Abb. 15E, F). Anhand vertikal angeordneter Fibronectinablagerungen konnten Laserspots außerhalb der Fokusebene detektiert werden (Abb. 15E). In diesen Bereichen fand sich auch eine verbreiterte Expression von Tenascin (Abb. 15A). Es konnten also Ablagerungen von Tenascin und Fibronectin im Hornhautstroma nach fs-Laser-Keratotomie beobachtet werden, obwohl weder Thy-1- noch  $\alpha$ -SMA-positive Fibroblasten (s.u.) nachgewiesen werden konnten.

Im Nachbeobachtungszeitraum nach Durchführung der PRK fanden sich für Tenascin und Fibronectin vergleichbare Expressionsmuster. Einen Tag nach PRK wurden Tenascin- und Fibronectin-Ablagerungen im vorderen und mittleren Stroma im Bereich der Ablationszone gefunden. Drei Tage nach dem chirurgischen



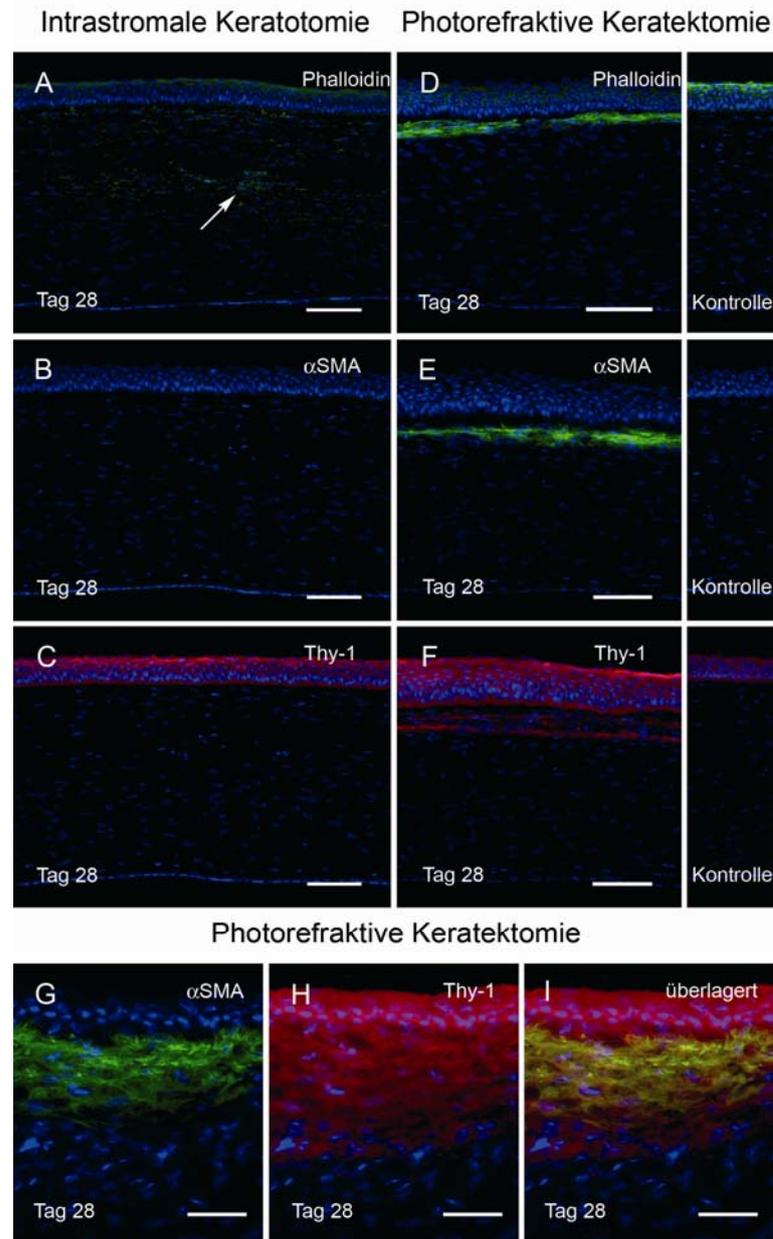
**Abbildung 15** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Tenascin C und EDA-Fibronectin. (A) Nach intrastromaler Keratotomie traten diffuse Tenascin-Ablagerungen um die azelluläre Keratotomie-Zone auf. (B) Die Intensität der Tenascin-Expression nahm im Verlauf ab. (C) Nach PRK konnte Tenascin im anterioren und im mittleren Stroma unterhalb der Ablationszone nachgewiesen werden. (D) 28 Tage nach der Behandlung beschränkten sich die Tenascin-Ablagerungen auf die subepithelialen Schichten. Auffällig war die deutlich reduzierte Tenascin-Expression im sich regenerierenden Epithel. (E) Nach intrastromaler Keratotomie fand sich eine auf die Läsion begrenzte Fibronectin-Ablagerung in Form einer feinen oberflächenparallelen Linie (Pfeilspitzen). (F) Die Fibronectin-Expression zeigte keine nachweisbare Intensitätsänderung während der gesamten Nachbeobachtungszeit von 28 Tagen. (G, H) Nach PRK fand sich eine zur Tenascin-Expression vergleichbare Fibronectin-Ablagerung. Hoechst-Kernfärbung (blau). Maßstabsbalken 100 µm.

Eingriff nahm die Intensität beider Komponenten der Extrazellulärmatrix leicht zu (Abb. 15C, G). In der Folgezeit beschränkten sich die Tenascin- und Fibronektin-Ablagerungen auf die subepithelialen Stromaschichten und bildeten sich in den tiefer gelegenen Schichten zurück (Abb. 15D, H). Die Intensität des fluoreszenzmikroskopischen Nachweises von Tenascin im sich regenerierenden Epithel war nach der PRK im Vergleich zum Epithel nicht behandelter Hornhäute deutlich reduziert (Abb. 15D).

#### 4.1.4 Ausbleibende Transformation von Keratozyten in Myofibroblasten

Nach der intrastromalen fs-Keratotomie beobachteten wir im Vergleich zu Hornhäuten der nicht behandelten Kontrollgruppe nur eine geringfügig stärkere Phalloidin-Färbung im Bereich der Keratotomie (Abb. 16A). Thy-1- und  $\alpha$ -SMA-positive Zellen konnten nach der fs-Keratotomie im gesamten Nachbeobachtungszeitraum nicht detektiert werden (Abb. 16B, C).

Im Gegensatz dazu kam es nach der PRK zu einer deutlichen Expression aller verwendeten Fibroblasten-Marker. Bereits am ersten Tag nach der Behandlung zeigte sich in der anterioren Hälfte des Stromas eine stark ausgeprägte Bildung filamentösen Aktins. Noch nach 28 Tagen fand sich eine Zunahme der Phalloidin Färbung in subepithelialen stromalen Schichten (Abb. 16D). Thy-1- und  $\alpha$ -SMA-positive stromale Zellen wurden am dritten postoperativen Tag beobachtet. Diese Zellen fanden sich typischerweise an den Wundrändern in der Nachbarschaft des Hornhautepithels. Nach 7 Tagen wurden Thy-1 und  $\alpha$ -SMA in subepithelial gelegenen stromalen Zellen neben dem sich regenerierenden Epithel exprimiert. 28 Tage nach der PRK wurde für beide Marker die stärkste Expression beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt fand sich eine Anfärbung für Thy-1 und  $\alpha$ -SMA in den subepithelialen stromalen Schichten (Abb. 16E, F). Die Expressionsmuster von Thy-1 und  $\alpha$ -SMA wurden mit Hilfe einer Doppel-Fluoreszenz-Färbung miteinander verglichen. Dabei fand sich für Thy-1 und  $\alpha$ -SMA eine Kolokalisation in einigen Stromaschichten.

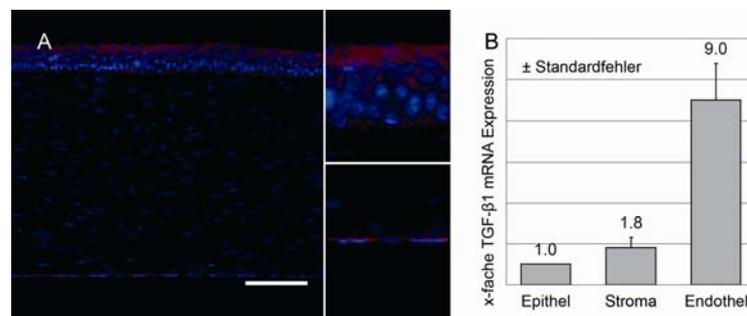


**Abbildung 16** Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Fibroblasten. (A) Geringe Phalloidin-Färbung (Pfeil) im Bereich der intrastromalen Keratotomie (Pfeilspitzen). (B, C) Nach intrastromaler Keratotomie fand sich kein Nachweis für eine  $\alpha$ -SMA- und Thy-1-Expression im Stroma. (D) Ausgeprägte Ansammlung filamentösen Aktins nach PRK, die mittels Phalloidin-Färbung detektiert wurde. (E, F) Eine Expression von  $\alpha$ -SMA und Thy-1 wurde in den subepithelial gelegenen stromalen Schichten nach PRK gefunden. Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung von (G)  $\alpha$ -SMA und (H) Thy-1 im subepithelialen Stromaanteilen nach PRK. (I)  $\alpha$ -SMA-positive subepithelial gelegene stromale Zellen zeigten auch eine Immunreaktivität für Thy-1. Die subepitheliale Zone in der Thy-1 exprimiert wurde war dabei breiter als die der  $\alpha$ -SMA-Expression. Hoechst-Kernfärbung (blau). Maßstabsbalken (A-F) 100  $\mu$ m, (G-I) 50  $\mu$ m).

In allen Schichten, in denen  $\alpha$ -SMA exprimiert wurde, fand sich auch eine Expression von Thy-1. Hingegen zeigte sich eine Expression von Thy-1 auch ohne Nachweis einer  $\alpha$ -SMA-Expression (Abb. 16G-I).

#### 4.1.5 Ausbleibende Induktion des Fibrosemarkers TGF- $\beta$ 1

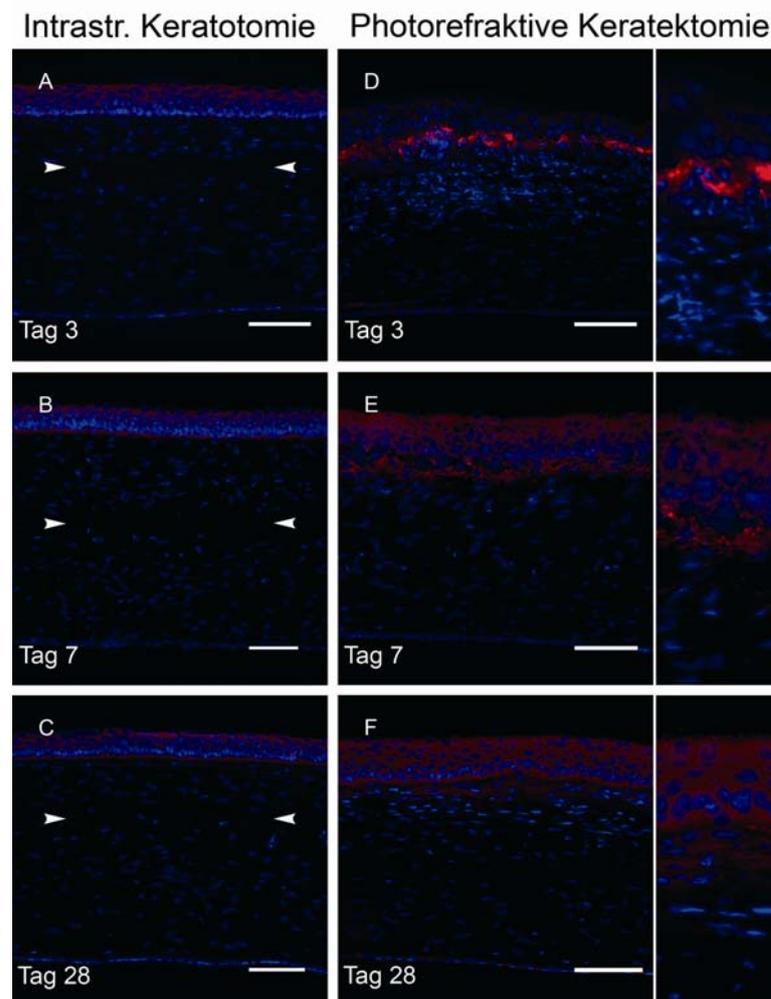
Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte die Expression von TGF- $\beta$ 1 im Epithel und Endothel von nicht behandelten Hornhäuten nachgewiesen werden, wohingegen im Stroma TGF- $\beta$ 1 nicht detektiert werden konnte (Abb. 17A). Die Technik der LMD mit nachfolgender Durchführung einer quantitativen *real-time* (RT)-PCR ermöglichte darüber hinaus eine schichtenspezifische Quantifizierung der Gen-Expression in allen Hornhautschichten. Unter Verwendung dieser Technik konnte die Expression von TGF- $\beta$ 1-mRNA in den Epithelzellen, den stromalen Zellen, sowie in den Endothelzellen von nicht behandelten Hornhäuten nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Epithel fand sich im Stroma eine 1,8fach und im Endothel eine 9,0fach höhere TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression (Abb. 17B).



**Abbildung 17** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von TGF- $\beta$ 1-Protein und schichtenspezifische Quantifizierung der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression in einer nicht behandelten Hornhaut. (A) TGF- $\beta$ 1-Protein konnte im Epithel und im Endothel, jedoch nicht im Stroma nachgewiesen werden. Bildausschnitte des Epithels und des Endothels in vergrößerter Darstellung. Hoechst-Kernfärbung (blau). Maßstabsbalken 100  $\mu$ m. (B) Mit Hilfe der LMD und nachfolgender quantitativer RT-PCR konnte TGF- $\beta$ 1-mRNA im Epithel, Stroma und Endothel nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Epithel fand sich im Stroma eine 1,8fach und im Endothel eine 9,0fach höhere TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression.

Nach der intrastromalen fs-Keratotomie konnten TGF- $\beta$ 1-positive Zellen zu keinem Zeitpunkt im Bereich der Keratotomie nachgewiesen werden. Das

Färbemuster des Epithels und Endothels war vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe (Abb. 18A-C). Im Gegensatz zur intrastromalen fs-Keratotomie, kam es nach der PRK zu einem deutlichen Anstieg der TGF- $\beta$ 1-Expression. Am ersten Tag nach der Behandlung fand sich in Nachbarschaft zum zentralen Epitheldefekt eine grobkörnige Anfärbung für TGF- $\beta$ 1 (nicht abgebildet).



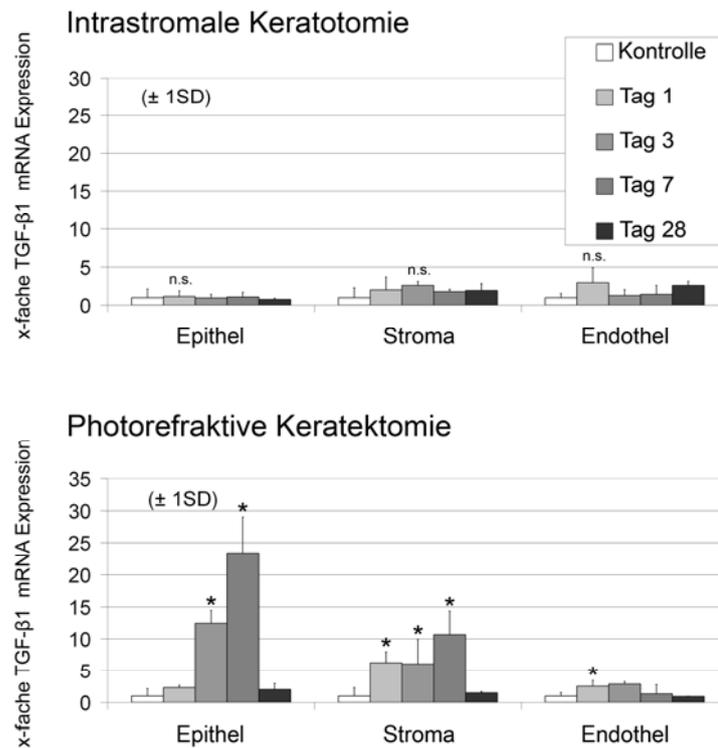
**Abbildung 18** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von TGF- $\beta$ 1 nach intraströmaler fs-Keratotomie (A-C) und nach PRK (D-F). (A-C) Im Vergleich zu unbehandelten Hornhäuten fand sich nach der intraströmaler fs-Keratotomie kein Anstieg der TGF- $\beta$ 1-Expression im Hornhautstroma. Der Bereich der fs-Keratotomie war an einer azellulären Zone (Pfeilspitzen) im Hornhautstroma zu erkennen. (D-F) Nach PRK zeigten sich TGF- $\beta$ 1-Ablagerungen im Bereich der Behandlungszone in subepithelial gelegenen Stromaschichten. TGF- $\beta$ 1 fand sich noch 28 Tage nach der Behandlung im subepithelialen Stroma und im Epithel. Hoechst-Kernfärbung (blau). Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.

Drei Tage nach der Behandlung zeigte sich eine ausgeprägte TGF- $\beta$ 1-Expression in den subepithelial gelegenen stromalen Schichten (Abb. 18D). Die zu diesem Zeitpunkt in der anterioren Hälfte des Stromas nachweisbaren polymorphkernigen Leukozyten exprimierten kein TGF- $\beta$ 1 (Abb. 18D). Die Intensität der TGF- $\beta$ 1-Färbung nahm am 7. postoperativen Tag im sich regenerierenden und partiell verdickten Epithel zu (Abb. 18E). Bis zum 28. Tag nach der PRK blieb die Intensität der TGF- $\beta$ 1-Färbung in den subepithelialen stromalen Schichten sowie im Epithel hoch (Abb. 18F). Der Nachweis des TGF- $\beta$ 1-Proteins mittels Fluoreszenzmikroskopie korrelierte gut mit der Kinetik der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, entsprach der relative mengenmäßige Nachweis der TGF- $\beta$ 1-mRNA in Hornhautschichten von nicht behandelten Kontrolltieren weitgehend den jeweils korrespondierenden Schichten von Hornhäuten, die mit einer fs-Keratotomie behandelt worden waren: Im Vergleich zu den Kontrolltieren kam es 1, 3, 7 oder 28 Tage nach der fs-Keratotomie zu einem Anstieg bzw. Abfall der mRNA-Expression um einen Faktor von 1,2, 1,0, 1,1 und 0,8 in Epithelzellen, um einen Faktor von 2,0, 2,6, 1,8 und 2,0 in stromalen Zellen und um einen Faktor von 3,0, 1,3, 1,4 und 2,6 in Endothelzellen (Abb. 19). Im Gegensatz dazu fand sich nach der PRK ein deutlicher Anstieg der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression im Epithel und Stroma. Einen, 3, 7 oder 28 Tage nach dem Eingriff stieg die TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression in den Epithelzellen um den Faktor 2,3, 12,5, 23,4, bzw. 2,0 an. Im Stroma erfolgte ein Anstieg der TGF- $\beta$ 1-Level zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten um den Faktor 6,3, 6,1, 10,7 bzw. 1,5. Im Endothel fanden sich hingegen nach der PRK im Vergleich zu den Kontrollen ähnliche Expressionslevel (Anstieg / Abfall um einen Faktor von 2,5, 2,9, 1,4 bzw. 0,9).

Diese Daten demonstrieren, dass weder die TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression noch die Proteinsynthese nach der intrastromalen fs-Keratotomie signifikant ansteigen. Im Gegensatz dazu wurde nach der PRK die Expression von TGF- $\beta$ 1 in kornealen Epithelzellen und stromalen Zellen induziert. Dabei fanden sich bis zu 23-fach höhere TGF- $\beta$ 1-mRNA-Level nach der PRK im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 19).

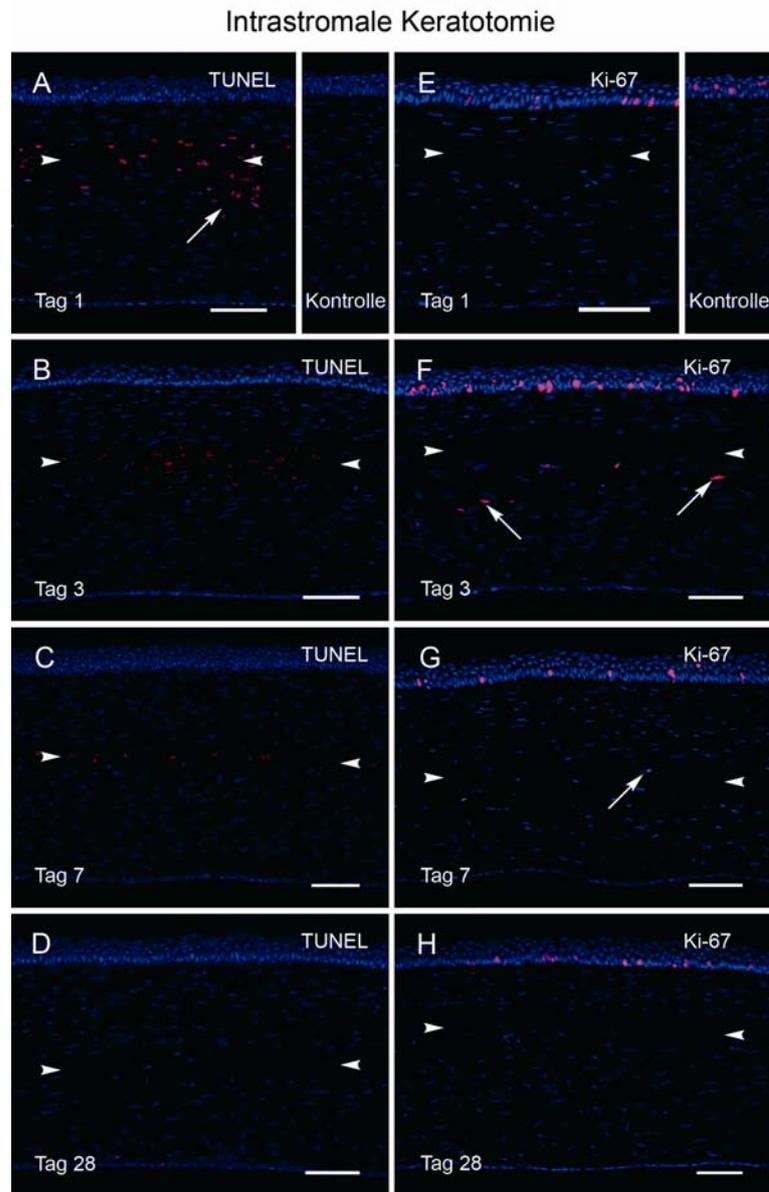
Wie in der Fluoreszenzmikroskopie erkennbar, wurde der Anstieg der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression nach der PRK von einer verstärkten Proteinsynthese begleitet (Abb. 18D-F).



**Abbildung 19** TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression nach intraströmaler fs-Keratotomie und PRK in epithelialen, stromalen und endothelialen Zellen. Die relative Quantifikation der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression zeigte keine Unterschiede zwischen unbehandelten Augen und Augen, die eine intraströmale fs-Keratotomie erhielten. Im Gegensatz dazu wurde TGF- $\beta$ 1-mRNA in epithelialen und stromalen Zellen nach PRK induziert. Es fanden sich bis zu 23-fach höhere TGF- $\beta$ 1-mRNA-Level. Signifikanzniveau\*  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.6 Apoptose und Proliferation von Keratozyten

Nach der fs-Keratotomie konnte unter Verwendung eines TUNEL-Assays im Bereich der Keratotomie DNA-Fragmentation nachgewiesen werden. Der Bereich TUNEL-positiver Zellen hatte einen sagitalen Durchmesser von 50-70  $\mu$ m und war ausgedehnter in Bereichen, in denen defokussierte Laserspots anhand der Fibronek-



**Abbildung 20** Detektion von DNA-Fragmentation mittels TUNEL-Assay (links) und von proliferierenden Zellen mittels Ki-67-Antikörpern (rechts) nach intrastromaler fs-Keratotomie. (A) Das maximale Ausmaß der DNA-Fragmentation zeigte sich im Bereich der Keratotomie (Pfeilspitzen) am ersten postoperativen Tag. (B, C) Die Zahl TUNEL-positiver Zellen nahm mit der Zeit ab. (D) 28 Tage nach der intrastromalen Keratotomie fanden sich keine TUNEL-positiven Zellen mehr. (E, H) Weder am ersten noch am 28. postoperativen Tag konnten proliferierende Zellen im Stroma nachgewiesen werden. (F) Ki-67-positive Zellen (Pfeile) fanden sich erstmals am 3. postoperativen Tag im Bereich der fs-Keratotomie. (G) Wenige proliferierende Zellen (Pfeile) konnten auch 7 Tage nach der Behandlung dargestellt werden. Hoechst-Kernfärbung (blau). Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.

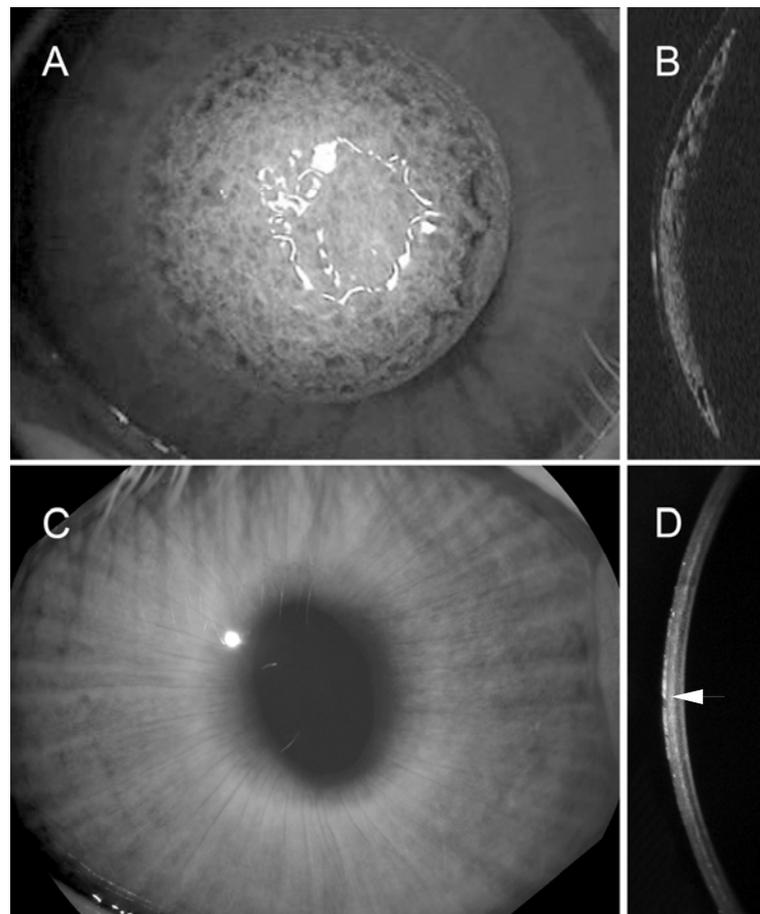
tinablagerungen detektiert werden konnten (Abb. 20A). Die maximale Anzahl TUNEL-positiver Zellen wurde am ersten Tag beobachtet und nahm anschließend im zeitlichen Verlauf ab (Abb. 20B, C). 28 Tage nach dem Eingriff fanden sich keine TUNEL-positiven Zellen mehr. Der resultierende Rückgang der Zelldichte im Bereich der fs-Keratotomie war nach 28 Tagen weiterhin mit Hilfe der Hoechst-Färbung darstellbar (Abb. 20D).

Ki-67-positive Zellen fanden sich erstmals am 3. postoperativen Tag im Bereich der fs-Keratotomie (Abb. 20F). Die proliferierenden Zellen des Hornhautstromas fanden sich dabei ausschließlich in der Nachbarschaft zu Bereichen, in denen es zur DNA-Fragmentation gekommen war. Vereinzelt konnten proliferierende Zellen auch noch 7 Tage nach der fs-Keratotomie beobachtet werden (Abb. 20G). Am ersten und 28. Tag nach dem Eingriff fanden sich hingegen keine Ki-67-positiven Zellen im Stroma (Abb. 20E, H). Die Zahl Ki-67-positiver Epithelzellen wurde nicht von der intrastromalen fs-Keratotomie beeinflusst.

## 4.2 Gewebeablation durch intrastromale Keratektomie

### 4.2.1 Resorption intrastromaler Kavitationsblasen

Unmittelbar nach Durchführung der intrastromalen fs-Keratektomie fand sich eine ausgeprägte intrastromale Gasansammlung begleitet von einer Trübung des Stromas und einer Irregularität der Hornhautoberfläche (Abb. 21A). Mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie ließ sich die sichelförmige Anordnung der Kavitationsblasen im Sagittalschnitt darstellen (Abb. 21B). Bereits einen Tag nach der Behandlung hatten sich die Blasen vollständig zurückgebildet. Nur eine gering ausgeprägte strichförmige Trübung fand sich im Bereich der stattgehabten Photodisruption. Sieben Monate nach der Behandlung zeigte sich bei der Spaltlampen-Untersuchung mittels diffuser Beleuchtung die erhaltene Transparenz der Hornhaut (Abb. 21C). Im optischen Schnitt fand sich eine feine strichförmige Hyper-Reflektivität des mittleren Hornhautstromas (Abb. 21D).

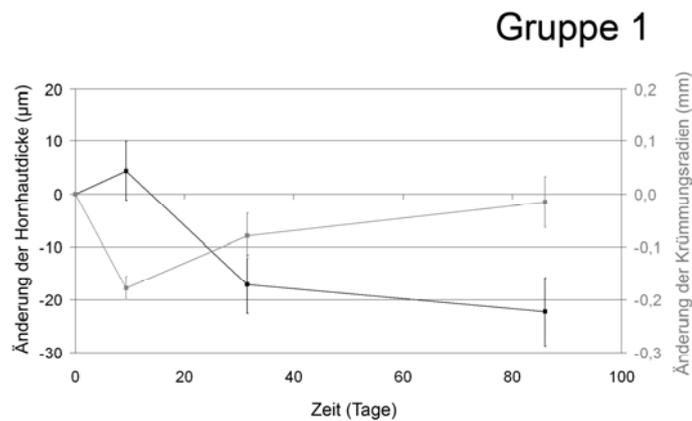


**Abbildung 21** (A, C, D) Spaltlampenmikroskopie und (B) optische Kohärenztomographie nach intrastromaler fs-Keratektomie. (A, B) Unmittelbar nach Durchführung der intrastromalen fs-Keratektomie fand sich eine Ansammlung von Kavitationsblasen im Hornhautstroma; mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie ließ sich die sichelförmige Konfiguration der Kavitationsblasen im Sagittalschnitt darstellen. (C, D) 7 Monate nach dem Eingriff erschien die Hornhaut bei diffuser Beleuchtung transparent. Die Darstellung im optischen Schnitt zeigte eine feine höherreflektive Linie (Pfeilspitze) im mittleren Hornhautstroma zu diesem Zeitpunkt.

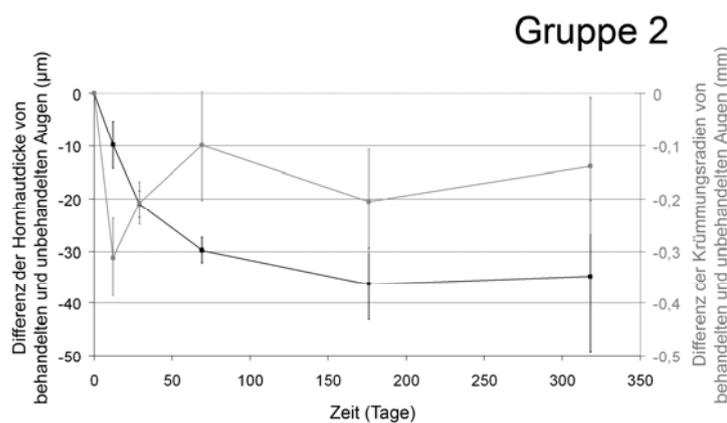
#### 4.2.2 Abnahme der zentralen Hornhautdicke

Die präoperativ bestimmte mittlere zentrale Hornhautdicke (CCT) von ausgewachsenen Kaninchen (Gruppe 1) betrug  $405,9 \pm 23,4 \mu\text{m}$ . 9 Tage nach der intrastromalen fs-Keratektomie nahm die CCT auf  $410,3 \pm 35,1 \mu\text{m}$  zu. Bei der Abschlussuntersuchung 86 Tage nach der Behandlung fand sich eine CCT von

383,6±31,5 µm. Die intrastromale Ablation führte somit zu einer statistisch signifikanten (p=0,007) Abnahme der CCT um -22,3±6,4 µm (Abb. 22).



**Abbildung 22** Änderung der Hornhautdicke und der Krümmungsradien der Hornhaut nach intrastromaler fs-Keratektomie bei ausgewachsenen Kaninchen (Gruppe 1); die intrastromale fs-Keratektomie führte nach 86 Tagen zu einer Reduktion der zentralen Hornhautdicke um -22,3±6,4 µm. Zu diesem Zeitpunkt fand sich ein mittlerer Krümmungsradius von 8,32±0,35 mm, der damit weitgehend dem präoperativ gemessenen Wert entsprach.



**Abbildung 23** Änderung der Hornhautdicke und der Krümmungsradien der Hornhaut nach intrastromaler fs-Keratektomie bei heranwachsenden Kaninchen (Gruppe 2); beim Vergleich von prä- und postoperativen Werten behandelter und unbehaltener Augen fand sich nach 11 Monaten eine Abnahme der mittleren zentralen Hornhautdicke (-34,8±14,5 µm) und eine Abnahme des mittleren Krümmungsradius (-0,14±0,13 mm).

Behandelte Augen von noch heranwachsenden Kaninchen (Gruppe 2) zeigten während des Nachbeobachtungszeitraums von 318 Tagen eine geringe Zunahme der mittleren CCT von  $337,0 \pm 17,2 \mu\text{m}$  auf  $344,8 \pm 35,6 \mu\text{m}$ . Im Gegensatz dazu zeigten nicht behandelte Augen eine größere Zunahme der mittleren CCT von  $333,8 \pm 21,9 \mu\text{m}$  auf  $376,3 \pm 38,5 \mu\text{m}$ . Die bei allen Tieren dieser Gruppe zu beobachtende Zunahme der Hornhautdicke, ist demnach sehr wahrscheinlich auf das Wachstum der Tiere zurückzuführen.

Ein Vergleich von behandelten mit nicht behandelten Augen lässt jedoch die Abnahme der CCT nach intrastromaler Gewebeablation erkennen: Nach 12, 29, 69, 176 und 318 Tagen betrug die Abnahme jeweils  $-9,8 \pm 4,5$ ,  $-21,0 \pm 2,5$ ,  $-29,8 \pm 2,4$ ,  $-36,3 \pm 6,9$  ( $p=0,01$ ) und  $-34,8 \pm 14,5$  ( $p=0,09$ )  $\mu\text{m}$ . Die Messwerte ergaben, dass die CCT ab dem zweiten postoperativen Monat relativ stabil blieb (Abb. 23).

Neben einer Abnahme der Hornhautdicke fand sich auch eine Beeinflussung der Hornhautradien durch die intrastromale Ablation.

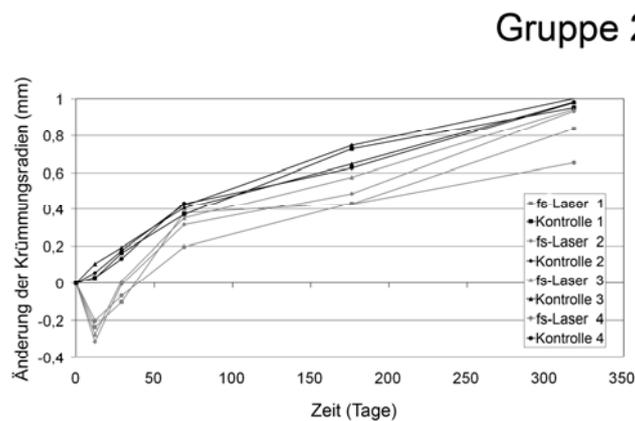
#### 4.2.3 Modellierung der Hornhautkrümmung

Der mittlere präoperative Hornhautradius von adulten Kaninchen (Gruppe 1) betrug  $8,34 \pm 0,40$  mm. Neun Tage nach der fs-Keratektomie konnte eine Schwellung der Hornhaut verbunden mit einer Abnahme der Hornhautradien beobachtet werden ( $8,16 \pm 0,40$  mm; Abb. 22). Im weiteren Verlauf kam es zu einer zunehmenden Abflachung der Hornhaut, so dass der mittlere Hornhautradius einen Monat nach dem Eingriff  $8,26 \pm 0,39$  mm betrug. Bei der Abschlussuntersuchung, 86 Tage nach dem Eingriff, fand sich ein mittlerer Hornhautradius von  $8,32 \pm 0,35$  mm. Ein Wert, der weitgehend dem präoperativen Ausgangswert entsprach (Änderung von  $-0,02 \pm 0,05$  mm,  $p=0,71$ ; Abb. 22).

Behandelte Augen von heranwachsenden Kaninchen (Gruppe 2) zeigten eine Zunahme der Hornhautradien während des gesamten Nachbeobachtungszeitraumes (318 Tage) von  $7,46 \pm 0,07$  mm auf  $8,30 \pm 0,16$  mm. Ähnlich wie bei den behandelten Augen zeigten die nicht behandelten kontralateralen Augen eine

Zunahme der mittleren Hornhautradien von  $7,36 \pm 0,06$  mm auf  $8,34 \pm 0,08$  mm. Die Zunahme der Hornhautradien bei allen Augen kann daher als Ausdruck des Augenwachstums der heranwachsenden Kaninchen interpretiert werden. Dennoch fand sich bei Vergleich der Radien der behandelten zu den unbehandelten kontralateralen Augen im Mittel eine Abnahme der Hornhautradien nach intrastromaler Gewebeablation: Nach 12, 29, 69, 176 und 318 Tagen betrug die Abnahme im Mittel  $-0,31 \pm 0,07$ ,  $-0,21 \pm 0,04$ ,  $-0,10 \pm 0,10$ ,  $-0,21 \pm 0,10$  ( $p=0,03$ ) und  $-0,14 \pm 0,13$  mm ( $p=0,13$ ; Abb. 23). Die Hornhautradien blieben ab dem zweiten postoperativen Monat relativ stabil. Elf Monate nach dem Eingriff entsprach die Änderung der Hornhautradien einer Refraktionsänderung von etwa  $-0,7$  dpt.

Bei Betrachtung der Hornhautradien der einzelnen Augen (Abb. 24) fand sich eine vorübergehende Abnahme der Radien um durchschnittlich  $-0,31 \pm 0,07$  mm für alle operierten Augen 12 Tage nach dem Eingriff. Im Verlauf der Nachbeobachtungszeit kam es sowohl bei behandelten als auch unbehandelten Hornhäuten zu einem kontinuierlichem Anstieg der Hornhautradien. Dennoch waren die behandelten Hornhäute zu allen Zeitpunkten steiler als die nicht behandelten Hornhäute (Abb. 24).



**Abbildung 24** Änderung der Krümmungsradien der Hornhaut nach intrastromaler fs-Keratektomie bei heranwachsenden Kaninchen (Gruppe 2); die Hornhäute behandelter Augen waren zu allen postoperativen Beobachtungszeitpunkten steiler, als die nicht behandelten Augen.

## 5 DISKUSSION

### **Transdifferenzierung von Keratozyten in Myofibroblasten wird von der Art der Hornhautverletzung bestimmt**

Der Nachweis reaktiver Fibroblasten (v.a. Myofibroblasten) nach hornhautchirurgischen Eingriffen ist ein Indikator für die Ausbildung einer Narbe [11]. Daher untersuchten wir die Wundheilungsreaktion nach fs-Keratotomie und PRK unter besonderer Berücksichtigung der Differenzierung von Keratozyten in reaktive Fibroblasten. Wir etablierten den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von  $\alpha$ -SMA und Thy-1 als Marker von reaktiven Fibroblasten in histologischen Schnitten. Ferner untersuchten wir Hornhäute nach fs-Keratotomie mittels konfokaler in vivo Mikroskopie, um die reaktiven Veränderungen der Keratozyten im vitalen Gewebe darzustellen. Während es nach einer kombinierten Verletzung des Epithels und Stromas (PRK) zur einer ausgeprägten Aktivierung und Differenzierung der Keratozyten in reaktive Fibroblasten kam, fand sich nach isolierter intrastromaler fs-Keratotomie kein Nachweis Thy-1-positiver Fibroblasten bzw.  $\alpha$ -SMA-positiver Myofibroblasten. Darüber hinaus ließen sich in der konfokalen in vivo Mikroskopie keine Zellen finden, die die für Fibroblasten typische spindelförmige Morphologie aufwiesen [158].

Folglich kam es nach der PRK zu einer Differenzierung von Keratozyten in Myofibroblasten, jedoch nicht nach erfolgter fs-Keratotomie. Wir schlussfolgern aus diesen Beobachtungen, dass die Differenzierung von Keratozyten in Thy-1- oder  $\alpha$ -SMA-positive Fibroblasten nach einer Verletzung des Stromas nur bei gleichzeitiger Verletzung von Stroma und Epithel auftritt. Die Aktivierung von Keratozyten, vor allem deren Differenzierung in reaktive Fibroblasten, bestimmt das Ausmaß und die Art der Narbenbildung nach einer Hornhautverletzung [11]. Die für die Narbenbildung charakteristischen Myofibroblasten besitzen kontraktile Eigenschaften und eine reduzierte Transparenz [88,247,248]. In zahlreichen Studien wurde  $\alpha$ -SMA, ein Marker für Myofibroblasten, für die immunhisto-

chemische Detektion von reaktiven Fibroblasten bei der Untersuchung kornealer Wundheilungsprozesse eingesetzt [75,249-251].

Jüngste in vitro Studien zeigten jedoch, dass die Expression des Oberflächenproteins Thy-1 (CDw90) ebenfalls dafür verwendet werden kann, ruhende Keratozyten von reaktiven Phänotypen zu unterscheiden [240]. Thy-1 positive Zellen exprimieren größere Mengen interstitiellen Kollagens [252] und besitzen profibrogene Eigenschaften [253]. Koumas et al. (2003) stellte die These auf, dass nur Thy-1-positive Fibroblasten die Fähigkeit besitzen, sich in Myofibroblasten zu differenzieren [241]. Die Eignung von Thy-1 als Fibroblasten-Marker nach einer Hornhautverletzung in vivo überprüften wir durch Immunfluoreszenztests mit einem gegen Thy-1 gerichteten Antikörper an Hornhäuten, an denen zuvor eine PRK-Behandlung durchgeführt worden war. Unsere Färbungen bestätigten die o.g. in vitro Ergebnisse: nach PRK konnten wir eine Immunreaktion gegenüber Thy-1 bei subepithelial gelegenen stromalen Zellen nachweisen. Darüber hinaus konnten wir mittels Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie darstellen, dass  $\alpha$ -SMA-positive stromale Zellen stets auch eine Immunreaktion gegenüber Thy-1 zeigen. Damit konnten wir in dieser Arbeit erstmals demonstrieren, dass Thy-1 geeignet ist, Fibroblasten nach kornealer Verletzung in vivo nachzuweisen. Die in der Phalloidin-Färbung darstellbare ausgeprägte Aggregation intrazellulären filamentösen Aktins in den subepithelial gelegenen Hornhautschichten nach PRK bestätigte diese Differenzierung ruhender Keratozyten in reaktive Fibroblasten.

### **Ablagerung extrazellulärer Matrix im Hornhautstroma trotz fehlenden Epitheldefektes**

Die fs-Keratotomie führte zu einer Ablagerung von Tenascin und Fibronectin im Stroma. Zur Ablagerung dieser Bestandteile provisorischer ECM kommt es, wie in früheren Studien gezeigt werden konnte, auch nach PRK und LASIK [109,110,254]. Dass es trotz intakten Epithels nach der fs-Keratotomie zu einer Produktion von provisorischer ECM kommt, beweist, dass entgegen früherer Annahmen [101,115,254,255] weder ein Debridement des Epithels mit nachfolgender Epithelproliferation noch eine Verletzung der epithelialen

Basalmembran eine Voraussetzung für die Bildung von Tenascin und Fibronectin darstellt. Das Verteilungsmuster der Tenascin- und Fibronectin-Ablagerungen nach intrastromaler Keratotomie legt nahe, dass stromale Zellen der Ort der Synthese dieser provisorischen ECM-Komponenten sind. Dies konnte auch bereits in mehreren früheren Studien gezeigt werden [100,101,256].

Interessanterweise fanden sich die Fibronectin-Ablagerungen in dem nach intrastromaler Keratotomie zu beobachtenden bandförmigen azellulären Bereich des Stromas. Tenascin konnte in diesem Bereich aber nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedliche Verteilung der beiden Proteine könnte sein, dass Fibronectin im Gegensatz zu Tenascin sezerniert wird, bevor es zum Zelltod der Keratozyten kommt. Diese Hypothese ist vereinbar mit früheren Studienergebnissen, in denen gezeigt werden konnte, dass die Fibronectinbildung der Tenascinbildung nach Hornhaut- oder Hautverletzungen zeitlich vorausgeht [257,258].

Die nach der fs-Keratotomie aufgetretenen Tenascin- und Fibronectinablagerungen könnten für die in der Spaltlampenmikroskopie detektierbare und auf den Bereich der Keratotomie begrenzte Hyper-Reflektivität verantwortlich sein [43,259]. Die Ablagerung von ECM-Bestandteilen stellte sich in der Konfokalmikroskopie als eine Zunahme einer zellfreien, hoch-reflektiven amorphen Masse in der Ebene der Keratotomie dar. Der Nachweis von provisorischer ECM ist dabei aber kein Indikator für eine ungünstige Wundheilung. Denn die Ablagerung von Tenascin und Fibronectin ist zeitlich limitiert und führt daher nicht zu einer dauerhaften Lichtstreuung [109,255]. Basierend auf der Beobachtung, dass Tenascin und Fibronectin in narbenfrei heilenden Wunden (beispielsweise bei der fetalen Wundheilung) schneller und in höheren Konzentrationen akkumulieren, postulieren einige Autoren, dass diese beiden ECM-Bestandteile sogar eher einen günstigen Einfluss auf die Wundheilung haben [258,260]. Die Funktion von Tenascin und Fibronectin im Rahmen der kornealen Wundheilung ist jedoch nicht vollständig geklärt [113].

### **Einfluss eines intakten Epithels auf den Zelltod von Keratozyten**

Der Nachweis einer DNA-Fragmentation nach fs-Keratotomie zeigt, dass eine Epithelverletzung keine notwendige Voraussetzung für den Zelltod von Keratozyten ist. Ein regelmäßig nach Epithelverletzungen eintretender Zelltod von Keratozyten wurde erstmals von Dohlman et al. (1968) beschrieben [125] und später von anderen Untersuchern für die PRK bestätigt [75]. Auch nach einer LASIK kommt es durch einen Schwund an Keratozyten zu einer zellfreien Zone in der Umgebung des Mikrokeratom-Schnittes [75]. Als ursächlich für dieses Phänomen sahen einige Untersucher mögliche epitheliale-stromale Interaktionen an. Sie postulierten, dass Zytokine, wie Interleukin-1 [128], Tumornekrosefaktor [133], als auch der Faktor Fas/Fas-Ligand [132,261] von verletzten Epithelzellen freigesetzt werden und eine Apoptose der benachbarten Keratozyten induzieren. Ferner nahmen einige Autoren an, dass die nach einer LASIK zu beobachtende Apoptose durch Zytokine induziert wird, die ausgehend vom Ort der Epithelläsion entlang des lamellären Spaltraumes in das Stroma diffundieren. Auch durch den Mikrokeratom-Schnitt in den lamellären Spaltraum verschleppte Epithelzellen wurden für die Induktion der Apoptose verantwortlich gemacht [74,128,262,263]. Da jedoch auch ohne begleitende Epithelverletzung ein Zelltod von Keratozyten durch eine fs-Keratotomie in unseren Untersuchungen nachgewiesen wurde, müssen auch andere Pathomechanismen eine Rolle spielen. Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Laser-Behandlung mag dabei ein ursächlicher Faktor sein [264]. Alternativ könnte auch ein über Nexus (*gap junctions*) vermitteltes transzelluläres Signal an der Ausbreitung der Zellschädigung beteiligt sein, wie es kürzlich für Astrozyten nachgewiesen werden konnte [129].

### **Laser-Mikrodissektion und nachfolgende quantitative RT-PCR ermöglichen schichtenspezifische Bestimmung der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression**

Die LMD in Kombination mit nachfolgender quantitativer RT-PCR kann eingesetzt werden, um Genexpressions-Profile von Zellpopulationen der Hornhaut in ihrem "natürlichen" Zustand zu bestimmen [265]. In der vorliegenden Arbeit wurde diese

Technik erstmals verwendet, um die Expression des profibrotischen Zytokins TGF- $\beta$ 1 im Epithel, Stroma und Endothel unbehandelter Hornhäute zu bestimmen. In Übereinstimmung mit früheren *in vivo* und *in vitro* Studien [137,161,162] konnte TGF- $\beta$ 1-mRNA in allen drei Hornhautschichten gefunden werden. Der Einsatz von LMD und quantitativer RT-PCR-Technik ermöglichte darüber hinaus einen Vergleich der Expressions-Level von TGF- $\beta$ 1 in diesen drei Hornhautschichten. Mit Hilfe dieser sensitiven Technik konnten die höchsten TGF- $\beta$ 1-mRNA-Level im Endothel, mittlere Level im Stroma und die niedrigsten Level im Epithel gemessen werden.

Daneben wurde die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, um TGF- $\beta$ 1 in unbehandelten Hornhäuten darzustellen. In Einklang mit Ergebnissen von Ivarsen et al. [158], fand sich eine schwache Expression im Epithel und Endothel, nicht aber im Stroma. Der fehlende fluoreszenzmikroskopische Nachweis von TGF- $\beta$ 1 im Stroma, ist vermutlich auf die geringe Zelldichte in dieser Hornhautschicht zurückzuführen. In Geweben mit wenigen TGF- $\beta$ 1-synthetisierenden Zellen liegt die Proteinkonzentration wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie stehen dabei in Einklang mit denen der mRNA-Bestimmung. Bei der quantitativen RT-PCR wird die TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression in Proben bestimmt, die jeweils die gleiche Gesamtmenge an RNA enthalten. Dadurch wird erklärbar warum das Epithel mit seiner hohen Zelldichte in der Fluoreszenzmikroskopie eine hohe Konzentration an TGF- $\beta$ 1-Protein, in der RT-PCR hingegen eine geringe TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression aufweist: im Epithel produziert eine große Zahl an Zellen mit geringer mRNA-Expression mehr Protein, als wenige Zellen mit einer leicht höheren mRNA-Expression.

Zusammenfassend kann aus den gewonnenen Daten abgeleitet werden, dass in allen drei Schichten der Hornhaut TGF- $\beta$ 1-mRNA exprimiert wird und das Ausmaß der Expression nach chirurgischen Eingriffen potentiell hoch reguliert werden kann.

### **Anstieg der TGF- $\beta$ 1-mRNA- und Protein-Expression bleibt nach selektiver intrastromaler Hornhautverletzung aus**

Nach den oben getroffenen Feststellungen, stellt sich die Frage, in welchen der Hornhautschichten es tatsächlich zu einem Anstieg der TGF- $\beta$ 1-Expression nach einer kombinierten Verletzung des Epithels und des Stromas kommt, und ob eine stromale Verletzung allein ausreicht, um eine signifikante Anhebung der TGF- $\beta$ 1-Expression zu bewirken. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Verletzung des Epithels und des Stromas beispielsweise im Rahmen einer PRK zu einem Anstieg der TGF- $\beta$ 1-Expression führt [266,267]. Diese Beobachtung konnte in der hier vorgestellten Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus ermöglichte der Einsatz der LMD in Kombination mit der RT-PCR, eine Quantifizierung und eine schichtenspezifische Zuordnung der TGF- $\beta$ 1-Expression nach einer PRK. Mit Hilfe dieser sehr sensitiven Techniken konnte demonstriert werden, dass die TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression im Epithel um das 23-fache und im Stroma um das 11-fache hochreguliert wird. Das Maximum der Expression fand sich dabei am 7. Tag nach der Behandlung. Auch auf der Proteinebene kam es, nachgewiesen durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, zu einer deutlichen Zunahme von TGF- $\beta$ 1 im regenerierten Epithel und im benachbarten Stroma. Folglich wird die Expression von TGF- $\beta$ 1 sowohl auf Ebene der mRNA, als auch auf der Proteinebene nach einer Verletzung des Epithels und des Stromas hochreguliert. Dabei wird TGF- $\beta$ 1 nach einer Verletzung der Hornhaut nicht nur vom Epithel, sondern auch von Zellen des Stromas synthetisiert. Auf der Basis der hier vorgestellten, als auch bereits publizierter Daten, kann man von einer Abfolge folgender Ereignisse ausgehen:

Nach erfolgter PRK wird TGF- $\beta$ 1 von verletzten und regenerierenden Epithelzellen, sowie von Fibroblasten im verletzten Stroma reichlich produziert. TGF- $\beta$ 1 penetriert in das periläsionale Gewebe, stimuliert dort korneale Fibroblasten und reguliert deren Differenzierung in Myofibroblasten. Da TGF- $\beta$ 1 darüber hinaus seine eigene Synthese hochreguliert [268,269], kommt es im Bereich der Verletzung zu einer weiteren Zunahme der TGF- $\beta$ 1-Produktion durch

autokrine und parakrine Sekretion. Auf diese Weise akkumuliert TGF- $\beta$ 1 im Bereich der Läsion und fördert schlussendlich die Narbenbildung der Hornhaut.

Wir untersuchten ferner die TGF- $\beta$ 1-mRNA- und Protein-Expression nach intrastromaler fs-Keratotomie. Im Gegensatz zur PRK, kommt es bei diesem Eingriff zu keinerlei Verletzung des Hornhautepithels. Bei dieser Art der Läsionierung fand sich in keiner der drei Hornhautschichten ein signifikanter Anstieg der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Level. Auch in der Fluoreszenzmikroskopie zeigten sich keine Veränderungen in der Verteilung des TGF- $\beta$ 1-Proteins gegenüber unbehandelten Hornhäuten. Folglich kann durch selektive intrastromale Läsionierung eine Zunahme von TGF- $\beta$ 1-mRNA und -Protein vermieden werden.

Da stromale Zellen TGF- $\beta$ 1-mRNA unter physiologischen Bedingungen exprimieren und es nach einer PRK zu einem Anstieg dieser Expression kommt, stellt sich die Frage, warum nach einer fs-Keratotomie keine messbare Veränderung der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Produktion im Stroma zu detektieren ist. Eine mögliche Erklärung findet sich in der geringen Zelldichte des Hornhautstromas. Aufgrund der geringen Zelldichte führt eine umschriebene Verletzung des Stromas zu einer Schädigung einer nur sehr kleinen Zahl an Zellen. Die damit einhergehenden Veränderungen der TGF- $\beta$ 1-Level liegen daher vermutlich unter der Nachweisgrenze. Möglicherweise erfordert die Expression von TGF- $\beta$ 1 im Stroma auch ein epitheliales „Signal“, wie es von anderen Autoren wiederholt angenommen wurde [73,250]. Welcher Mechanismus auch immer verantwortlich sein mag, die Tatsache, dass es nach einer Keratotomie mit dem fs-Laser zu keinem Anstieg von TGF- $\beta$ 1 in der Hornhaut kommt, erklärt, warum dieser Eingriff zu keiner Differenzierung von Keratozyten in Myofibroblasten führt [236].

### **Femtosekunden-Laser-Technologie ermöglicht klinisch relevante intrastromale Gewebeablation**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der gewünschte Effekt einer Abnahme der zentralen Hornhautdicke durch intrastromale Ablation erreicht werden kann, dass das Ausmaß dieses Effektes von klinischer Relevanz ist und der

erzeugte Effekt im Nachbeobachtungszeitraum stabil blieb. Die Transparenz blieb erhalten und es fanden sich keine klinischen Zeichen einer Infektion oder Entzündungsreaktion, obwohl weder eine anti-inflammatorische noch antibiotische Therapie erfolgte.

Erste Versuche Mitte der 1990er Jahre einer intrastromalen Gewebeablation bei Katzen-Hornhäuten unter Verwendung von ps-Lasern hatten zu inkonsistenten Ergebnissen geführt. Trotz einer zunächst zu beobachtenden Abnahme der Hornhautdicke um etwa 50  $\mu\text{m}$  6 Wochen nach der Behandlung fand sich im weiteren Verlauf eine Regression des Ablationseffektes, so dass 6 Monate nach Behandlung die ursprüngliche Hornhautdicke wieder erreicht wurde [229]. Basierend auf diesen Untersuchungsergebnissen äußerten einige Autoren generelle Zweifel an der Machbarkeit einer intrastromalen Gewebeablation [243,244]. Sie postulierten, dass ein Gewebeabtrag durch die Kavitationsblasen zuvor applizierter Laserpulse verhindert wird. Um einen Gewebeabtrag zu realisieren, sollte daher der Abstand der einzelnen Laser-Effekte größer sein, als der Radius der induzierten Kavitationsblasen. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche intrastromale Gewebeablation. Die in früherer Zeit verwendeten ps-Laser produzieren bedeutend größere Kavitationsblasen, als die heutzutage eingesetzten fs-Laser. Die hier vorgestellte Abnahme der Hornhautdicke könnte daher auf die geringere Größe der Kavitationsblasen bei Einsatz moderner fs-Laser zurückzuführen sein.

### **Intrastromale Ablation resultiert in stabiler Änderung von Hornhautdicke und Krümmungsradien**

Ab dem zweiten postoperativen Monat fanden sich nur geringe Fluktuationen der zentralen Hornhautdicke und der kornealen Krümmungsradien. Eine Zunahme der Hornhautdicke entsprechend einer Regression des Ablationseffektes, wie sie in früheren Studien beobachtet wurde, mag auf ein Wachstum der Versuchstiere zurückzuführen sein. Mit der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es während des Wachstums der Kaninchen zu einer Zunahme der Hornhautdicke kommt und dadurch der erreichte Ablationseffekt maskiert werden kann. Ein

Vergleich der prä- und postoperativen zentralen Hornhautdicken behandelter und unbehandelter Augen ergab hingegen keine Anzeichen für eine Regression während des Nachbeobachtungszeitraumes von 318 Tagen.

Die intrastromale Ablation führte daneben auch zu einer reproduzierbaren und stabilen Änderung der kornealen Krümmungsradien. Entgegen der Erwartung kam es zu einer geringen Abnahme der Hornhauradien. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt mag in einer biomechanischen Schwächung der Hornhaut begründet liegen, die zu einer Ektasie führte.

### **Ausblick: Klinischer Einsatz intrastromaler Hornhautchirurgie**

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen zur kornealen Wundheilung nach intrastromaler fs-Keratotomie konnte gezeigt werden, dass eine intrastromale Keratotomie unter Einsatz eines fs-Lasers eine hypozelluläre stromale Narbe erzeugt, die vergleichbar ist mit der günstigen Narbenbildung im zentralen Hornhautbereich nach einer LASIK-Behandlung. Darüberhinaus wurden keinerlei histologische Zeichen einer Infektion oder Entzündungsreaktion nach intrastromaler fs-Keratotomie gefunden, und dies obwohl keine anti-inflammatorische oder antibiotische Therapie verabreicht wurde. Damit scheint die fs-Keratotomie eine Ablationstechnik für Hornhautgewebe zu sein, die mit einer minimalen Fibrose und aller Voraussicht nach einem geringen Infektionsrisiko verbunden ist. Als eine der Ursachen für die günstige Wundheilungsreaktion konnte der ausbleibende Anstieg der TGF- $\beta$ 1-Expression nach intrastromaler fs-Keratotomie ausgemacht werden. Dabei scheint die fehlende Verletzung des Epithels von entscheidender Bedeutung zu sein. Denn durch eine Verletzung des zellreichen Epithels, wie sie im Rahmen einer PRK auftritt, kommt es zur Synthese relativ großer Mengen an TGF- $\beta$ 1. Dieses TGF- $\beta$ 1 fördert wiederum seine eigene weitere Expression in Epithelzellen und stromalen Zellen. Obwohl auch stromale Zellen generell die Fähigkeit besitzen TGF- $\beta$ 1 zu exprimieren, bleibt dies ohne klinische Relevanz, wenn eine gleichzeitige Epithelverletzung vermieden werden kann. Diese experimentellen Ergebnisse sprechen für eine „no-touch“-Strategie

bezüglich des Hornhautepithels und legen eine Weiterentwicklung der fs-Laser-Technik für den klinischen Einsatz nahe.

Ratkay-Traub et al. berichteten als Erste darüber, dass mit Hilfe von fs-Lasern intrastromal Hornhautgewebe beim Menschen ablatiert werden kann [231]. Die Behandlung hyperoper und myoper Patienten führte zu einer Refraktionsänderung um bis zu 2,25 Dioptrien. Der theoretische Behandlungsansatz beruhte dabei vermutlich auf einer intrastromalen Gewebeablation. Jedoch wurden keine Daten bezüglich der prä- und postoperativen Hornhautdicke bzw. der Hornhauttopographie veröffentlicht. In jüngsten Studien konnte gezeigt werden, dass eine dreischichtige fs-Laser-Ablation in der mittleren Peripherie des Hornhautstromas vermutlich durch eine Geweberelaxation zu einer Abflachung der zentralen Hornhaut führt [270]. In einer dritten Studie wurde nachgewiesen, dass mittels fs-Laser-assistierter intrastromaler Keratotomien ohne nennenswerte Gewebeablation eine klinisch relevante Presbyopiekorrektur erzielt werden kann (INTRACOR) [233]. Alles in allem ist bislang jedoch noch nicht abschließend geklärt, inwieweit sich fs-Laser-assistierte intrastromale Ablationstechniken auf die Biomechanik, die Form und die Refraktion der Hornhaut auswirken.

In der hier vorgestellten Studie wie auch in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der gewünschte Effekt einer Ausdünnung der zentralen Hornhaut durch intrastromale Ablation erreicht werden kann [229] und stabil ist [231]. Leider scheint das hier verwendete Ablationsmuster jedoch noch nicht für den klinischen Einsatz geeignet zu sein, da es durch eine massive Ansammlung von Gasblasen im Hornhautstroma zu dessen vorübergehender Eintrübung und zu einer Irregularität der Hornhautoberfläche kam. Dies würde im Gegensatz zum etablierten LASIK-Verfahren zu einem Abfall des Visus für einige Tage führen. Dennoch scheint die intrastromale fs-Laser-assistierte Gewebeablation Vorteile bezüglich postoperativer Narbenbildung und des Infektionsrisikos zu besitzen. Die Ergebnisse legen daher nahe, das klinische Potential selektiver intrastromaler Ablationstechniken für die Behandlung von Refraktionsfehlern weiter zu evaluieren.

## 6 SCHLUSSFOLGERUNG

Mit Hilfe von fs-Lasern ist es möglich, isoliert intrastromal Gewebe dauerhaft zu abladieren, ohne dass es zu einer Verletzung des Epithels kommt [236]. Die ausbleibende Epithelverletzung bewirkt, dass nach intrastromaler Gewebeablation ein signifikanter Anstieg der TGF- $\beta$ 1-Expression in der Hornhaut verhindert wird [271]. Da TGF- $\beta$ 1 für die Ausbildung kornealer Narben verantwortlich gemacht wird, ist dessen fehlende Induktion vermutlich für die günstige Wundheilungsreaktion und die erhaltene Transparenz der Hornhaut nach intrastromaler Gewebeablation ursächlich. Das Ausmaß der erzielten intrastromalen Gewebeablation scheint dabei auszureichen, um klinisch signifikante Refraktionsänderungen bewirken zu können [272]. Diese Befunde legen eine Weiterentwicklung selektiver intrastromaler Ablationstechniken zur Behandlung von Refraktionsfehlern nahe.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Der fs-Laser ist ein für die Ophthalmologie neuartiges chirurgisches Instrument, mit dem Potential, etablierte Operationsmethoden zu ersetzen und neue Operationsverfahren zu ermöglichen. Seit dem Jahr 2001 stehen ophthalmologische fs-Laser für den klinischen Einsatz zur Verfügung, die eine Durchtrennung und Ablation von Hornhautgewebe mit höchster Präzision ermöglichen. Aufgrund der frei wählbaren Focusebene des Lasers können Schnitte in beliebiger Form und in unterschiedlichen Gewebetiefen erzeugt werden. Da das Hornhautgewebe von der Laserstrahlung durchdrungen werden kann, bieten fs-Laser erstmals die Möglichkeit einer „*subsurface*“-Chirurgie. So ist es gegebenenfalls möglich, Schnitte im Hornhautstroma zu erzeugen, ohne die Oberfläche zu verletzen.

Bei bislang etablierten refraktiv-chirurgischen Verfahren (LASIK, PRK) können durch die notwendige Verletzung der Augenoberfläche Komplikationen auftreten. Neben Schnittkomplikationen durch die verwendeten mechanischen Schneidgeräte (Mikrokeratome) können Infektionen und Wundheilungsstörungen das Sehvermögen stark beeinträchtigen. In der Hoffnung diese Komplikationen umgehen zu können, zielt die Weiterentwicklung von refraktiv-chirurgischen Operationstechniken darauf ab, die gewünschte Refraktionsänderung durch selektiven Abtrag tieferer Gewebsschichten (Hornhautstroma) zu erreichen.

Da nun möglicherweise ein präziser intrastromaler Abtrag von Gewebe ohne Verletzung der oberflächlichen Gewebeschichten (Epithel) möglich ist, haben wir in tierexperimentellen Studien am Kaninchen die fs-Technologie eingesetzt, um folgende Fragen zu beantworten:

- Welche Art der Narbenbildung entsteht nach intrastromaler Gewebeablation mit dem fs-Laser?
- Welchen Einfluß hat eine bei Verwendung des fs-Lasers vermeidbare Epithelverletzung auf die stromale Narbenbildung?
- In welchem Ausmaß ist ein intrastromaler Gewebeabtrag möglich und ist die erzielte Formänderung der Hornhaut stabil?

In der vorgestellten Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sich nach intrastromaler Gewebeablation unter Einsatz eines fs-Lasers eine primitive zellarme Narbe geringer optischer Reflektivität ausbildet [236]. Trotz einer Aktivierung und Proliferation von Keratozyten kam es zu keiner Differenzierung von Keratozyten in die für eine Narbenbildung typischen Myofibroblasten. Als dafür ursächlich fand sich ein bei der intrastromalen Keratotomie ausbleibender Anstieg der Expression des profibrotischen Zytokins TGF- $\beta$ 1 [271]. Im Gegensatz dazu konnte bei Verfahren, bei denen es sowohl zu einer epithelialen, als auch zu einer stromalen Läsion der Hornhaut kommt (PRK) ein ausgeprägter Anstieg der TGF- $\beta$ 1-Expression im Stroma und Epithel der Hornhaut nachgewiesen werden. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass die Expression von TGF- $\beta$ 1 und die damit verbundene Narbenbildung bei einer Hornhautverletzung primär von einer Schädigung des Epithels abhängt. Darüberhinaus blieb nach intrastromaler Keratotomie die Einwanderung von Entzündungszellen aus. Auch Zeichen einer Infektion fanden sich nicht, obwohl keine antibiotische Therapie erfolgte. Die gemachten Beobachtungen legen folglich nahe, dass eine isolierte intrastromale Verletzung der Hornhaut mit einer günstigen Wundheilung verbunden ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von fs-Lasern ein intrastromaler Gewebeabtrag möglich ist und die erzielten Formänderungen der Hornhaut stabil blieben [272].

Nach den erzielten Ergebnissen erscheint die Entwicklung von Operationsmethoden, bei denen die Brechkraftänderung des Auges durch intrastromale Gewebeablation mit dem fs-Laser erreicht werden soll, als vielversprechend.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Kohnen T, Thomala MC, Cichocki M, Strenger A. Internal anterior chamber diameter using optical coherence tomography compared with white-to-white distances using automated measurements. *J Cataract Refract Surg* 2006;32:1809-1813
2. Funk RHW, Apple DJ, Naumann GOH. Embryologie, Anatomie und Untersuchungstechnik. In: Naumann GOH ed, *Pathologie des Auges*. Berlin Heidelberg: Springer; 1997:1-79
3. Fukuda S, Kawana K, Yasuno Y, Oshika T. Anterior ocular biometry using 3-dimensional optical coherence tomography. *Ophthalmology* 2009;116:882-889
4. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie*. Berlin Heidelberg: Springer; 1991
5. Feng Y, Simpson TL. Corneal, limbal, and conjunctival epithelial thickness from optical coherence tomography. *Optom Vis Sci* 2008;85:880-883
6. Moore KL. *Grundlagen der Medizinischen Embryologie*. Stuttgart: Enke; 1990
7. Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2244-2258
8. Muller LJ, Pels L, Vrensen GF. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:476-488
9. Reim M. *Hornhaut und Bindehaut*. In: Hockwin ed, *Biochemie des Auges*. Stuttgart: Enke; 1985:13-46
10. Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, Guthoff RF. The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea* 2000;19:185-193
11. Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:529-551
12. Patel S, McLaren J, Hodge D, Bourne W. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:333-339
13. Rieck PW, Sherif ZAR, Hartmann C, Pleyer U. [Corneal wound healing. I. Biological basis and clinical significance]. *Ophthalmologie* 2003;100:749-770
14. Hasty DL, Hay ED. Freeze-fracture studies of the developing cell surface. I. The plasmalemma of the corneal fibroblast. *J Cell Biol* 1977;72:667-686
15. Masur SK, Cheung JK, Antohi S. Identification of integrins in cultured corneal fibroblasts and in isolated keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2690-2698
16. Chakravarti S, Wu F, Vij N, Roberts L, Joyce S. Microarray studies reveal macrophage-like function of stromal keratocytes in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3475-3484
17. Radner W, Zehetmayer M, Aufreiter R, Mallinger R. Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea. *Cornea* 1998;17:537-543
18. Bron AJ. The architecture of the corneal stroma. *Br J Ophthalmol* 2001;85:379-381
19. Newton RH, Meek KM. Circumcorneal annulus of collagen fibrils in the human limbus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1125-1134
20. Daxer A, Fratzl P. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implication in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:121-129
21. Marshall GE, Konstas AG, Lee WR. Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. I. Types I-IV collagen and laminin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1991;29:157-163
22. Marshall GE, Konstas AG, Lee WR. Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. II. Collagen types V and VI. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1991;29:164-171
23. Zimmermann DR, Fischer RW, Winterhalter KH, Witmer R, Vaughan L. Comparative studies of collagens in normal and keratoconus corneas. *Exp Eye Res* 1988;46:431-442
24. Newsome DA, Gross J, Hassell JR. Human corneal stroma contains three distinct collagens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22:376-381
25. Keene DR, Lunstrum GP, Morris NP, Stoddard DW, Burgeson RE. Two type XII-like collagens localize to the surface of banded collagen fibrils. *J Cell Biol* 1991;113:971-978

26. Zimmermann DR, Trueb B, Winterhalter KH, Witmer R, Fischer RW. Type VI collagen as a major component in aged human cornea. *Fed Eur Biochem Soc* 1986;197:55-58
27. Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1037-1046
28. Zieske JD. Extracellular matrix and wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:237-241
29. Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Conrad GW. Physical and biological properties of keratan sulphate proteoglycan. *Biochem Soc Trans* 1991;19:871-876
30. Laing RA, Neubauer L, Leibowitz HM, Oak SS. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. II. Clinical observations. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1712-1715
31. Singh G. Mitosis and cell division in human corneal endothelium. *Ann Ophthalmol* 1986;18:88-90, 93-84
32. Jacobsen U, Michels G, Liedtke G, Muller MC, Reim M. Organ-Culture of Pig Cornea - Methods, Clinical Morphology and Histology. *Ophthalmic Res* 1985;17:201-201
33. Fromm M, Hegel U, Wiederholt M, Hierholzer K. *Pathophysiologie des Menschen*. Weinheim: Chapman & Hall 1991
34. Davis FA. The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. *Trans Amer Ophth Soc* 1929;27:401-441
35. Chan T, Payor S, Holden BA. Corneal thickness profiles in rabbits using an ultrasonic pachometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1408-1410
36. Sorsby A, Sheridan M. Changes in the refractive power of the cornea during growth; observations on the rabbit. *Br J Ophthalmol* 1953;37:555-557
37. Stone J, Leary G. Changes in refraction during growth: the significance of changes in corneal power as observed in the rabbit. *Br J Physiol Opt* 1957;14:90-94
38. Prince JH. Dimensions of the Eye, Cornea, Trabecular Region, Sclera. In: Prince JH ed, *The Rabbit in Eye Research*. Springfield, IL: Charles C. Thomas; 1964:94
39. Hayashi S, Osawa T, Tohyama K. Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians. *J Morphol* 2002;254:247-258
40. Ojeda JL, Ventosa JA, Piedra S. The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM approach. *J Anat* 2001;199:567-576
41. Grehn F, Leydhecker W. *Augenheilkunde*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1995
42. Mierdel P, Seiler S. *Physiologische Optik der Hornhaut*. In: Seiler T ed, *Refraktive Chirurgie der Hornhaut*. Stuttgart: Thieme; 2000
43. Møller-Pedersen T. Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Exp Eye Res* 2004;78:553-560
44. Meek KM, Leonard DW, Connon CJ, Dennis S, Khan S. Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. *Eye (Lond)* 2003;17:927-936
45. Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 1957;136:263-286
46. Hart RW, Farrell RA. Light scattering in the cornea. *J Opt Soc Am* 1969;59:766-774
47. Sayers Z, Koch MH, Whitburn SB, et al. Synchrotron x-ray diffraction study of corneal stroma. *J Mol Biol* 1982;160:593-607
48. Farrell RA, McCally RL. Corneal transparency. In: Albert DM, Jakobiec FA eds, *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia: WB Saunders; 2000:629-643
49. Lindstrom RL. Advances in corneal preservation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1990;88:555-648
50. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, et al. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci* 1999;112 ( Pt 5):613-622
51. Møller-Pedersen T. On the structural origin of refractive instability and corneal haze after excimer laser keratectomy for myopia. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 2003:1-20
52. Stramer BM, Fini ME. Uncoupling keratocyte loss of corneal crystallin from markers of fibrotic repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4010-4015
53. Pei Y, Reins RY, McDermott AM. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 3A1 expression by the human keratocyte and its repair phenotypes. *Exp Eye Res* 2006;83:1063-1073
54. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 2006;443:993-997

55. Munneryn CR, Koons SJ, Marshall J. Photorefractive keratectomy: a technique for laser refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 1988;14:46-52
56. Roberts C. The cornea is not a piece of plastic. *J Refract Surg* 2000;16:407-413.
57. Elsheikh A, Wang D, Brown M, et al. Assessment of corneal biomechanical properties and their variation with age. *Curr Eye Res* 2007;32:11-19
58. Dupps WJ, Jr., Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Exp Eye Res* 2006;83:709-720
59. Dupps WJ, Jr., Roberts C. Effect of acute biomechanical changes on corneal curvature after photokeratectomy. *J Refract Surg* 2001;17:658-669.
60. Polack FM. Morphology of the cornea. I. Study with silver stains. *Am J Ophthalmol* 1961;51:1051-1056
61. Smolek MK, McCarey BE. Interlamellar adhesive strength in human eyebank corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1087-1095
62. Ehlers N. Studies on the hydration of the cornea with special reference to the acid hydration. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1966;44:924-931
63. Hjortdal JO. On the biomechanical properties of the cornea with particular reference to refractive surgery. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 1998:1-23
64. Luce DA. Determining in vivo biomechanical properties of the cornea with an ocular response analyzer. *J Cataract Refract Surg* 2005;31:156-162
65. Meltendorf C, Ohrloff C. Untersuchung der vorderen Augenabschnitte. In: Kroll P, Kühle M, Kühle HJ eds, *Augenärztliche Untersuchungsmethoden*. Stuttgart: Thieme; 2007:179-200
66. Kotecha A. What biomechanical properties of the cornea are relevant for the clinician? *Surv Ophthalmol* 2007;52 Suppl 2:S109-114
67. Buzard KA. Introduction to biomechanics of the cornea. *Refract Corneal Surg* 1992;8:127-138
68. Knothe K, Wessels H. *Finite Elemente: eine Einführung für Ingenieure*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1999
69. Bille JF, Zhang H. Finite Element Model of the Human Cornea for Simulation of Intrastromal Laser Refractive Surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:668
70. Katsube N, Wang R, Okuma E, Roberts C. Biomechanical response of the cornea to phototherapeutic keratectomy when treated as a fluid-filled porous material. *J Refract Surg* 2002;18:593-597
71. Pinsky PM, Datye DV. A microstructurally-based finite element model of the incised human cornea. *J Biomech* 1991;24:907-922
72. Riede UN, Wiestler OD, Müller H. Störungen des Zellwachstums. In: Riede UN, Schaefer HE eds, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart, New York: Thieme; 1995
73. Stramer BM, Zieske JD, Jung JC, Austin JS, Fini ME. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4237-4246
74. Wilson SE, Mohan RR, Ambrosio R, Jr., Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 2001;20:625-637
75. Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res* 2003;76:71-87
76. Domarus D, Deuble-Bente K, Naumann GOH. Trauma, Operationen und Wundheilung des Auges. In: Naumann GOH ed, *Pathologie des Auges*. Berlin Heidelberg: Springer; 1997:363-366
77. Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea* 2005;24:S2-S11
78. Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, Lanigan JM, Colvin RB. Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest* 1981;45:120-129
79. Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res* 2002;21:1-14
80. Zieske JD, Guimaraes SR, Hutcheon AE. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res* 2001;72:33-39
81. O'Brien TP, Li Q, Ashraf MF, et al. Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy. *Arch Ophthalmol* 1998;116:1470-1474
82. Olson R, Cameron R, Hovis T, et al. Clinical evaluation of the Unfolder. *J Cataract Refract Surg* 1997;23:1384-1389

83. Petridou S, Masur SK. Immunodetection of connexins and cadherins in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1740-1748
84. Jester JV, Rodrigues MM, Herman IM. Characterization of avascular corneal wound healing fibroblasts. New insights into the myofibroblast. *Am J Pathol* 1987;127:140-148
85. Matsuda H, Smelser GK. Electron microscopy of corneal wound healing. *Exp Eye Res* 1973;16:427-442
86. Jester J, Petroll W, Barry P, Cavanagh H. Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:809-819
87. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4219-4223
88. Jester JV, Huang J, Barry-Lane PA, et al. Transforming growth factor(beta)-mediated corneal myofibroblast differentiation requires actin and fibronectin assembly. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1959-1967
89. Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:311-356
90. Welch MP, Odland GF, Clark RA. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol* 1990;110:133-145
91. Garana RM, Petroll WM, Chen WT, et al. Radial keratotomy. II. Role of the myofibroblast in corneal wound contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:3271-3282
92. Cintron C, Hong BS, Kublin CL. Quantitative analysis of collagen from normal developing corneas and corneal scars. *Curr Eye Res* 1981;1:1-8
93. Davison PF, Galbavy EJ. Connective tissue remodeling in corneal and scleral wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1478-1484
94. Hassell JR, Cintron C, Kublin C, Newsome DA. Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars. *Arch Biochem Biophys* 1983;222:362-369
95. Carlson EC, Wang JJ, Liu CY, et al. Altered KSPG expression by keratocytes following corneal injury. *Mol Vis* 2003;9:615-623
96. Hart GW. Biosynthesis of glycosaminoglycans during corneal development. *J Biol Chem* 1976;251:6513-6521
97. Conrad GW. Collagen and mucopolysaccharide biosynthesis in the developing chick cornea. *Dev Biol* 1970;21:292-317
98. Toole BP, Trelstad RL. Hyaluronate production and removal during corneal development in the chick. *Dev Biol* 1971;26:28-35
99. Vartio T, Laitinen L, Narvanen O, et al. Differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult human tissues. *J Cell Sci* 1987;88:419-430
100. Fukuda M, Yagi J, Yasumoto K, et al. Localization of fibronectin and actin in cultured rabbit keratocytes. *Jpn J Ophthalmol* 1988;32:6-13
101. Gipson IK, Watanabe H, Zieske JD. Corneal wound healing and fibronectin. *Int Ophthalmol Clin* 1993;33:149-163
102. Chen C, Michelini-Norris B, Stevens S, et al. Measurement of mRNAs for TGFs and extracellular matrix proteins in corneas of rats after PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4108-4116
103. Ljubimov AV, Alba SA, Burgeson RE, et al. Extracellular matrix changes in human corneas after radial keratotomy. *Exp Eye Res* 1998;67:265-272
104. Kaji Y, Amano S, Oshika T, et al. Effect of anti-inflammatory agents on corneal wound-healing process after surface excimer laser keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:426-431.
105. Drew AF, Schiman HL, Kombrinck KW, et al. Persistent corneal haze after excimer laser photokeratectomy in plasminogen-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:67-72
106. Iglesia DD, Gala PH, Qiu T, Stepp MA. Integrin expression during epithelial migration and restratification in the tenascin-C-deficient mouse cornea. *J Histochem Cytochem* 2000;48:363-376
107. Suzuki K, Tanaka T, Enoki M, Nishida T. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2495-2500
108. Saika S, Shiraishi A, Liu CY, et al. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. *J Biol Chem* 2000;275:2607-2612

109. Tervo K, van Setten GB, Beuerman RW, et al. Expression of tenascin and cellular fibronectin in the rabbit cornea after anterior keratectomy. Immunohistochemical study of wound healing dynamics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2912-2918
110. Latvala T, Tervo K, Mustonen R, Tervo T. Expression of cellular fibronectin and tenascin in the rabbit cornea after excimer laser photorefractive keratectomy: a 12 month study. *Br J Ophthalmol* 1995;79:65-69
111. Tervo T, van Setten GB, Lehto I, et al. Immunohistochemical demonstration of tenascin in the normal human limbus with special reference to trabeculectomy. *Ophthalmic Res* 1990;22:128-133
112. Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 2000;218:235-259
113. Andresen JL, Ledet T, Hager H, Josephsen K, Ehlers N. The influence of corneal stromal matrix proteins on the migration of human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res* 2000;71:33-43
114. Pearson CA, Pearson D, Shibahara S, Hofsteenge J, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. *Embo J* 1988;7:2977-2982
115. Mackie EJ, Halfter W, Liverani D. Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol* 1988;107:2757-2767
116. Fini ME, Girard MT, Matsubara M. Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. *Acta Ophthalmol Suppl* 1992:26-33
117. Girard MT, Matsubara M, Fini ME. Transforming growth factor-beta and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2441-2454
118. Strissel KJ, Girard MT, West-Mays JA, et al. Role of serum amyloid A as an intermediate in the IL-1 and PMA-stimulated signaling pathways regulating expression of rabbit fibroblast collagenase. *Exp Cell Res* 1997;237:275-287
119. Strissel KJ, Rinehart WB, Fini ME. Regulation of paracrine cytokine balance controlling collagenase synthesis by corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:546-552
120. West-Mays JA, Strissel KJ, Sadow PM, Fini ME. Competence for collagenase gene expression by tissue fibroblasts requires activation of an interleukin 1 alpha autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6768-6772
121. Ye HQ, Azar DT. Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:913-921
122. Ye HQ, Maeda M, Yu FS, Azar DT. Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2894-2899
123. Cintron C, Hassinger LC, Kublin CL, Cannon DJ. Biochemical and ultrastructural changes in collagen during corneal wound healing. *J Ultrastruct Res* 1978;65:13-22
124. Ivarsen A, Laurberg T, Moller-Pedersen T. Role of keratocyte loss on corneal wound repair after LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3499-3506
125. Dohlman CH, Gasset AR, Rose J. The effect of the absence of corneal epithelium or endothelium on the stromal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1968;7:520-534
126. Kitano S, Goldman JN. Cytologic and histochemical changes in corneal wound repair. *Arch Ophthalmol* 1966;76:345-354
127. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:293-309
128. Wilson SE, He YG, Weng J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 1996;62:325-327
129. Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, et al. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci* 1998;1:494-500
130. Weber JT, Rzigalinski BA, Ellis EF. Traumatic injury of cortical neurons causes changes in intracellular calcium stores and capacitative calcium influx. *J Biol Chem* 2001;276:1800-1807
131. Poole CA, Brookes NH, Clover. Confocal imaging of the keratocyte network in porcine cornea using the fixable vital dye 5-chloromethylfluorescein diacetate. *Curr Eye Res* 1996;15:165-174
132. Mohan RR, Liang Q, Kim WJ, et al. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res* 1997;65:575-589
133. Mohan RR, Kim WJ, Wilson SE. Modulation of TNF-alpha-induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kappaB. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1327-1336

134. Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982;89:531-590
135. Müller HJ, Riede UN, Müntefering H, Christ B. Störungen der Vererbung und Entwicklung. In: Riede UN, Schaefer HE eds, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart, New York: Thieme; 1995:308
136. Baldwin HC, Marshall J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: A review. *Acta Ophthalmol Scand* 2002;80:238-247
137. Li DQ, Tseng SC. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol* 1995;163:61-79
138. Yanai R, Yamada N, Kugimiya N, Inui M, Nishida T. Mitogenic and antiapoptotic effects of various growth factors on human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2122-2126
139. Wilson SE, Lloyd SA, He YG. Glucocorticoid receptor and interleukin-1 receptor messenger RNA expression in corneal cells. *Cornea* 1994;13:4-8
140. Kim WJ, Mohan RR, Wilson SE. Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1364-1372
141. Weng J, Mohan RR, Li Q, Wilson SE. IL-1 upregulates keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor mRNA and protein production by cultured stromal fibroblast cells: interleukin-1 beta expression in the cornea. *Cornea* 1997;16:465-471
142. Tran MT, Tellaetxe-Isusi M, Elner V, et al. Proinflammatory cytokines induce RANTES and MCP-1 synthesis in human corneal keratocytes but not in corneal epithelial cells. Beta-chemokine synthesis in corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:987-996
143. Takano Y, Fukagawa K, Shimmura S, et al. IL-4 regulates chemokine production induced by TNF-alpha in keratocytes and corneal epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 1999;83:1074-1076
144. Denk PO, Knorr M. The in vitro effect of platelet-derived growth factor isoforms on the proliferation of bovine corneal stromal fibroblasts depends on cell density. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235:530-534
145. Nishida K, Kinoshita S, Yokoi N, et al. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 latency-associated peptide in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3289-3294
146. Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Corpuz L, Roth MR. Proteoglycan expression during transforming growth factor beta -induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation. *J Biol Chem* 2001;276:44173-44178
147. Jester JV, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Petroll WM. Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. *Cornea* 1996;15:505-516.
148. Sotozono C, Kinoshita S, Kita M, Imanishi J. Paracrine role of keratinocyte growth factor in rabbit corneal epithelial cell growth. *Exp Eye Res* 1994;59:385-391
149. Andresen JL, Ledet T, Ehlers N. Keratocyte migration and peptide growth factors: the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel. *Curr Eye Res* 1997;16:605-613
150. Grant MB, Khaw PT, Schultz GS, Adams JL, Shimizu RW. Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:3292-3301
151. Ohji M, SundarRaj N, Thoft RA. Transforming growth factor-beta stimulates collagen and fibronectin synthesis by human corneal stromal fibroblasts in vitro. *Curr Eye Res* 1993;12:703-709
152. Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986;261:4337-4345
153. Ignatz RA, Endo T, Massague J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1987;262:6443-6446
154. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 1987;105:1039-1045
155. Mauviel A. Transforming growth factor-beta - a key mediator of fibrosis. In: Varga J, Brenner D, Phan SH eds, *Fibrosis research: methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005
156. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, et al. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 2000;19:113-129
157. Klenkler B, Sheardown H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* 2004;79:677-688

158. Ivarsen A, Laurberg T, Møller-Pedersen T. Characterisation of corneal fibrotic wound repair at the LASIK flap margin. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1272-1278
159. Pasquale LR, Dorman-Pease ME, Luttly GA, Quigley HA, Jampel HD. Immunolocalization of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in the anterior segment of the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:23-30
160. Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He YG. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res* 1994;59:63-71
161. Nishida K, Sotozono C, Adachi W, et al. Transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 mRNA expression in human cornea. *Curr Eye Res* 1995;14:235-241
162. Wilson SE, He YG, Lloyd SA. EGF, EGF receptor, basic FGF, TGF beta-1, and IL-1 alpha mRNA in human corneal epithelial cells and stromal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:1756-1765
163. Schiøtz HA. Ein Fall von hochgradigem Hornhautastigmatismus nach Staarextraction: Besserung auf operativem Wege. *Archiv für Augenheilkunde* 1885;15:179-181
164. Lans L. Experimentelle Untersuchungen über Entstehung von Astigmatismus durch nicht perforierende Corneawunden. *Arch Ophthalmol* 1898;45:117-152
165. Durnevv VV. Characteristics of surgical correction of myopia after 16 and 32 peripheral anterior radial non-perforating incisions. Moskau: The Moscow Research Institute of Ocular Microsurgery; 1981:33-35
166. Barraquer JI. Keratomileusis for the correction of myopia. *Arch Soc Am Oftal Optom* 1964;5:27-48
167. Barraquer JI. [Keratomileusis and keratophakia for the correction of congenital hypermetropia and aphakia]. *Bull Mem Soc Fr Ophthalmol* 1983;95:380-390
168. Trokel SL, Srinivasan R, Braren B. Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmol* 1983;96:710-715
169. Seiler T, Wollensak J. In vivo experiments with the excimer laser-technical parameters and healing processes. *Ophthalmologica* 1986;192:65-70
170. L'Esperance FA, Taylor DM, Del Pero RA, et al. Human excimer laser corneal surgery: preliminary report. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1988;86:208-275
171. McDonald MB, Kaufman HE, Frantz JM, et al. Excimer laser ablation in a human eye. Case report. *Arch Ophthalmol* 1989;107:641-642
172. Ruiz L, Rowsey J. In situ keratomileusis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29 (suppl):392
173. Pallikaris IG, Papatzanaki ME, Stathi EZ, Frenschock O, Georgiadis A. Laser in situ keratomileusis. *Lasers Surg Med* 1990;10:463-468
174. Buratto L, Ferrari M, Genisi C. Myopic keratomileusis with the excimer laser: one-year follow up. *Refract Corneal Surg* 1993;9:12-19
175. Kohnen T, Strenger A, Klaproth OK. Basic knowledge of refractive surgery: correction of refractive errors using modern surgical procedures. *Dtsch Arztebl Int* 2008;105:163-172
176. Sakimoto T, Rosenblatt MI, Azar DT. Laser eye surgery for refractive errors. *Lancet* 2006;367:1432-1447
177. Alio JL, Muftuoglu O, Ortiz D, et al. Ten-year follow-up of photorefractive keratectomy for myopia of less than -6 diopters. *Am J Ophthalmol* 2008;145:29-36
178. Alio JL, Muftuoglu O, Ortiz D, et al. Ten-year follow-up of photorefractive keratectomy for myopia of more than -6 diopters. *Am J Ophthalmol* 2008;145:37-45
179. Jackson WB, Casson E, Hodge WG, Mintsoulis G, Agapitos PJ. Laser vision correction for low hyperopia. An 18-month assessment of safety and efficacy. *Ophthalmology* 1998;105:1727-1738
180. Taneri S, Feit R, Azar DT. Safety, efficacy, and stability indices of LASEK correction in moderate myopia and astigmatism. *J Cataract Refract Surg* 2004;30:2130-2137
181. Kalyvianaki MI, Kymionis GD, Kounis GA, et al. Comparison of Epi-LASIK and off-flap Epi-LASIK for the treatment of low and moderate myopia. *Ophthalmology* 2008;115:2174-2180
182. Kohnen T, Bühren J, Kuhne C, Mirshahi A. Wavefront-guided LASIK with the Zyoptix 3.1 system for the correction of myopia and compound myopic astigmatism with 1-year follow-up: clinical outcome and change in higher order aberrations. *Ophthalmology* 2004;111:2175-2185
183. Kohnen T, Meltendorf C, Cichocki M. [LASIK using a scanning spot excimer laser for the treatment of myopia and myopic astigmatism 3-Jahresergebnisse]. *Ophthalmologie* 2005;102:363-368
184. Mrochen M, Hafezi F, Jankov M, Seiler T. [Ablation profiles in corneal laser surgery. Current and future concepts]. *Ophthalmologie* 2006;103:175-183

185. Mrochen M, Eldine MS, Kaemmerer M, Seiler T, Hutz W. Improvement in photorefractive corneal laser surgery results using an active eye-tracking system. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:1000-1006
186. Settas G, Settas C, Minos E, Yeung IY. Photorefractive keratectomy (PRK) versus laser assisted in situ keratomileusis (LASIK) for hyperopia correction. *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD007112
187. Shortt AJ, Allan BD. Photorefractive keratectomy (PRK) versus laser-assisted in-situ keratomileusis (LASIK) for myopia. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD005135
188. Alio JL, Ortiz D, Muftuoglu O, Garcia MJ. Ten years after photorefractive keratectomy (PRK) and laser in situ keratomileusis (LASIK) for moderate to high myopia (control-matched study). *Br J Ophthalmol* 2009;93:1313-1318
189. Melki SA, Azar DT. LASIK complications: etiology, management, and prevention. *Surv Ophthalmol* 2001;46:95-116
190. Bühren J, Baumeister M, Kohnen T. Diffuse lamellar keratitis after laser in situ keratomileusis imaged by confocal microscopy. *Ophthalmology* 2001;108:1075-1081
191. Alio JL, Perez-Santonja JJ, Tervo T, et al. Postoperative inflammation, microbial complications, and wound healing following laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 2000;16:523-538
192. Smith RJ, Maloney RK. Diffuse lamellar keratitis. A new syndrome in lamellar refractive surgery. *Ophthalmology* 1998;105(9):1721-1726
193. Dayanir V, Azar DT. LASIK Complications. In: Yanoff M, Duker JS eds, *Ophthalmology*. 2nd Edition ed: Mosby; 2004
194. Landau D, Levy J, Solomon A, et al. Traumatic corneal flap dislocation one to six years after LASIK in nine eyes with a favorable outcome. *J Refract Surg* 2006;22:884-889
195. Farah SG, Azar DT, Gurdal C, Wong J. Laser in situ keratomileusis: literature review of a developing technique. *J Cataract Refract Surg* 1998;24:989-1006
196. Knorz MC. Flap and interface complications in LASIK. *Curr Opin Ophthalmol* 2002;13:242-245
197. Wang MY, Maloney RK. Epithelial ingrowth after laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2000;129:746-751
198. Helena MC, Meisler D, Wilson SE. Epithelial growth within the lamellar interface after laser in situ keratomileusis (LASIK). *Cornea* 1997;16:300-305
199. Garg P, Bansal AK, Sharma S, Vemuganti GK. Bilateral infectious keratitis after laser in situ keratomileusis: a case report and review of the literature. *Ophthalmology* 2001;108:121-125
200. Chang MA, Jain S, Azar DT. Infections following laser in situ keratomileusis: an integration of the published literature. *Surv Ophthalmol* 2004;49:269-280
201. Sridhar MS, Garg P, Bansal AK, Sharma S. Fungal keratitis after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:613-615
202. Sugar A. Ultrafast (femtosecond) laser refractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2002;13:246-249
203. Hammer M, Schweitzer D, Ziegler W, Wiechmann M, Strobel J. [Intrastromal refractive surgery with ultra-short laser pulses. Results from initial in vitro experiments]. *Ophthalmologie* 2002;99:756-760
204. Loesel FH, Cosar B, Gokar S, et al. *Refractive Surgical Applications of Femtosecond Lasers*. 2nd Edition ed. Berlin, New York: Springer; 2004
205. Mian SI, Shtein RM. Femtosecond laser-assisted corneal surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2007;18:295-299
206. Dausinger F, Nolte S. *Introduction to Femtosecond Technology*. Berlin Heidelberg: Springer; 2004
207. Geisler R. *Untersuchungen zur laserinduzierten Kavitation mit Nanosekunden- und Femtosekundenlasern*. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultäten. Göttingen: Georg-August-Universität; 2003
208. Heisterkamp A, Ripken T, Lutkefels E, et al. [Optimizing laser parameters for intrastromal incision with ultra-short laser pulses]. *Ophthalmologie* 2001;98:623-628
209. Bille JF. *Laser-Gewebe-Wechselwirkungen*. In: Bille JF, Schlegel W eds, *Medizinische Physik 3: Medizinische Laserphysik*. Berlin Heidelberg: Springer; 2005
210. Habib MS, Speaker MG, Schnatter WF. Mass spectrometry analysis of the by-products of intrastromal photorefractive keratectomy. *Ophthalmic Surg Lasers* 1995;26:481-483
211. Niemi M. *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications*. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer; 1996

212. Soong HK, Malta JB. Femtosecond lasers in ophthalmology. *Am J Ophthalmol* 2009;147:189-197
213. Taboada J. Micron sized laser supported plasma effect applied to microsurgery. *Proc Ophthalmol Technol II SPIE* 1992:72-78
214. Niemz M, Hoppeler T, Juhasz T, Bille J. Intrastromal ablations for refractive corneal surgery using picosecond infrared laser pulses. *Lasers Light Ophthalmol* 1993;5:149-155
215. Lubatschowski H, Maatz G, Heisterkamp A, et al. Application of ultrashort laser pulses for intrastromal refractive surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:33-39
216. Meltendorf C, Schroeter J, Bug R, Kohnen T, Deller T. Corneal Trephination With the Femtosecond Laser. *Cornea* 2006;25:1090-1092
217. Slade SG. Applications for the femtosecond laser in corneal surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2007;18:338-341
218. Mosca L, Fasciani R, Tamburelli C, et al. Femtosecond laser-assisted lamellar keratoplasty: early results. *Cornea* 2008;27:668-672
219. Yoo SH, Kymionis GD, Koreishi A, et al. Femtosecond laser-assisted sutureless anterior lamellar keratoplasty. *Ophthalmology* 2008;115:1303-1307
220. Soong HK, Mian S, Abbasi O, Juhasz T. Femtosecond laser-assisted posterior lamellar keratoplasty: initial studies of surgical technique in eye bank eyes. *Ophthalmology* 2005;112:44-49
221. Mian SI, Soong HK, Patel SV, Ignacio T, Juhasz T. In vivo femtosecond laser-assisted posterior lamellar keratoplasty in rabbits. *Cornea* 2006;25:1205-1209
222. Cheng YY, Schouten JS, Tahzib NG, et al. Efficacy and safety of femtosecond laser-assisted corneal endothelial keratoplasty: a randomized multicenter clinical trial. *Transplantation* 2009;88:1294-1302
223. Ertan A, Kamburoglu G, Bahadir M. Intacs insertion with the femtosecond laser for the management of keratoconus: one-year results. *J Cataract Refract Surg* 2006;32:2039-2042
224. Rabinowitz YS, Li X, Ignacio TS, Maguen E. INTACS inserts using the femtosecond laser compared to the mechanical spreader in the treatment of keratoconus. *J Refract Surg* 2006;22:764-771
225. Bahar I, Levinger E, Kaiserman I, Sansanayudh W, Rootman DS. IntraLase-enabled astigmatic keratotomy for postkeratoplasty astigmatism. *Am J Ophthalmol* 2008;146:897-904
226. Hoffart L, Proust H, Matonti F, Conrath J, Ridings B. Correction of postkeratoplasty astigmatism by femtosecond laser compared with mechanized astigmatic keratotomy. *Am J Ophthalmol* 2009;147:779-787
227. Lubatschowski H. Overview of commercially available femtosecond lasers in refractive surgery. *J Refract Surg* 2008;24:102-107
228. Troutman RC, Veronneau-Troutman S, Jakobiec FA, Krebs W. A new laser for collagen wounding in corneal and strabismus surgery: a preliminary report. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1986;84:117-132
229. Habib MS, Speaker MG, Kaiser R, Juhasz T. Myopic intrastromal photorefractive keratectomy with the neodymium-yttrium lithium fluoride picosecond laser in the cat cornea. *Arch Ophthalmol* 1995;113:499-505
230. Sletten KR, Yen KG, Sayegh S, et al. An in vivo model of femtosecond laser intrastromal refractive surgery. *Ophthalmic Surg Lasers* 1999;30:742-749
231. Ratkay-Traub I, Ferincz IE, Juhasz T, Kurtz RM, Krueger RR. First clinical results with the femtosecond neodymium-glass laser in refractive surgery. *J Refract Surg* 2003;19:94-103
232. Sekundo W, Kunert K, Russmann C, et al. First efficacy and safety study of femtosecond lenticule extraction for the correction of myopia: six-month results. *J Cataract Refract Surg* 2008;34:1513-1520
233. Holzer MP, Mannsfeld A, Ehmer A, Auffarth GU. Early outcomes of INTRACOR femtosecond laser treatment for presbyopia. *J Refract Surg* 2009;25:855-861
234. Ruiz LA, Cepeda LM, Fuentes VC. Intrastromal correction of presbyopia using a femtosecond laser system. *J Refract Surg* 2009;25:847-854
235. Habib MS, Speaker MG, McCormick SA, Kaiser R. Wound healing following intrastromal photorefractive keratectomy with the Nd:YLF picosecond laser in the cat. *J Refract Surg* 1995;11:442-447
236. Meltendorf C, Burbach GJ, Bühren J, et al. Corneal femtosecond laser keratotomy results in isolated stromal injury and favorable wound-healing response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2068-2075
237. Dawson DG, Edelhauser HF, Grossniklaus HE. Long-term histopathologic findings in human corneal wounds after refractive surgical procedures. *Am J Ophthalmol* 2005;139:168-178
238. Jester JV, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res* 2003;77:581-592

239. Funderburgh JL, Mann MM, Funderburgh ML. Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure: a role for fibroblasts in corneal fibrosis. *J Biol Chem* 2003;278:45629-45637
240. Pei Y, Sherry DM, McDermott AM. Thy-1 distinguishes human corneal fibroblasts and myofibroblasts from keratocytes. *Exp Eye Res* 2004;79:705-712
241. Koumas L, Smith TJ, Feldon S, Blumberg N, Phipps RP. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. *Am J Pathol* 2003;163:1291-1300
242. Nakamura K, Kurosaka D, Yoshino M, Oshima T, Kurosaka H. Injured corneal epithelial cells promote myodifferentiation of corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2603-2608
243. Vogel A, Gunther T, Asiy-Vogel M, Birngruber R. Factors determining the refractive effects of intrastromal photorefractive keratectomy with the picosecond laser. *J Cataract Refract Surg* 1997;23:1301-1310
244. Vogel A, Gunther T, Asiy-Vogel M, Birngruber R. [Studies of the development of refractive effects in intrastromal refractive corneal surgery with the picosecond laser]. *Ophthalmologie* 1997;94:467-474
245. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101-1108
246. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006;7:85
247. Netto MV, Mohan RR, Sinha S, et al. Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK. *Exp Eye Res* 2006;82:788-797
248. Møller-Pedersen T. On the structural origin of refractive instability and corneal haze after excimer laser keratectomy for myopia. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 2003;1-20
249. Esquenazi S, He J, Bazan NG, Bazan HE. Comparison of corneal wound-healing response in photorefractive keratectomy and laser-assisted subepithelial keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2005;31:1632-1639
250. Nakamura K, Kurosaka D, Bissen-Miyajima H, Tsubota K. Intact corneal epithelium is essential for the prevention of stromal haze after laser assisted in situ keratomileusis. *Br J Ophthalmol* 2001;85:209-213.
251. Miyamoto T, Saika S, Yamanaka A, et al. Wound healing in rabbit corneas after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2003;29:153-158
252. Phan SH. Fibroblast phenotypes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:87-92
253. Derdak S, Penney DP, Keng P, et al. Differential collagen and fibronectin production by Thy 1+ and Thy 1- lung fibroblast subpopulations. *Am J Physiol* 1992;263:283-290
254. Wachtlin J, Langenbeck K, Schründer S, Zhang EP, Hoffmann F. Immunohistology of corneal wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 1999;15:451-458
255. Perez-Santonja JJ, Linna TU, Tervo KM, et al. Corneal wound healing after laser in situ keratomileusis in rabbits. *J Refract Surg* 1998;14:602-609
256. Zieske JD, Higashijima SC, Spurr-Michaud SJ, Gipson IK. Biosynthetic responses of the rabbit cornea to a keratectomy wound. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1668-1677
257. van Setten GB, Koch JW, Tervo K, et al. Expression of tenascin and fibronectin in the rabbit cornea after excimer laser surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1992;30:178-183
258. Bullard KM, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal wound healing: current biology. *World J Surg* 2003;27:54-61
259. Ivarsen A, Møller-Pedersen T. LASIK induces minimal regrowth and no haze development in rabbit corneas. *Curr Eye Res* 2005;30:363-373
260. Donaldson DJ, Mahan JT, Yang H, Crossin KL. Tenascin localization in skin wounds of the adult newt *Notophthalmus viridescens*. *Anat Rec* 1991;230:451-459
261. Wilson SE, Li Q, Weng J, et al. The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1582-1592
262. Kim JY, Kim MJ, Kim TI, et al. A femtosecond laser creates a stronger flap than a mechanical microkeratome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:599-604
263. Wilson SE, Mohan RR, Hutcheon AE, et al. Effect of ectopic epithelial tissue within the stroma on keratocyte apoptosis, mitosis, and myofibroblast transformation. *Exp Eye Res* 2003;76:193-201
264. Bilgihan K, Bilgihan A, Adiguzel U, et al. Keratocyte apoptosis and corneal antioxidant enzyme activities after refractive corneal surgery. *Eye* 2002;16:63-68
265. Zhou M, Li XM, Lavker RM. Transcriptional profiling of enriched populations of stem cells versus transient amplifying cells. A comparison of limbal and corneal epithelial basal cells. *J Biol Chem* 2006;281:19600-19609

266. Tuli SS, Liu R, Chen C, et al. Immunohistochemical localization of EGF, TGF-alpha, TGF-beta, and their receptors in rat corneas during healing of excimer laser ablation. *Curr Eye Res* 2006;31:709-719
267. Kaji Y, Soya K, Amano S, Oshika T, Yamashita H. Relation between corneal haze and transforming growth factor-beta1 after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:1840-1846
268. Van Obberghen-Schilling E, Roche NS, Flanders KC, Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem* 1988;263:7741-7746
269. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349-363
270. Zhang ZY, Chu RY, Zhou XT, et al. Morphologic and histopathologic changes in the rabbit cornea produced by femtosecond laser-assisted multilayer intrastromal ablation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2147-2153
271. Meltendorf C, Burbach GJ, Ohrloff C, Ghebremedhin E, Deller T. Intrastromal keratotomy with femtosecond laser avoids profibrotic TGF-beta1 induction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3688-3695
272. Meltendorf C, Deller T, Ackermann H, von Pape U. Corneal intrastromal tissue modeling with the femtosecond laser. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:1661-1666

## 9 THESEN

- 1) Eine Applikation von fs-Laser-Pulsen im Hornhautstroma ist ohne Verletzung des Epithels möglich.
- 2) Bei selektiver intrastromaler Läsionierung bleibt eine Induktion des Fibrosemarkers TGF- $\beta$ 1 aus.
- 3) Die Technik der LMD mit nachfolgender Durchführung einer quantitativen RT-PCR ermöglicht eine schichtenspezifische Quantifizierung der Gen-Expression in allen Hornhautschichten.
- 4) TGF- $\beta$ 1 wird in allen Schichten der Hornhaut exprimiert. Im Vergleich zum Endothel und Stroma wird im Epithel die geringste Menge an TGF- $\beta$ 1-mRNA exprimiert.
- 5) Die Transdifferenzierung von Keratozyten in Thy-1- oder  $\alpha$ -SMA-positive Fibroblasten bleibt nach einer Verletzung des Stromas aus, wenn es nicht gleichzeitig zu einem Epitheldefekt der Hornhaut kommt.
- 6) Thy-1 ist geeignet, Fibroblasten nach kornealer Verletzung in vivo nachzuweisen.
- 7) Die Expression provisorischer ECM erfordert keine Transdifferenzierung der Keratozyten in Myofibroblasten.
- 8) Der Transparenzerhalt der Hornhaut nach isolierter intrastromaler Keratotomie ist auf die Ausbildung einer hypozellulären intrastromalen Narbe zurückzuführen.

- 9) Nach isolierter intrastromaler Keratotomie bleibt eine Infiltration der Hornhaut mit Entzündungszellen aus.
- 10) Eine Epithelverletzung ist keine notwendige Voraussetzung für die Apoptose von Keratozyten bei einer Hornhautverletzung.
- 11) Mittels fs-Laser-assistierter intrastromaler Gewebeablation kann eine klinisch relevante Abnahme der zentralen Hornhautdicke erreicht werden.
- 12) Die intrastromale Ablation führt zu einer reproduzierbaren und stabilen Änderung der kornealen Krümmungsradien.

---

## TABELLARISCHER LEBENS LAUF

<b>Name, Vornamen</b>	Meltendorf, Christian Gerhard Ulrich
<b>Akademischer Grad</b>	Dr. med.
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Geburtsdatum, -ort</b>	12.10.1972, Berlin
<b>Familienstand</b>	verheiratet
<b>Religion</b>	evangelisch
<b>Schulbildung</b>	1979-1983 Ev. Grundschule Steglitz (Berlin) 1983-1985 Grundschule unter den Kastanien (Berlin) 1985-1992 Lilienthal-Oberschule (Berlin) Schulabschluß: Abitur 1992
<b>Zivildienst</b>	1992-1993 als Krankenpflegehelfer im Auguste-Viktoria-Krankenhaus (Berlin)
<b>Studium</b>	1993-1995 Studium der Humanmedizin an der Universität Göttingen 1995-1996 Fortsetzung des Studiums an der Technischen Universität Dresden 1996-2000 Fortsetzung und Abschluß des Studiums an der Freien Universität Berlin
<b>Promotion</b>	2001, Freie Universität Berlin Dissertation: „Vitrifikation von Hornhautlamellen“ Prädikat: Summa cum laude Referent: Prof. Dr. F. Hoffmann

## TABELLARISCHER LEBENSLAUF

---

**Klinischer Werdegang**      2001-2002 Arzt im Praktikum an der  
Universitäts-Augenklinik Frankfurt am Main  
2002-2008 Assistenzarzt an der  
Universitäts-Augenklinik Frankfurt am Main  
seit 2008 Oberarzt an der  
Universitätsklinik für Augenheilkunde Halle (Saale)

**Forschungsstipendium**      2004-2006 Gastwissenschaftler am  
Institut für klinische Neuroanatomie,  
Universität Frankfurt am Main  
Betreuer: Prof. Dr. Th. Deller; PD Dr. G. Burbach

---

## DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Deller, Direktor des Instituts für klinische Neuroanatomie der Goethe-Universität Frankfurt am Main, für seine Bereitschaft, mich als Gastwissenschaftler an dem von ihm geleiteten Institut aufzunehmen. In allen Belangen des wissenschaftlichen Arbeitens habe ich von ihm als akademischem Lehrer stets große Unterstützung erfahren.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Ohrloff, Direktor des Zentrums der Augenheilkunde der Goethe-Universität Frankfurt am Main, möchte ich mich besonders für die Hilfestellungen bei der finanziellen Forschungsförderung und der Wahl des Forschungslabors sowie für die zahlreichen, meine Arbeit fördernden Gespräche bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Gert Struck, Universitätsklinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, möchte ich für seine Unterstützung als akademischer Mentor während meines Habilitationsverfahrens sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. Guido Burbach, der mir als stets hilfsbereiter wissenschaftlicher Mentor am Institut für klinische Neuroanatomie der Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Seite gestanden hat.

Herrn Dr. Jan Schroeter, Klinik für Augenheilkunde, Charité - Universitätsmedizin Berlin bin ich für die jahrelange wissenschaftliche und klinische Zusammenarbeit zutiefst dankbar.

Herrn PD Dr. Christian Müller, Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main, danke ich für die vielen fruchtbaren Gespräche und die zahlreichen Denkanstöße während unserer gemeinsamen Zeit im Labor.

## DANKSAGUNG

---

Ebenso gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Friedrich Hoffmann, der während meiner Studienzeit mein Interesse für wissenschaftliche Fragestellungen geweckt, mich stets wissenschaftlich unterstützt und gefördert hat.

Nur durch die tatkräftige Unterstützung der Firma 20/10 Perfect Vision (Heidelberg) und ihrer Mitarbeiter Dr. Ulrich von Pape, Tobias Kuhn, Klaus Baumeister und Dr. Frieder Loesel ist die Durchführung der laser-chirurgischen Eingriffe ermöglicht worden. Dafür bedanke ich mich sehr.

Herrn Dr. Hanns Ackermann aus dem Institut für Biostatistik und mathematische Modellierung der Goethe-Universität Frankfurt am Main, sowie Herrn PD Dr. Estifanos Ghebremedhin, School of Biomedical Sciences, The University of Queensland, danke ich für die intensive Unterstützung bei statistischen Analysen.

Frau Charlotte Nolte-Uhl und Frau Lyudmyla Rudnyeva aus dem Labor des Instituts für klinische Neuroanatomie gilt mein Dank für ihre zahlreichen Hilfestellungen während der experimentellen Laborarbeit.