

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Gerd Geerling

***Corneal Crosslinking* unter hyperbaren
Bedingungen: Verbesserter Behandlungseffekt bei
Keratokonus?**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jule Schmiedel
(2022)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Johannes Menzel-Severing

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Johannes Schneppendahl

Zusammenfassung

Der Keratokonus ist eine Erkrankung der Cornea, die durch fortschreitende Ausdünnung und kegelförmige Verformung zu einem Astigmatismus und Myopie führt. *Corneal Crosslinking* (CXL) wird zur Behandlung des Keratokonus eingesetzt und soll die Progression aufhalten. Bei der CXL-Reaktion stellt Sauerstoff einen limitierenden Faktor dar. Durch ein verbessertes Sauerstoffangebot könnte möglicherweise die Effektivität des CXL erhöht werden und damit auch die Wirksamkeit modifizierter CXL-Protokolle, wie transepitheliales CXL, verbessert werden.

Die vorliegende Studie soll klären, ob durch zusätzlichen Sauerstoff und/oder hyperbare Bedingungen die intrastromale Sauerstoffkonzentration während CXL erhöht werden kann und ob dies zu einer verbesserten Effektivität des CXL führt.

Dafür wurde in porzinen Corneae ($n = 40$) mittels Oxymeter mit Nadelmikrosensor in 230 μm Tiefe der Verlauf der Sauerstoffkonzentration während CXL gemessen. Es wurde ein akzeleriertes CXL-Protokoll mit 0,1 %igem Riboflavin und einer UVA-Intensität von 9 mW/cm^2 für 10 Minuten verwendet. Die Experimente wurden unter normobaren und hyperbaren (2,4 bar) Bedingungen jeweils mit (> 95 %) und ohne (21 %) zusätzlichen Sauerstoff durchgeführt. Je Behandlungsgruppe wurden 10 porzine Corneae untersucht. Im Anschluss wurde die Effektivität des CXL durch die Resistenz gegen den Abbau durch Collagenase A geprüft und zur Testung der biomechanischen Veränderungen eine Druck- und Zugprüfung mittels Materialprüfmaschine durchgeführt.

Die Sauerstoffkonzentrationen vor Beginn der UVA-Bestrahlung lagen im Mittel in der normobaren Behandlungsgruppe ohne zusätzlichen Sauerstoff (CXL_{norm}) bei 11 % ($\pm 1,4$ %), normobar mit Sauerstoff (CXL_{norm} + O₂) bei 37 % ($\pm 9,4$ %), in der hyperbaren Behandlungsgruppe ohne zusätzlichen Sauerstoff (CXL_{hyp}) bei 13 % ($\pm 1,9$ %) und mit Sauerstoff (CXL_{hyp} + O₂) bei 43 % (± 4 %). Nach Beginn der UVA-Bestrahlung sank die Sauerstoffkonzentration in der Gruppe CXL_{norm} innerhalb weniger Sekunden auf 1,5 %, in der Gruppe CXL_{hyp} innerhalb von 1 Minute auf 3 % und in der Gruppe CXL_{norm} + O₂ innerhalb von 3 Minuten auf 21 %. In der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ sank die Sauerstoffkonzentration nur sehr langsam und erreichte nach 3 Minuten den Wert von 38 %. Sowohl die Ergebnisse der enzymatischen Testung als auch der biomechanischen Testung konnten keinen Vorteil der erhöhten intrastromalen Sauerstoffkonzentration nachweisen. Allerdings lässt sich aufgrund verschiedener Limitationen der Methodik keine abschließende Aussage über die Bedeutung einer höheren Sauerstoffverfügbarkeit für die Effektivität des CXL treffen. Die Studie konnte zeigen, dass durch hyperbare Bedingungen mit zusätzlicher Sauerstoffgabe die intrastromale Sauerstoffkonzentration in porzinen Corneae während CXL deutlich erhöht werden und während der UVA-Bestrahlung eine annähernd konstante Sauerstoffverfügbarkeit gewährleistet werden kann. Ob dadurch die Effektivität des CXL erhöht werden kann, ist durch die hier erhobenen Daten nicht endgültig zu beantworten. Es bedarf weiterer Studien mit angepassten Nachweismethoden, um den Einfluss der erhöhten intrastromalen Sauerstoffkonzentration auf die Effektivität des CXL zu erforschen.

Abstract

Keratoconus is a corneal disease that results in astigmatism and myopia due to progressive thinning and cone-shaped deformation. *Corneal crosslinking* (CXL) is used to treat keratoconus and is intended to halt progression. Oxygen is a limiting factor in the CXL reaction. Improved oxygen supply could potentially increase the efficacy of CXL, and modified CXL protocols, such as transepithelial CXL, could also show improved efficacy.

The present study aims to clarify, whether supplemental oxygen and/or hyperbaric conditions can increase the intrastromal oxygen concentration during CXL and whether this leads to improved CXL efficacy.

For this purpose, the oxygen concentration during CXL was measured in porcine corneae ($n = 40$) using an oxymeter with a needle microsensor at a depth of $230\ \mu\text{m}$. An accelerated CXL protocol with $0.1\ \%$ riboflavin and a UVA intensity of $9\ \text{mW}/\text{cm}^2$ for 10 minutes was used. Experiments were performed under normobaric and hyperbaric (2.4 bar) conditions with ($> 95\ \%$) and without ($21\ \%$) supplemental oxygen. For each treatment group, 10 porcine corneae were examined. Subsequently, the efficacy of CXL was tested by resistance to degradation by collagenase A, and compression and tensile testing was performed using a material testing machine to test biomechanical changes.

Oxygen concentrations before the start of UVA irradiation were approximately $11\ \%$ ($\pm 1.4\%$) in the normobaric treatment group without supplemental oxygen (CXL_{norm}), $37\ \%$ ($\pm 9.4\ \%$) in normobaric with oxygen (CXL_{norm} + O₂), 13% ($\pm 1.9\ \%$) in the hyperbaric treatment group without supplemental oxygen (CXL_{hyp}), and $43\ \%$ ($\pm 4\ \%$) with oxygen (CXL_{hyp} + O₂). After the start of UVA irradiation, the oxygen concentration decreased to $1.5\ \%$ in the CXL_{norm} group within a few seconds, to $3\ \%$ in the CXL_{hyp} group within 1 minute, and to $21\ \%$ in the CXL_{norm} + O₂ group within 3 minutes. In the CXL_{hyp} + O₂ group, the oxygen concentration decreased very slowly and reached the value of $38\ \%$ after 3 minutes. Both the results of enzymatic testing and biomechanical testing failed to demonstrate any benefit of increased intrastromal oxygen concentration. However, due to various limitations of the method, no conclusive statement can be made regarding the importance of increased oxygen availability on CXL effectiveness.

This study was able to demonstrate that hyperbaric conditions with supplemental oxygen can significantly increase the intrastromal oxygen concentration in porcine corneae during CXL and provide approximately constant oxygen availability during UVA irradiation. Whether this may increase the efficacy of CXL cannot be definitively answered by the data collected here. Further studies with adapted detection methods are needed to investigate the influence of the increased intrastromal oxygen concentration on the efficacy of CXL.

Abkürzungsverzeichnis

BAC	Benzalkoniumchlorid
CRF	<i>Corneal Resistance Factor</i>
CXL	<i>Corneal Crosslinking</i>
DALK	Tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eage'l's Medium</i>
Epi-Off-CXL	CXL mit entferntem Epithel
Epi-On-CXL	Transepitheliales CXL
HBO	Hyperbare Oxygenierung
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
i.d.R.	In der Regel
ORA	<i>Ocular Response Analyzer</i>
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
pKPL	Perforierende Keratoplastik
TMS-5	<i>Topographic Modeling System</i>
SD	Standardabweichung
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
°C	Grad Celsius
h	Stunde
l	Liter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mW/cm²	Milliwatt pro Quadratcentimeter
Pa	Pascal
s	Sekunden
U	Units
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Keratokonus.....	1
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Histopathologie.....	3
1.1.3 Krankheitsstadien und Diagnostik	4
1.1.4 Therapieoptionen	6
1.2 <i>Corneal Crosslinking</i>	8
1.2.1 Dresden-Protokoll.....	8
1.2.2 Modifizierte CXL-Protokolle	11
1.2.2.1 Akzeleriertes CXL	11
1.2.2.2 Transepitheliales CXL.....	13
1.2.2.3 Protokolle mit veränderter Sauerstoffkonzentration.....	14
1.3 Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Untersuchungsmaterial.....	18
2.2 Studienplan	18
2.3 Sauerstoffdruckkammer	19
2.4 Versuchsaufbau	19
2.5 Intrastromale Sauerstoffmessung	21
2.6 <i>Corneal Crosslinking</i>	22
2.7 Enzymatische Testung	23
2.8 Biomechanische Testung	24
2.9 Statistische Auswertung	25
3 Ergebnisse	27
3.1 Intrastromale Sauerstoffmessung	27

3.2	Enzymatische Testung	28
3.3	Biomechanische Testung	32
3.3.1	Druckprüfung	32
3.3.2	Zugprüfung	34
4	Diskussion	36
4.1	Erhöhung der intrastromalen Sauerstoffkonzentration	36
4.2	Effektivität des <i>Corneal Crosslinkings</i>	39
4.2.1	Enzymatische Stabilität	39
4.2.2	Biomechanische Stabilität	42
4.2.2.1	Druckprüfung	42
4.2.2.2	Zugprüfung	43
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblick	45
	Literatur-und Quellenverzeichnis	47
	Danksagung	52

1 Einleitung

1.1 Keratokonus

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Der Begriff Keratokonus setzt sich aus den griechischen Wörtern *Kerato* (Hornhaut) und *Konos* (Kegel) zusammen und bezeichnet eine meist bilateral asymmetrisch auftretende Erkrankung der Hornhaut (Romero-Jiménez et al., 2010). Es handelt sich um eine nicht entzündliche, progrediente Erkrankung, bei der es im Verlauf zur irreversiblen Ausdünnung des kornealen Stromas und zur kegelförmigen Vorwölbung der Cornea kommt (Krachmer et al., 1984). In Abb. 1 ist diese Vorwölbung deutlich zu erkennen.

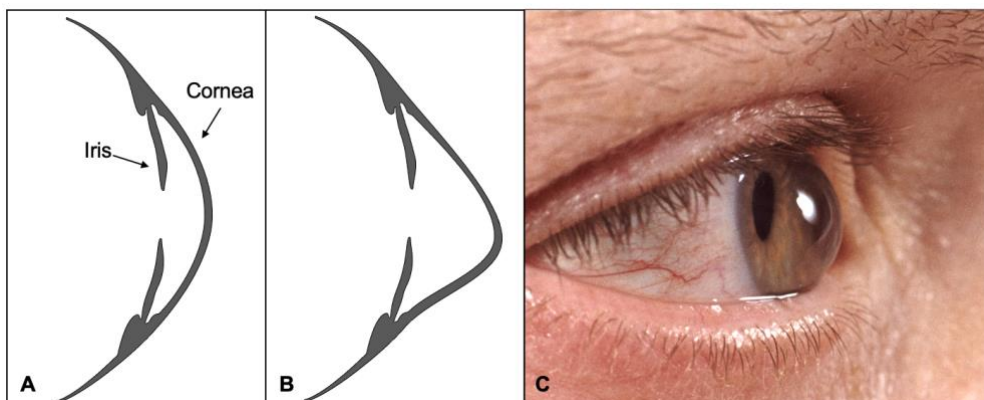


Abb. 1: Keratokonus. Schematische Abbildung einer Cornea in physiologischem Zustand (A) und mit Keratokonus (B); Foto eines rechten Auges mit Keratokonus (C) (Elektronisches Bildarchiv des Berufsverbandes der Augenärzte e. V., mit freundlicher Genehmigung von Dr. L. Wollring und des BVA).

Frühe Stadien des Keratokonus können nahezu symptomlos verlaufen und nur durch spezielle Diagnostik, beispielsweise mittels Hornhauttopografie, detektiert werden. Später kommt es mit ausgeprägter Myopie und fortschreitendem Astigmatismus zu einer Verschlechterung des Visus (Rabinowitz, 1998; Romero-Jiménez et al., 2010). Der Keratokonus tritt meist im zweiten Lebensjahrzehnt, während der Pubertät, auf und verläuft bis zum 30. bis 40. Lebensjahr progredient (Rabinowitz, 1998). Tuft et al. konnten zeigen, dass neben einem jungen Alter bei Erstdiagnose und der ethnischen Zugehörigkeit, insbesondere die Visusverschlechterung und das Ausmaß der

Hornhautverkrümmung Einfluss auf die Progression der Erkrankung haben (Tuft et al., 1994).

Die berichteten Inzidenzzahlen variieren je nach Quelle, wahrscheinlich bedingt durch uneinheitliche Diagnosekriterien. Die geschätzte Inzidenz liegt ungefähr bei 1:2000 (Krachmer et al., 1984; Rabinowitz, 1998). Betroffen sind alle Ethnien sowie beide Geschlechter, wobei unklar bleibt inwieweit Unterschiede zwischen Männern und Frauen bestehen (Romero-Jiménez et al., 2010). Es liegen sowohl Studien vor, die eine erhöhte Prävalenz bei Männern gefunden haben (Wagner et al., 2007), als auch Publikationen, die zeigen, dass die Prävalenz bei Frauen größer ist (Krachmer et al., 1984) oder eine Gleichverteilung vorliegt (Grünauer-Kloevekorn & Duncker, 2006).

Eine Vielzahl von möglichen Faktoren wird als Ursache für den Keratokonus diskutiert, allerdings ist die Ätiologie noch nicht abschließend geklärt. Die Genese der Erkrankung ist wahrscheinlich multifaktoriell, wobei biochemische, genetische und mechanische Faktoren in Betracht gezogen werden (Romero-Jiménez et al., 2010). Die Ausdünnung des kornealen Stromas wird möglicherweise durch eine erhöhte Konzentration an proteolytischen Enzymen und eine verminderte Anzahl an Proteaseinhibitoren verursacht (Rabinowitz, 1998; Romero-Jiménez et al., 2010). Mackiewicz et al. konnten zeigen, dass in von Keratokonus betroffenen Hornhäuten verschiedene Enzyme, wie Matrixmetalloproteinasen, im Vergleich zu gesunden Hornhäuten, deutlich überexprimiert werden (Mackiewicz et al., 2006). Außerdem weisen erhöhte Telozeptid-Level im Tränenfilm von Patienten mit Keratokonus auf ein verstärkte Proteolyse des Kollagens hin (Abalain et al., 2000).

Eine familiäre Häufung von 5 bis 20 % macht einen Einfluss der Genetik sehr wahrscheinlich (Kohlhaas, 2008). Die meisten Autoren gehen von einem autosomal-dominanten Erbgang mit unterschiedlicher phänotypischer Ausprägung aus. Außerdem weisen Untersuchungen bei monozygoten Zwillingen auf eine starke genetische Komponente hin (Edwards et al., 2001). Bisher wurden verschiedene Genloci identifiziert, die möglicherweise mit der Entstehung des Keratokonus assoziiert sind (Davidson et al., 2014; Romero-Jiménez et al., 2010). Zahlreiche Syndrome und Erkrankungen wurden mit dem Keratokonus in Zusammenhang gebracht. Beispielsweise haben Menschen mit Trisomie 21 ein deutlich erhöhtes Risiko an Keratokonus zu erkranken, wobei keine Beteiligung des Chromosoms 21 nachgewiesen werden konnte (Edwards et al., 2001; Grünauer-Kloevekorn & Duncker, 2006). Des Weiteren werden systemische Kollagenerkrankungen, wie das Ehler-Danlos-Syndrom, retinale Erkrankungen, wie die Lebersche kongenitale Amaurose

und das Vorkommen eines Mitralklappenprolaps in Assoziation mit dem Auftreten eines Keratokonus beobachtet. Aussagen zu den beobachteten Zusammenhängen variieren stark und auf molekulargenetischer Ebene konnte bisher kein Zusammenhang nachgewiesen werden (Grünauer-Kloeve Korn & Duncker, 2006; Rabinowitz, 1998; Romero-Jiménez et al., 2010).

Ob Menschen mit atopischen Erkrankungen vermehrt zu Keratokonus neigen ist ebenfalls noch ungeklärt. Vermutet wird, dass vor allem das vermehrte Augenreiben, beispielsweise bei einer Keratokonjunktivitis, ätiologisch relevant sein könnte (Grünauer-Kloeve Korn & Duncker, 2006; Romero-Jiménez et al., 2010).

Neben exzessivem Augenreiben zählt das Tragen von Kontaktlinsen zu den diskutierten mechanischen Risikofaktoren für den Keratokonus. Es ist jedoch unklar, ob diese Faktoren möglicherweise nur die Progression eines bereits bestehenden Keratokonus fördern (Edwards et al., 2001; Grünauer-Kloeve Korn & Duncker, 2006; Rabinowitz, 1998).

1.1.2 Histopathologie

Duke-Elder definierte 1965 die sieben Zeichen des Keratokonus: Stromale Ausdünnung, Endothelreflex an der Konusspitze, vertikale Linien im Stroma (Vogt'sche Linien), erhöhte Sichtbarkeit der kornealen Nervenfasern, Ferritinablagerung in der epithelialen Basalmembran (Fleischer-Ring), Risse der Descemet-Membran, Risse der Bowman-Membran (Duke-Elder, 1965; Sherwin & Brookes, 2004). Jüngere Publikationen konzentrieren sich auf drei dieser Charakteristika: Ausdünnung des Hornhautstromas, Risse in der Bowman-Membran und Ferritinablagerungen (Krachmer et al., 1984; Rabinowitz, 1998).

Durch die lichtmikroskopische Untersuchung von 49 Hornhäuten mit Keratokonus konnten Fernandes et al. die Prävalenz der einzelnen histologischen Veränderungen genauer feststellen (Fernandes et al., 2008). Am häufigsten beobachteten sie eine Ausdünnung des Epithels (82%), Risse in der Bowman-Membran (71 %), Verdichtung der Kollagenfasern (63 %) und Falten in der Descemet-Membran (63 %). Naderan et al. fanden ebenfalls am häufigsten eine epitheliale Ausdünnung (94,3 %) und Risse der Bowman-Membran (82,9 %) (Naderan et al., 2017). Außerdem wurde durch ihre Untersuchung deutlich, dass typische morphologische Veränderungen vor allem bei fortgeschrittenen Keratokonusstadien gefunden werden.

Es können je nach Krankheitsstadium histopathologische Veränderungen in allen Schichten der Hornhaut beobachtet werden (Rabinowitz, 1998; Sherwin & Brookes,

2004). Neben der häufigen Ausdünnung des Epithels, beschreiben einige Autoren auch Veränderungen in der epithelialen Basalmembran (Rabinowitz, 1998; Sherwin & Brookes, 2004). Rohrbach et al. konnten hingegen zeigen, dass eine Verdickung der Basalmembran nicht spezifisch für einem Keratokonus ist (Rohrbach et al., 2006).

Die stromale Ausdünnung wird durch eine lokal reduzierte Anzahl an Kollagenlamellen verursacht. Dabei bleibt unklar, ob Kollagen abgebaut oder umverteilt wird. Beobachtungen zeigen weniger interlamelläre Adhäsionen und eine verringerte Einflechtung der Lamellen in die Bowman-Membran. Dies weist auf eine Umverteilung durch einen Gleitprozess der Lamellen hin (Davidson et al., 2014). Meek et al. konnten mittels Röntgenstreuexperimenten zeigen, dass die Orientierung der Kollagenlamellen im kornealen Stroma beim Vorliegen eines Keratokonus deutlich gestört ist und dass diese besonders um die Spitze des Konus sehr ungleich verteilt sind (Meek et al., 2005). Durch Untersuchung der stromalen RNA konnten Stachs et al. eine Hoch- und Herunterregulierung verschiedener Komponenten der Extrazellulärmatrix nachweisen. Diese genetischen Veränderungen korrelieren mit den morphologisch nachgewiesenen Veränderungen in der Organisation und Anordnung der Kollagenfibrillen (Stachs et al., 2004).

Bisher bleibt unklar, wieso Falten und Risse in der Descemet-Membran auftreten. Möglicherweise können zusätzliche Faktoren, wie häufiges Augenreiben, zu deren Entstehung beitragen (Sherwin & Brookes, 2004).

1.1.3 Krankheitsstadien und Diagnostik

Es existieren verschiedene Klassifikationssysteme, die den Keratokonus nach Morphologie, Krankheitsverlauf oder basierend auf Topografie-Indizes einteilen (Romero-Jiménez et al., 2010). Eine häufig angewandte Klassifikation ist, die von Amsler et al. entwickelte und von Krumeich et al. modifizierte, Stadieneinteilung. Diese Klassifikation wird in Tabelle 1 gezeigt und teilt die Erkrankung in 4 klinische Stadien nach Refraktion, Narbenbildung und Hornhautradien ein (Belin & Ambrósio, 2013; Krumeich et al., 1998).

Stadium 1	exzentrische Hornhautversteilung induzierte Myopie und/oder Astigmatismus von $\leq 5D$ Hornhautradien $\geq 48D$ Vogt'sche Linien, keine Narben
Stadium 2	induzierte Myopie und/oder Astigmatismus von > 5 bis $\leq 8D$ Hornhautradien $\leq 53D$ keine zentralen Hornhautnarben Hornhautdicke ≥ 400 mm
Stadium 3	induzierte Myopie und/oder Astigmatismus von > 8 bis $\leq 10D$ Hornhautradien $> 53 D$ keine zentralen Hornhautnarben Hornhautdicke 200 – 400 mm
Stadium 4	Refraktion nicht messbar Hornhautradien $> 55D$ zentrale Narben Hornhautdicke ≥ 200 mm

Tabelle 1: Klinische Stadieneinteilung des Keratokonus nach Amsler-Krumeich (Krumeich et al., 1998)

Zu den typischen klinischen Zeichen des Keratokonus, die in der Spaltlampenuntersuchung sichtbar werden, gehören Vogt'sche Linien und Eisenablagerungen (Fleischer-Ring). Im vorderen Stroma können sich Narben zeigen und durch Risse in der Descemet-Membran kann es durch das Aufquellen des kornealen Stromas auch zu einem akuten Hydrops kommen (Bühren et al., 2011; Grünauer-Kloevekorn & Duncker, 2006).

Einfache Untersuchungsmethoden bei Verdacht auf Keratokonus sind die manuelle Keratometrie, die jedoch nicht spezifisch ist, und die sensitive Strichskiaskopie, bei der sich typische Veränderungen des Lichtreflexes auf der Hornhaut zeigen, wie das Scheren- und Öltropfenphänomen (Bühren et al., 2011).

Diagnoseverfahren, die bei der Diagnosestellung in frühen oder subklinischen Stadien helfen können, sind die korneale Topografie, Tomografiesysteme und Messverfahren, mit denen die Biomechanik der Cornea untersucht werden kann, wie der *Ocular Response Analyzer* (ORA; Reichert) (Goebels et al., 2013).

Die korneale Topografie bildet die Hornhautoberfläche ab, sodass die lokale Krümmung gemessen werden kann und ein Höhenprofil entsteht. Typischerweise zeigt sich eine zentrale Sanduhrfigur mit abgeknickten Achsen. Zur quantitativen Auswertung der Topografie existieren eine Reihe von Indizes, wie die Inferior-

superiore Brechwertdifferenz (I-S-Wert) und der KISA%-Index (Bühren et al., 2011; Goebels et al., 2013; Grünauer-Kloevekorn & Duncker, 2006; Rabinowitz, 1998).

Bei den Tomografiesystemen wird i.d.R. mittels Scheimpflug-Fotografie oder hochauflösenden Kohärenztomografen (OCT) sowohl die Hornhautoberfläche als auch die Rückfläche und die Hornhautdicke erfasst. Weit verbreitete Anwendung findet die *Pentacam* (Oculus, Wetzlar), welche mithilfe einer Pachymetrieanalyse und Abgleich mit Referenzwerten eines Normalkollektivs frühe Stadien des Keratokonus detektieren kann (Belin & Ambrósio, 2013; Bühren et al., 2011; Goebels et al., 2013; Müßig et al., 2014).

Des Weiteren gibt es Kombinationsgeräte, beispielsweise das TMS-5 (Topographic Modeling System, Tomey, Japan), die Messdaten aus der korneale Topografie mit der Scheimpflugtechnik vereinen (Goebels et al., 2013; Müßig et al., 2014).

Die biomechanischen Veränderungen, z.B. eine deutlich reduzierte Festigkeit der Cornea, die durch die Erkrankung des Keratokonus entstehen, können ebenfalls zur Diagnosestellung herangezogen werden (Gatzioufas & Seitz, 2013). Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Biomechanik bietet der ORA. Mittels bidirektionaler Applanation wird die Verformbarkeit der Hornhaut bestimmt. Die Applanationsdrücke, die für die Impression benötigt werden übersteigen die Drücke für die Relaxation. Diese Differenz ergibt die korneale Hysterese. Außerdem wird mit dem ORA die korneale Steifigkeit, der *Corneal Resistance Factor* (CRF), welche mit der zentralen Hornhautdicke korreliert, bestimmt (Gatzioufas & Seitz, 2013; Goebels et al., 2013; Müßig et al., 2014). Beide Parameter, korneale Hysterese und CRF, sind bei Vorliegen eines Keratokonus erniedrigt (Romero-Jiménez et al., 2010).

Müßig et al. verglichen in einer Studie drei Geräte zur Keratokonusdiagnostik: TMS-5, *Pentacam* und ORA. Sie konnten zeigen, dass mittels topo- und tomografischer Diagnostik der Keratokonus sicherer erkannt wird als über die Untersuchung der Biomechanik (Müßig et al., 2014). Auch andere Publikationen bewerten die mittels ORA erhobenen Messwerte alleine als nicht aussagekräftig genug (Bühren et al., 2011).

1.1.4 Therapieoptionen

Abhängig von seiner Ausprägung kann der Keratokonus durch konservative Maßnahmen zum Refraktionsausgleich oder operativ behandelt werden, wobei inzwischen neben der Hornhauttransplantation auch neuere operative Verfahren zur Verfügung stehen (Romero-Jiménez et al., 2010; Stoiber, 2008).

Während in frühen Stadien noch mit einer Brille oder weichen Kontaktlinsen eine adäquate Sehkorrektur erreicht werden kann, erfordert ein fortschreitender Astigmatismus die Versorgung mit formstabilen Kontaktlinsen (Bühren et al., 2011; Rabinowitz, 1998; Stoiber, 2008).

Bei Anpassungsschwierigkeiten aufgrund der progredienten Vorwölbung der Cornea, können als Alternative sogenannte Sklerallinsen eingesetzt werden. Diese liegen nur auf der Sklera auf und führen seltener zu einem Fremdkörpergefühl. In Bezug auf die Sauerstoffversorgung sind sie den kornealen Linsen allerdings unterlegen und werden in Deutschland deutlich seltener eingesetzt. Eine weitere Alternative stellt das „*Piggy Back*“-System dar, bei dem eine weiche Kontaktlinse unter der formstabilen platziert wird. Dieses System ist sehr aufwendig und erfordert eine hohe Compliance, weshalb es sich nicht wirklich durchsetzen konnte (Bühren et al., 2011; Händel et al., 2019; Jhanji et al., 2011; Stoiber, 2008).

Für Patienten, bei denen durch konservative Maßnahmen keine adäquate Sehleistung mehr erreicht werden kann, gibt es die Möglichkeit einer intrastromalen Ringimplantation (Händel et al., 2019). Dieses Verfahren wurde ursprünglich für die Behandlung einer geringen Myopie entwickelt und kann bei ausreichender Hornhautdicke und klarer Hornhaut eingesetzt werden. Durch Reduzierung der Hornhautkrümmung wird der Visus verbessert und der Zeitpunkt einer notwendigen Hornhauttransplantation verzögert (Bühren et al., 2011; Jhanji et al., 2011; Stoiber, 2008).

In Einzelfällen, bei Kontaktlinsenunverträglichkeit, kann zum Refraktionsausgleich auch die Implantation einer intraokularen Linse erwogen werden, wobei es bisher wenige Studien zu dieser Behandlungsmethode gibt (Colin & Velou, 2003; Jhanji et al., 2011; Stoiber, 2008).

Eine Hornhauttransplantation oder Keratoplastik ist i.d.R. zur Behandlung des Keratokonus indiziert, sobald mit anderen Methoden kein ausreichender Visus mehr erreicht werden kann (Bühren et al., 2011; Stoiber, 2008). Nachdem die perforierende Keratoplastik (pKPL) lange Zeit das Standardverfahren darstellte, hat sich inzwischen die tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik (DALK), bei der das Hornhautendothel erhalten bleibt, etabliert (Cursiefen et al., 2016). Studienergebnisse zeigen, dass hinsichtlich des visuellen Outcomes, die beiden Verfahren sich nicht wesentlich unterscheiden (Cursiefen et al., 2016; Seitz et al., 2013). Der Vorteil der DALK liegt allerdings in der fehlenden Immunreaktion, wodurch es nicht zu Abstoßungsreaktionen kommt und das Transplantatüberleben verlängert wird (Cursiefen et al., 2016; Seitz et

al., 2013; Stoiber, 2008). Es existieren verschiedene Techniken zur Durchführung einer DALK, beispielsweise die gut etablierte *Big-Bubble*-Technik. Hierbei wird Luft zwischen das korneale Stroma und die Descemet-Membran injiziert, um die Lamelle zu präparieren. Anschließend kann dann die Spenderhornhaut fixiert werden (Cursiefen et al., 2016; Seitz et al., 2013; Stoiber, 2008).

Trotz der nachgewiesenen gleichwertigen visuellen Ergebnisse nach DALK im Vergleich zur pKPL und der niedrigeren Komplikationsrate, ist die Anzahl der lamellären Keratoplastiken in Deutschland noch relativ gering. Dies liegt möglicherweise an der komplexeren Operationstechnik (Cursiefen et al., 2016; Händel et al., 2019).

Das *Corneal Crosslinking* (CXL) oder die Kollagenquervernetzung ist ein Verfahren, das von Spoerl et al. 1997 in Dresden entwickelt wurde. Damit steht erstmals eine kausale Therapieoption zur Verfügung, mit der sich die Progression des Keratokonus aufhalten lässt, eine weitere Versorgung der Patienten mit Kontaktlinsen ermöglicht wird und die Anzahl der notwendigen Hornhauttransplantationen deutlich reduziert werden kann (Bühren et al., 2011; Godefrooij et al., 2016; Spoerl et al., 1998).

1.2 Corneal Crosslinking

1.2.1 Dresden-Protokoll

Die Quervernetzung ist eine Technik, die beim Gerben und seit langem zur Verhärtung von Polymerwerkstoffen angewandt wird. In der Medizin wurde diese Technik zunächst zur Aushärtung von Bioprothesen, wie Schweineherzklappen, eingesetzt (Koller & Seiler, 2007; Spoerl et al., 1998).

Die Kollagenquervernetzung als Therapieoption für den Keratokonus wurde erstmals von Spoerl et al. untersucht (Spoerl et al., 1998). Daraus etablierte sich ein Standardprotokoll, das sogenannte Dresden-Protokoll, das durch die Kombination von UVA-Licht und Riboflavin zu einer Verfestigung der Hornhaut führt (Maier et al., 2019; Spoerl et al., 1998). Die ersten klinische Ergebnisse wurden 2003 von Wollensak et al. veröffentlicht und zeigten, dass *Corneal Crosslinking* die Progression des Keratokonus aufhalten kann (Wollensak et al., 2003a).

Die Behandlung beginnt mit einer mechanischen Epithelentfernung unter Tropfanästhesie. Anschließend wird die Hornhaut mit 0,1 %igem Riboflavin für 30 Minuten betropft. Der Riboflavin-Lösung werden 20 % Dextran zugesetzt, um die Quellung der Hornhaut zu verhindern. Vor und während der Bestrahlung wird die

Riboflavinapplikation alle 5 Minuten wiederholt. Nach der Riboflavinaufsättigung wird die Hornhaut zentral mit UVA-Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm und einer Intensität von 3 mW/cm^2 für 30 Minuten bestrahlt (Koller & Seiler, 2007; Maier et al., 2019). Die Bestrahlung der Hornhaut wird in Abb. 2 dargestellt.



Abb. 2: Corneal Crosslinking. (Elektronisches Bildarchiv des Berufsverbandes der Augenärzte e. V., mit freundlicher Genehmigung von Dr. L. Wollring und des BVA).

Riboflavin dient einerseits als Photosensibilisator, das bedeutet es verstärkt die Bildung von Sauerstoffradikalen, die wiederum eine entscheidende Rolle bei der Neubildung von intra- und intermolekularen Quervernetzungen (*Crosslinks*) der Kollagenfibrillen spielen. Andererseits absorbiert es die UV-Strahlung, sodass Linse und Netzhaut geschützt werden (Kohlhaas, 2008; Maier et al., 2019; Raiskup & Spoerl, 2013). Eine schematische Darstellung des CXL-Prozesses und der Bildung der Quervernetzungen ist in Abb. 3 zu sehen.

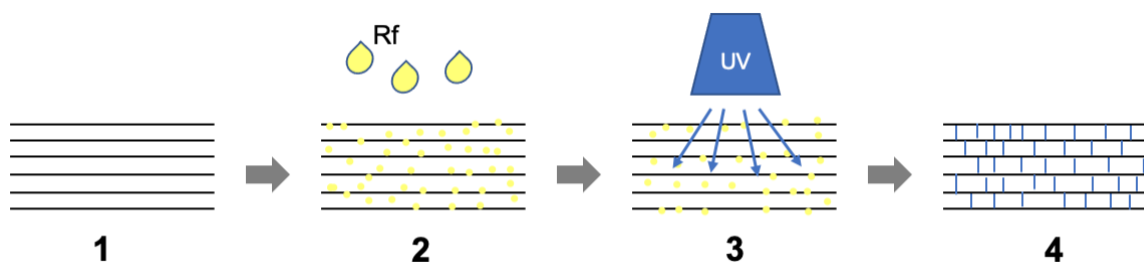


Abb. 3: Schematische Darstellung des CXL-Prozesses. 1: Parallel angeordnete Kollagenfibrillen im kornealen Stroma nach Epithelentfernung; 2: Riboflavin (Rf) wird appliziert; 3: Bestrahlung mit UVA-Licht; 4: Bildung neuer Quervernetzungen (Eigene Abbildung in Anlehnung an (Maier et al., 2019)).

Die durch den photochemischen Prozess induzierten *Crosslinks* lassen sich nicht lichtmikroskopisch nachweisen, weshalb auf andere Verfahren zurückgegriffen wird um in vitro die Effektivität des CXL nachzuweisen (Kohlhaas, 2008; Raiskup & Spoerl, 2013). In verschiedenen Studien wurde mithilfe einer Materialprüfmaschine das Spannungs-Dehnungs-Verhalten und das Elastizitätsmodul gecrosslinkter Hornhäute mit dem von unbehandelten Kontrollen verglichen. Die mit CXL behandelten Corneae zeigten alle eine deutliche Verfestigung (Kohlhaas et al., 2006; Spoerl et al., 1998; Wollensak et al., 2003b). Eine weitere Nachweismethode für die Effektivität der Behandlung ist die Testung der Resistenz gegen den Abbau durch proteolytische Enzyme, wie Collagenase A und Pepsin. Gecrosslinkte Hornhäute zeigen einen deutlich verlangsamten Abbauprozess (Spoerl et al., 2004).

Es existieren zahlreiche randomisierte kontrollierte Studien zum Nachweis der Effektivität des CXL zur Behandlung des Keratokonus. Diese Studien zeigen, dass CXL prinzipiell geeignet ist die Progression des Keratokonus aufzuhalten und teilweise die Behandlung auch zu einer Verbesserung des Visus führt (Kobashi & Rong, 2017; J. Li et al., 2015; Maier et al., 2019; Sykakis et al., 2015). Allerdings wird in zwei Metaanalysen auf die teilweise schwache Evidenz dieser Ergebnisse hingewiesen und die Durchführung weiterer Studien gefordert (Kobashi & Rong, 2017; Sykakis et al., 2015).

Insgesamt gilt CXL als ein sicheres und nebenwirkungsarmes Verfahren (Maier et al., 2019). Koller et al. stellten in einer Studie an 117 Augen eine Komplikationsrate von 2,9 % fest (Koller et al., 2009), insgesamt werden in der Literatur Komplikationsraten von 1 -10 % angegeben (Kohlhaas, 2017). Nach der Epithelentfernung treten in den ersten Tagen Schmerzen auf, die durch adäquate Analgesie gut therapiert werden können (Kohlhaas, 2008; Maier et al., 2019). Bis zur Reepithelialisierung, nach circa fünf Tagen, besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko, weswegen die Patienten mit antibiotischer Augensalbe behandelt werden. Trotzdem kann es in Einzelfällen zu infektiösen Infiltraten kommen. Davon zu unterscheiden sind sterile Infiltrate, die in bis zu 8 % der Fälle auftreten. Beides kann zu stromalen Narben führen (Maier et al., 2019; Seiler et al., 2013). In 3 - 4 % der Fälle kommt es zu einer verzögerten Wundheilung des Epithels. Daraus kann sich eine epitheliale Hypertrophie entwickeln (Kohlhaas, 2017).

Eine stromale Trübung oder *Haze* tritt nach CXL in 90 % der Fälle auf, wobei es im Verlauf meistens zu einer maximalen Trübung nach ungefähr drei Monaten und einer Verbesserung innerhalb von zwölf Monaten kommt (Greenstein et al., 2010; Seiler et

al., 2013). Eine Endothelschädigung durch CXL ist wegen der geringen Mitoserate des Endothels irreversibel und sollte unbedingt vermieden werden. Damit das UV-Licht nicht die Endothelzellen schädigt, muss ausreichend Riboflavin appliziert werden und die Hornhautdicke über 400 μm betragen (Seiler et al., 2013; Spoerl et al., 2007). Im vorderen Bereich der Cornea, bis zu einer Tiefe von circa 300 μm , wird nach dem CXL eine Keratozytenapoptose beobachtet, wobei es innerhalb von sechs Monaten zu einer Repopulation kommt (Kohlhaas, 2017; Spoerl et al., 2007).

1.2.2 Modifizierte CXL-Protokolle

1.2.2.1 Akzeleriertes CXL

Eine Möglichkeit das Standardprotokoll zu modifizieren besteht in der Verkürzung der Bestrahlungszeit, bei gleichzeitiger Erhöhung der Strahlungsintensität des UV-Lichts (akzeleriertes CXL) (Maier et al., 2019). Dies ermöglicht eine Verkürzung der Behandlungsdauer (Wernli et al., 2013).

Die Gesamtdosis bei Anwendung des Dresden-Protokolls beträgt 5,4 J/cm^2 (Wollensak et al., 2003a). Bei den akzelerierten Protokollen wird die UV-Intensität antiproportional zur Behandlungszeit erhöht, sodass die Gesamtdosis gleichbleibt (Wernli et al., 2013). Nach dem Bunsen-Roscoe-Gesetz der Reziprozität wird theoretisch bei einer gleichbleibenden Gesamtdosis jeweils der gleiche photochemische Effekt erzeugt (Bunsen & Roscoe, 1863).

Für die akzelerierte Behandlung von Patienten üblicherweise verwendete Kombinationen von UV-Intensität und Bestrahlungszeit sind 9 mW/cm^2 für 10 Minuten, 18 mW/cm^2 für 5 Minuten und 30 mW/cm^2 für 3 Minuten (Liu Y, Liu Y, Zhang Y-N, et al., 2017; Shajari et al., 2019; Toker et al., 2017). In Experimenten an porzinen Corneae wurden jedoch bis zu 90 mW/cm^2 für 1 Minute eingesetzt (Wernli et al., 2013).

Die Effektivität der akzelerierten Protokolle wurde in verschiedenen Studien mittels biomechanischer Testung überprüft. Wernli et al. konnten an porzinen Corneae zeigen, dass bis zu einer Bestrahlungsintensität von 45 mW/cm^2 ein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Kontrollgruppe besteht und die Protokolle alle vergleichbar effektiv sind (Wernli et al., 2013). Bei höheren Bestrahlungsintensitäten konnte allerdings kein CXL-Effekt nachgewiesen werden. Die Autoren folgern daraus, dass bezogen auf CXL das Bunsen-Roscoe-Gesetz nur im Bereich bis 45 mW/cm^2 Gültigkeit besitzt.

Andere Publikationen zeigen ebenfalls eine signifikant erhöhte und mit dem Standardprotokoll vergleichbare Steifigkeit durch akzelerierte Protokolle mit 9 mW/cm^2 (Krueger et al., 2014; Schumacher et al., 2011) und mit 15 mW/cm^2 (Krueger et al., 2014).

Im Unterschied zu den bereits aufgeführten Studien zeigen die Ergebnisse von Hammer et al. eine Abnahme des CXL-Effekts bei steigender Bestrahlungsintensität und bereits bei 18 mW/cm^2 keinen signifikanten Unterschied zu unbehandelten Kontrollen (Hammer et al., 2014). Des Weiteren konnte auch bei akzelerierten Protokollen eine erhöhte Resistenz gegen proteolytische Enzyme gezeigt werden. Aldahlawi et al. untersuchten die Resistenz von porzinen Corneae gegen den Abbau durch Pepsin nach der Anwendung verschiedener CXL-Protokolle (3 , 9 und 18 mW/cm^2) (Aldahlawi et al., 2015). Alle Gruppen zeigen eine erhöhte Resistenz, die Ergebnisse lassen jedoch auf eine Überlegenheit des Standardprotokolls schließen.

Eine andere Studie, in der humane Spenderhornhäute mit Intensitäten von 3 bis 45 mW/cm gecrosslinkt wurden, zeigt eine erhöhte Resistenz gegen Collagenase A in den Gruppen mit einer UV-Intensität von 3 , 9 , 18 und 30 mW/cm^2 und keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Kanellopoulos et al., 2016). Durch die Bestrahlung mit 45 mW/cm^2 konnte kein signifikanter Effekt erzielt werden.

Die Anwendung von akzelerierten CXL-Protokollen zur Behandlung des Keratokonus wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Eine Metaanalyse von Liu et al. zeigt, dass durch die Anwendung des Dresden-Protokolls die Progression des Keratokonus effektiver aufgehalten werden kann, die akzelerierten Protokolle aber zu einer vergleichbaren Verbesserung der Sehschärfe führen (Liu Y, Liu Y, Zhang Y-N, et al., 2017).

Eine weitere Metaanalyse kommt zu dem Ergebnis, dass akzelerierte Protokolle zwar zu einer Verfestigung der Hornhaut führen, aber möglicherweise dem Standardprotokoll bezüglich der Effektivität unterlegen sind (Shajari et al., 2019). Allerdings könnten bei dünnen Hornhäuten akzelerierte Protokolle bevorzugt werden, da sie einen oberflächlicheren Effekt erzielen und somit tiefer gelegene Anteile des Auges geschützt sind.

Toker et al. zeigen in ihrem Literaturüberblick ebenfalls, dass eine verkürzte Bestrahlungsdauer mit gleichzeitig erhöhten UV-Intensitäten die Effektivität des CXL einschränken könnte (Toker et al., 2017).

Die möglicherweise eingeschränkte Effektivität der akzelerierten Protokolle und die begrenzte Gültigkeit des Bunsen-Roscoe-Gesetzes sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei erhöhter Strahlungsintensität mehr Sauerstoff verbraucht

wird (Hammer et al., 2014; Toker et al., 2017). Da Sauerstoff ein entscheidender Faktor bei der, dem CXL zugrunde liegenden, photochemischen Reaktion ist, scheint eine reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit zu einem geringeren CXL-Effekt zu führen (Richo et al., 2013).

Eine mögliche Modifikation der akzelerierten CXL-Protokolle stellt ein gepulster Bestrahlungsmodus dar. Dabei wird die Hornhaut fraktioniert mit UV-Licht bestrahlt (z.B. 1 Sekunde an/1 Sekunde aus). Dies soll zu einer Verbesserung der Sauerstoffkonzentration im Stroma während der kurzen Bestrahlungspause und damit zu einem effektiveren CXL-Ergebnis führen (Krueger et al., 2014; Mazzotta et al., 2014; Ziaei et al., 2020).

1.2.2.2 Transepitheliales CXL

Transepitheliales CXL stellt eine weitere mögliche Modifikation des Standardprotokolls dar. Bei diesen transepithelialen Behandlungsprotokollen, auch Epi-on-Protokolle genannt, wird vor der Applikation von Riboflavin und UVA-Licht keine Epithelabrasio durchgeführt. Dies soll zu weniger postoperativen Schmerzen, weniger Infektionen oder Wundheilungsstörungen führen (Raiskup et al., 2015; Torres-Netto et al., 2018). Da die Diffusion des Riboflavins durch das Epithel erschwert wird, wurden verschiedene Techniken entwickelt, um die Riboflavinaufsättigung des kornealen Stromas zu verbessern. Zum einen kann eine veränderte Riboflavinlösung ohne Dextran und mit zugesetztem Benzalkoniumchlorid (BAC) verwendet werden (Raiskup et al., 2012). BAC führt zur Lockerung der epithelialen *Tight Junctions* und ermöglicht so eine verbesserte Diffusion des Riboflavins. Zum anderen gibt es die Möglichkeit der Iontophorese, dabei wird durch einen schwachen elektrischen Strom die Absorption des negativ geladenen Riboflavins verbessert (Raiskup & Spoerl, 2013; Torres-Netto et al., 2018; Vinciguerra et al., 2014). Des Weiteren kann das Riboflavin beispielsweise auch über intrastromale Taschen oder Tunnel appliziert werden (Raiskup et al., 2015; Seiler et al., 2014).

Die Effektivität der transepithelialen Protokolle wurde ebenso wie bei anderen CXL-Protokollen vor der Anwendung am Patienten mittels enzymatischer und biomechanischer Testung überprüft.

Aldahlawi et al. untersuchten in einer Studie die Resistenz von porzinen Corneae gegen den Abbau durch Pepsin nach der Behandlung mit unterschiedlichen transepithelialen CXL-Protokollen (Aldahlawi et al., 2016). Die Kontrollgruppe (Epi-off, 9 mW/cm²) zeigte im Vergleich zu allen transepithelialen Gruppe die höchste

Resistenz. Von den transepithelialen Protokollen zeigte sich die höchste Resistenz gegen den Abbau durch Pepsin bei der Anwendung einer verlängerten Iontophorese, erhöhter Riboflavinkonzentration von 0,25 % und verlängerter Bestrahlung von 12,5 Minuten bei einer UVA-Intensität von 10 mW/cm².

Wollensak und Iordina konnten bei der Anwendung von transepitheliale CXL an Kaninchenaugen einen deutlich reduzierten biomechanischen Effekt nachweisen, der ungefähr einem Fünftel des Standard-Protokolls entspricht (Wollensak & Iordina, 2009). In der histologischen Untersuchung zeigte sich entsprechend, dass der Keratozytenverlust auf 200 µm beschränkt war. Dies weist auf einen nur oberflächlichen CXL-Effekt durch das transepitheliale Protokoll hin.

In zwei Metaanalysen zeigt sich, dass transepitheliale Protokolle hinsichtlich der effektiven Aufhaltung der Progression des Keratokonus dem Standardprotokoll unterlegen sind (W. Li & Wang, 2017; Liu Y, Liu Y, Zhang Y-N, et al., 2017). Li und Wang kommen zusätzlich zu dem Ergebnis, dass transepitheliale Protokolle zu einer größeren Verbesserung der Sehstärke führen als das Standardprotokoll. Wohingegen Liu et al. keine Unterschiede in Bezug auf die Verbesserung der Sehstärke gefunden haben.

Die schlechtere Wirksamkeit der transepithelialen Protokolle kann durch mehrere mögliche Faktoren erklärt werden. Sie beruht einerseits wahrscheinlich darauf, dass das Epithel eine Diffusionsbarriere für das Riboflavin und das UVA-Licht darstellt (W. Li & Wang, 2017; Liu Y, Liu Y, Zhang Y-N, et al., 2017). Andererseits wird durch das Belassen des Epithels auch die Diffusion des Sauerstoffs ins korneale Stroma behindert (Aldahlawi et al., 2016; Seiler et al., 2014; Torres-Netto et al., 2018). Außerdem konnte experimentell gezeigt werden, dass das Epithel im Vergleich zum Stroma die zehnfache Menge an Sauerstoff verbraucht (Freeman, 1972).

1.2.2.3 Protokolle mit veränderter Sauerstoffkonzentration

Die möglicherweise niedrigere Effektivität von modifizierten CXL-Protokollen im Vergleich zum Dresden-Protokoll, wird von einigen Autoren auf die für die CXL-Reaktion nicht ausreichende Sauerstoffkonzentration zurückgeführt (Liu Y, Liu Y, Zhang Y-N, et al., 2017).

Man unterscheidet beim CXL-Prozess photochemische Reaktionen vom Typ I und II. Bei beiden Reaktionen wird zunächst Riboflavin durch das UVA-Licht angeregt. Aus dem angeregten Singuletttriboflavin entsteht Tripletttriboflavin. Bei der

photochemischen Reaktion Typ I reagiert das Tripletriboflavin direkt mit den reaktiven Gruppen der kornealen Proteine (Kamaev et al., 2012).

Bei der photochemischen Reaktion Typ II reagiert das Tripletriboflavin hingegen mit dem Sauerstoff in der Hornhaut und es entstehen reaktive Sauerstoffspezies. Diese Sauerstoffradikale reagieren wiederum mit den Aminosäuren der Kollagene, sodass neue kovalente Bindungen zwischen den Kollagenmolekülen gebildet werden (Kohlhaas, 2008; Wollensak, 2006).

Für die photochemische Reaktion Typ II ist eine ausreichende Sauerstoffkonzentration notwendig, anders als für die photochemische Reaktion Typ I, die vor allem bei niedriger Sauerstoffkonzentration abläuft (Kamaev et al., 2012).

Es existieren verschiedene Ansichten zu der Gewichtung der beiden Reaktionstypen beim CXL-Prozess. Kamaev et al. erläutern in ihrem Modell, dass vorrangig eine photochemische Reaktion vom Typ I stattfindet (Kamaev et al., 2012). Richoz et al. widersprechen dieser These und erklären, dass die Ergebnisse ihrer Studie nahelegen, dass Sauerstoff eine zentrale Rolle bei der CXL-Reaktion spielt und vor allem die photochemische Reaktion Typ II zu der Bildung der *Crosslinks* führt (Richoz et al., 2013).

Um den Verbrauch des Sauerstoffs während der CXL-Reaktion zu untersuchen ist es möglich die intrastromale Sauerstoffkonzentration mittels fiberoptischem Mikrosensor zu bestimmen (Hill et al., 2020; Kamaev et al., 2012; Seiler et al., 2020). Kamaev et al. konnten in ihrer Studie die Sauerstoffkonzentration unter einem mittels Mikrokeratom geschnittenen Flap von 100 µm Dicke messen (Kamaev et al., 2012). Hill et al. nutzen für die Herstellung des Flaps einen Femtosekundenlaser und messen in einer Tiefe von 230 µm (Hill et al., 2020). Eine andere Möglichkeit besteht darin mittels Femtosekundenlaser einen intrastromalen Tunnel zu schaffen und dort die Sauerstoffsonde zu platzieren (Seiler et al., 2020). Seiler et al. messen in ihrer Arbeit die intrastromale Sauerstoffkonzentration in 100, 200, und 300 µm Tiefe während der Behandlung mit verschiedenen CXL-Protokollen (Seiler et al., 2020).

Diese drei Studien zeigen innerhalb von Sekunden nach dem Beginn der UVA-Bestrahlung einen sehr schnellen Abfall der Sauerstoffkonzentration (Hill et al., 2020; Kamaev et al., 2012; Seiler et al., 2020). Nach Ausschalten des UVA-Lichts steigt die Sauerstoffkonzentration innerhalb weniger Minuten wieder auf den Ausgangswert an. Seiler et al. konnten außerdem nachweisen, dass die Sauerstoffkonzentration mit der Tiefe abnimmt (Seiler et al., 2020).

In einigen Studien wurden CXL-Protokolle mit veränderter Sauerstoffkonzentration angewandt und anschließend der CXL-Effekt mittels biomechanischer Prüfung getestet. Richoz et al. vergleichen in ihrer Studie das CXL-Ergebnis an porzinen Corneae nach der Behandlung unter normalen Umgebungsbedingungen (21 % O₂) und in einer sauerstoffarmen Umgebung (< 0,1 % O₂) (Richoz et al., 2013). Dabei wurde das Epithel vor der Behandlung entfernt und ein akzeleriertes Protokoll mit einer UV-Intensität von 9 mW/cm² verwendet. Bei den unter normaler Sauerstoffkonzentration behandelten Corneae zeigt sich eine signifikante Erhöhung der biomechanischen Verfestigung, wohingegen bei den in sauerstoffarmer Umgebung behandelten Corneae kein CXL-Effekt nachzuweisen ist. Die Autoren schließen daraus, dass die Effektivität des CXL sauerstoffabhängig ist.

Entsprechend zu diesen Ergebnissen, konnten Wang et al. bei der Anwendung des Standardprotokolls mit zusätzlichem Sauerstoff eine deutliche Verbesserung des CXL-Effekts an porzinen Corneae im Vergleich zur unter Umgebungsbedingungen behandelten Kontrollgruppe zeigen (Wang et al., 2020).

In einer Studie von Hill et al. in der akzelerierte transepitheliale CXL-Protokolle mit zusätzlichem Sauerstoff an Schweinehornhäuten angewandt und diese anschließend biomechanisch untersucht wurden, zeigte sich der beste CXL-Effekt ebenfalls bei der Gruppe mit der erhöhten Sauerstoffkonzentration (Hill et al., 2020).

Diakonis et al. untersuchten die biomechanische Verfestigung von humanen Spenderhornhäuten nach akzeleriertem CXL mit 30 mW/cm² ebenfalls mit zusätzlichem Sauerstoff (Diakonis et al., 2016). Die Ergebnisse zeigen allerdings keine Verbesserung des CXL-Effekts durch den zugesetzten Sauerstoff. Dies erklärt sich wahrscheinlich dadurch, dass in ihrem Versuchsaufbau keine geschlossene Kammer verwendet wurde und dadurch eine konstante Erhöhung der Sauerstoffkonzentration nicht sichergestellt werden konnte oder durch die sehr kurze Bestrahlungszeit, in der keine ausreichende Diffusion des Sauerstoffs möglich war.

Es existieren bisher wenige Studien, die CXL-Protokolle mit zusätzlichem Sauerstoff in vivo untersuchen. Zwei Arbeiten, in denen transepitheliale CXL-Protokolle mit zusätzlicher Sauerstoffgabe über Spezialbrillen bei Patienten getestet wurden, konnten eine Verbesserung des Visus und der Hornhautkrümmung nachweisen und zeigten keine signifikanten Nebenwirkungen (Matthys et al., 2021; Mazzotta et al., 2020).

1.3 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Die Veränderung der Sauerstoffverfügbarkeit könnte die Wirksamkeit von CXL deutlich verstärken. Außerdem könnte eine erhöhte Sauerstoffkonzentration im kornealen Stroma die Effektivität von modifizierten CXL-Protokollen erhöhen und damit die Behandlung des Keratokonus noch sicherer und nebenwirkungsärmer gestalten (Hill et al., 2020; Richo et al., 2013).

Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, ob die durch CXL verursachten Vernetzungseffekte durch eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im kornealen Stroma während der Behandlung gesteigert werden können. Dazu werden porcine Corneae in einer Sauerstoffdruckkammer unter hyperbaren Bedingungen und zusätzlicher Sauerstoffgabe behandelt und der Einfluss auf die Effektivität des CXL untersucht.

Es liegen bisher wenige Studien zum Einfluss einer erhöhten Sauerstoffkonzentration auf die Ergebnisse der CXL-Behandlung vor und Studien zu CXL unter hyperbaren Bedingungen wurden bisher nicht veröffentlicht.

Ziel der Arbeit ist die Auseinandersetzung mit folgenden Fragestellungen:

- Kann die Sauerstoffkonzentration im Stroma der Cornea durch hyperbare Bedingungen und/oder zusätzlichen Sauerstoff erhöht werden?
- Führen hyperbare Bedingungen und/oder zusätzlicher Sauerstoff zu einer größeren Effektivität von CXL und zu einer besseren Stabilität der Cornea?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Die Experimente wurden an Schweinehornhäuten eines lokalen Schlachthofs (Theo Keinhörster Großschlachtereie mit Fleischhandel e.K., Recklinghausen) durchgeführt. Die Schweine waren bei der Schlachtung circa 6 Monate alt. Die Augen wurden unmittelbar postmortal vor dem Abbrühen der Schweine entnommen, um thermische Schäden zu vermeiden. Sie wurden in PBS transportiert und bei 4°C gelagert. Alle Augen wurden innerhalb von 36 Stunden nach der Entnahme für die Versuche verwendet.

2.2 Studienplan

In der Studie wurden 40 porcine Corneae mit vier verschiedenen Behandlungsprotokollen (n = 10 in jeder Gruppe) mit CXL behandelt. Die Behandlungsbedingungen werden in Tabelle 2 gezeigt.

Bezeichnung	Zusätzlicher Sauerstoff	Hyperbare Bedingungen
CXL _{norm}	Nein	Nein
CXL _{norm} + O ₂	Ja	Nein
CXL _{hyp}	Nein	Ja
CXL _{hyp} + O ₂	Ja	Ja

Tabelle 2: Behandlungsbedingungen in den vier CXL-Versuchsgruppen. CXL = *Corneal Crosslinking*; norm = normobar; hyp = hyperbar.

Nach den verschiedenen CXL-Behandlungen wurden in jeder Versuchsgruppe bei je fünf Hornhäuten eine enzymatische Testung und bei je fünf Hornhäuten eine biomechanische Testung durchgeführt.

Zusätzlich zu den vier CXL-Gruppen wurde eine unbehandelte Kontrollgruppe (n = 20) zum Vergleich untersucht. In dieser Gruppe wurde bei zehn Hornhäuten eine enzymatische Testung und bei zehn Hornhäuten eine biomechanische Testung durchgeführt.

2.3 Sauerstoffdruckkammer

Die Sauerstoffdruckkammer des Universitätsklinikums Düsseldorf stand für die Versuche zur Verfügung. Sie wird in Abb. 4 gezeigt. Es handelt sich hierbei um eine zylindrische Mehrpersonendruckkammer (Sayers/Hebold Druckkammersysteme GmbH; modernisiert durch Haux).

In der Druckkammer wurde zusätzlich zum normalen Umgebungsdruck, von circa 1 bar, ein Druck von 1,4 bar aufgebaut. Der Gesamtdruck in der Sauerstoffdruckkammer während der Experimente lag dementsprechend bei 2,4 bar, dies entspricht einer Tauchtiefe von 14 Metern.



Abb. 4: Sauerstoffdruckkammer des Universitätsklinikums Düsseldorf

2.4 Versuchsaufbau

Um die Versuche unter hyperbaren Bedingungen und mit erhöhter Sauerstoffkonzentration durchführen zu können, wurde eine Box mit Anschlüssen für die Sauerstoffzufuhr und einer abgedichteten Öffnung für die UVA-Lampe sowie einem Zugang für die Riboflavinapplikation und den Sauerstoffsensoren konstruiert. Mithilfe einer schematischen Darstellung in Abb. 5 A wird der Versuchsaufbau erläutert. Die Box, in der die Versuche durchgeführt wurden, wird in Abb. 5 B und C gezeigt.

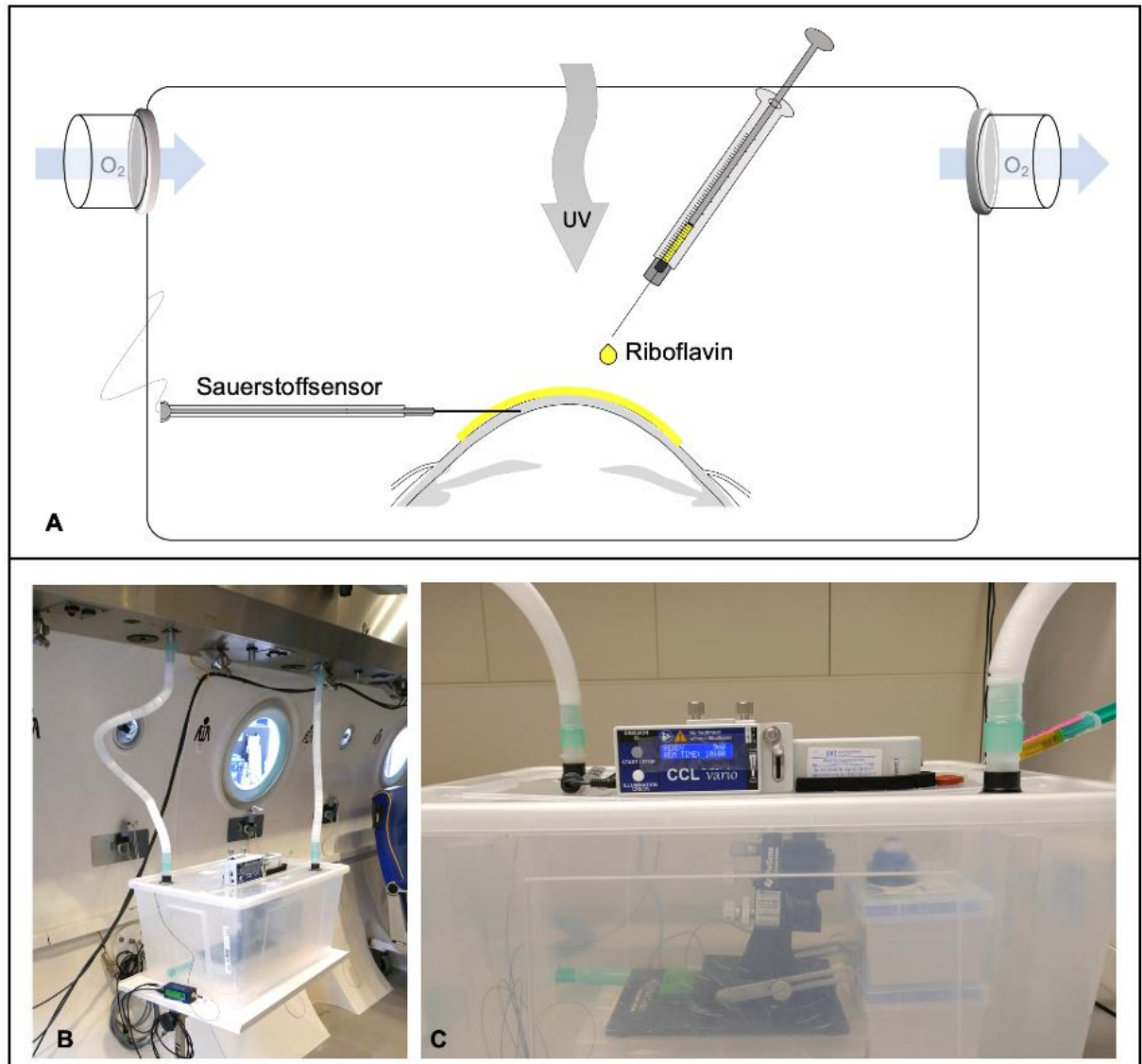


Abb. 5: Versuchsaufbau während CXL mit zusätzlicher Sauerstoffzufuhr. Box mit abgedichteten Zugängen für Sauerstoffzufuhr, UVA-Licht, Riboflavinapplikation und Sauerstoffsensor. Schematische Abbildung des Versuchsaufbaus (A); Versuchsaufbau in der Druckkammer (B); Nahaufnahme der Box, in der die Versuche durchgeführt wurden (C)

Bei den Versuchen mit zusätzlichem Sauerstoff wurde die Kiste zunächst mit 100%igem Sauerstoff geflutet (2 min; 10 l/min) und dann eine konstante Sauerstoffzufuhr von circa 5 l/min aufrechterhalten

2.5 Intrastromale Sauerstoffmessung

Material/Gerät	Hersteller
Femtosecond Laser Z8	Ziemer Ophthalmic Systems AG (Port, Schweiz)
Oxymeter (Oxy-1 ST)	PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg, Deutschland)
Nadelmikrosensor (50- μm diameter needle-type housing fiber-optic oxygen micro sensor; NTH-PSt7-02-L2.5-TS-NS40/0.8-NOP)	PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg, Deutschland)

Tabelle 3: Materialien und Geräte zur intrastromalen Sauerstoffmessung

Mithilfe eines Femtosekundenlasers wurde in 300 μm Tiefe im Stroma jeder Hornhaut ein Tunnel für die intrastromale Sauerstoffmessung geschaffen, um zu gewährleisten, dass die Messung immer in derselben Tiefe stattfindet. Der Tunnel hatte einen Durchmesser von 1,2 mm und eine Länge von 5 mm. Die Sauerstoffmessung in der Cornea erfolgte mit einem Oxymeter mit Nadelmikrosensor. Der Nadelmikrosensor wurde in den zuvor gelaserten Tunnel geschoben und die Sauerstoffmessung wurde vor Beginn der Riboflavinapplikation gestartet und jeweils bis zum Ende der Behandlung durchgeführt. Eine schematische Darstellung des Tunnels, sowie eine Abbildung des Tunnels mit der liegenden Sonde sind in Abb. 6 zu sehen.

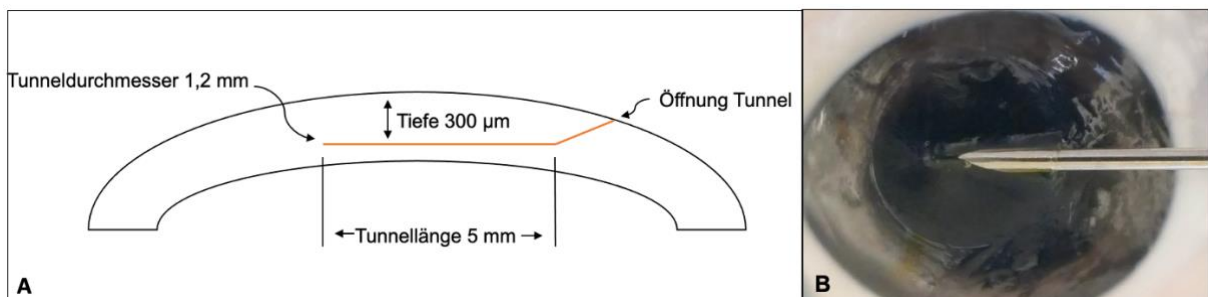


Abb. 6: Tunnel für die intrastromale Sauerstoffmessung. Schematische Darstellung des Tunnels mit genauen Maßen (A) (Eigene Abbildung in Anlehnung an (Seiler et al., 2020)). Foto des gelaserten Tunnels mit liegender Sauerstoffsonde (B).

2.6 Corneal Crosslinking

Material/Gerät	Hersteller
Hockey Knife	Feather (Osaka, Japan)
0,9 % NaCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dextran 500	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Riboflavin-5'-Monophosphat	Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, USA)
CCL-365 vario Crosslinking System	MLase AG (Germering, Deutschland)

Tabelle 4: Materialien und Geräte zur Durchführung des CXL

Das korneale Epithel wurde nach dem Lasern des Tunnels für die Sauerstoffmessung mit einem *Hockey Knife* zentral entfernt. Das Epithel der porzinen Cornea hat eine Dicke von ca. $80 \pm 25 \mu\text{m}$ (Sanchez et al., 2011), dementsprechend wurde die Sauerstoffmessung in einer verbleibenden Tunneltiefe von ca. $220 \pm 25 \mu\text{m}$ durchgeführt. Dem Dresden-Protokoll folgend wurde 0,1 % Riboflavin-5-Phosphat in 20 % Dextran-Lösung verwendet. Für die Dextran-Lösung wurde Dextran 500 in 0,9 % NaCl-Lösung gelöst (pH 7,0). Die Applikation des Riboflavins begann 30 Minuten vor der UVA-Bestrahlung und wurde vor und während der Bestrahlung im Abstand von je 5 Minuten fortgeführt. Nach 30 Minuten wurden die Corneae mittels CCL-365 vario Crosslinking System mit 9 mW/cm^2 für je 10 Minuten bestrahlt, dabei wurde der Lichtstrahl auf einen Durchmesser von 11 mm eingestellt.

2.7 Enzymatische Testung

Material/Gerät	Hersteller
Integra Miltex, Disposable Biopsy Punch, 8 mm (Trepan)	Integra LifeSciences (North Billerica, Massachusetts, USA)
6-Well-Platte	Corning Incorporated (Somerville, Massachusetts, USA)
Collagenase A from Clostridium histolyticum, 100 mg, REF: 10103578001 (0,223 U/mg), LOT: 35830424	Roche (Basel, Schweiz)
1x PBS (pH 7,4), hergestellt aus: <ul style="list-style-type: none"> - Natriumchlorid (8 g/l) - Kaliumchlorid (0,2 g/l) - di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (1,44 g/l) - Kaliumdihydrogenphosphat (0,2 g/l) 	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) Carl Roth VWR Chemicals (Langenfeld, Deutschland) Carl Roth
Sircol Soluble Collagen Assay	Biocolor (Carrickfergus, Nordirland)
PCMT Thermoshaker	Grant Instruments (Shepreth, England)
Centrifuge 5424	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, New York, USA)
VICTOR Multilabel plate reader X4	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)

Tabelle 5: Materialien und Geräte zur enzymatischen Testung

Nach den verschiedenen CXL-Behandlungen wurde die Resistenz der Corneae gegenüber dem Verdau durch Collagenase A getestet. Dazu wurden je fünf Hornhäute aus jeder Versuchsgruppe präpariert und der zentrale, gecrosslinkte Bereich mit einem Trepan mit einem Durchmesser von 8 mm herausgestanzt. Die Stanzen wurden über Nacht in PBS mit 5 % Penicillin und Streptomycin bei 4°C gelagert, um eine bakterielle Kontamination zu verhindern.

Am nächsten Tag wurden die Hornhautstanzen in einer 6-Well-Platte in je 5 ml 0,01 U/ml Collagenase A (in PBS; pH 7,4) bei 37°C inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurden täglich makroskopische Aufnahmen der Corneae durchgeführt. Mithilfe der Software Fiji (Schindelin et al., 2012) wurde die Fläche der Hornhautstanzen ausgemessen und der Verlauf bis zum vollständigen Verdau verglichen. Als Maßstab wurde der Durchmesser des Wells mit 34,8 mm verwendet.

Die Auswertung erfolgte verblindet, sodass erst nach der Flächenmessung die Aufnahmen den entsprechenden Behandlungsgruppen zugeordnet wurden.

An drei verschiedenen Zeitpunkten (3, 5, 7 Tage) wurde mittels eines quantitativen Kollagenassays die Menge an gelöstem Kollagen in den verschiedenen Gruppen bestimmt und miteinander verglichen. Die einzelnen Schritte des *Sircol Soluble Collagen Assays* wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde die Kollagenmenge in je 50 µl Lösung ermittelt und anschließend auf das Gesamtvolumen hochgerechnet. Durch das Kollagenassay können die Kollagentypen I - V bestimmt werden, in dem diese spezifisch an einen Farbstoff (*Sircol Dye Reagent*) gebunden werden. Nachdem die Probe mit dem gebundenen Farbstoff zentrifugiert wurde, erfolgte ein Waschschrift zur Entfernung des ungebundenen Farbstoffes. Anschließend wurde der an das Kollagen gebunden Farbstoff wieder gelöst und die Lichtabsorption bei 530 nm mithilfe eines *Microplate-Readers* bestimmt. Diese ist proportional zum Kollagengehalt.

2.8 Biomechanische Testung

Material/Geräte	Hersteller
Materialprüfmaschine ZwickiLine	Zwick Roell (Ulm, Deutschland)
Bulbushalter	Bausch & Lomb (Laval, Kanada)
Selbstgebaute Stanze (Breite 5,5 mm)	
Dulbecco's Modified Egel's Medium (DMEM) + 1 % Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, USA)
Dextran 500	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 6: Materialien und Geräte zur biomechanischen Testung

Die Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften der Corneae nach CXL wurden mit einer Materialprüfmaschine getestet.

Zunächst wurde eine Druckprüfung am ganzen Auge durchgeführt (Abb. 7 A). Dafür wurde das behandelte Auge in einen Bulbushalter gelegt, ohne einen Unterdruck zu erzeugen. Die Druckprüfung begann bei einer Vorkraft von 0,003 N und wurde mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min bis zu einer maximalen Verformung von 2 mm durchgeführt.

Nach der Druckprüfung wurde aus jeder Cornea zentral ein vertikaler Streifen von 5,5 mm Breite mit einer selbstkonstruierten Stanze ausgeschnitten. Diese Streifen wurden über Nacht in Entquellmedium (DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 6 % Dextran) gelagert, um eine vergleichbare Dicke der Streifen zu gewährleisten und einer starken Quellung entgegenzuwirken.

Am nächsten Tag wurde eine Zugprüfung durchgeführt (Abb. 7 B). Dafür wurde der Hornhautstreifen mit einem Klemmenabstand von 6 mm vertikal eingespannt und mit einer Vorspannung von 5000 Pa belastet. Die weitere Dehnung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1,5 mm/min bis zu einer maximalen Dehnung von 15 %.

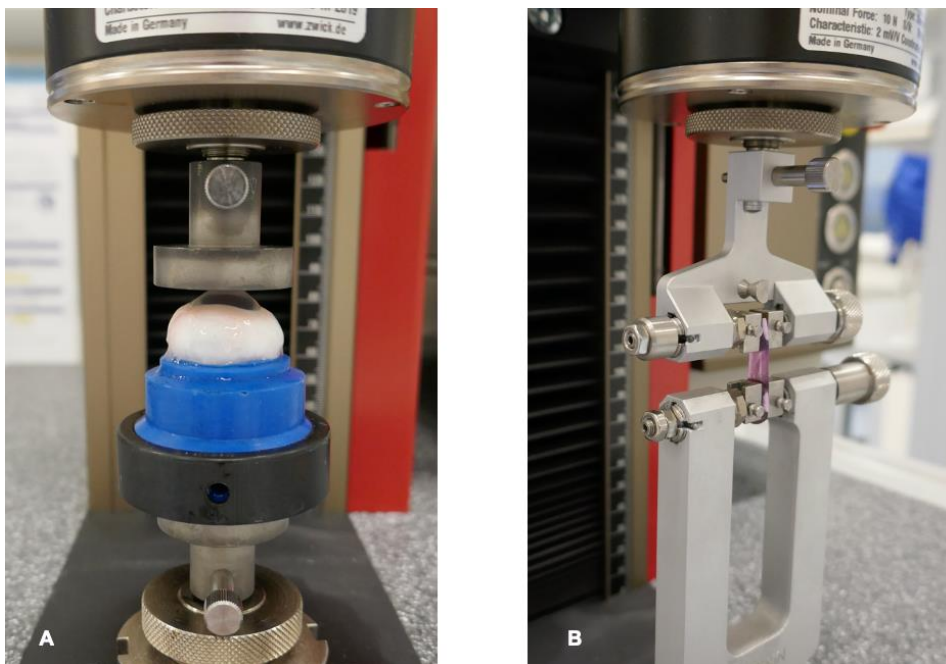


Abb. 7: Biomechanische Testung. Druckprüfung am ganzen Bulbus (A); Zugprüfung an porziner Cornea (5,5 mm breiter, zentraler Streifen) (B).

2.9 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Daten und die statistische Auswertung erfolgten mittels der Statistiksoftware *GraphPad Prism version 9.1.0 for macOS* (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

Die Ergebnisse der Sauerstoffmessung, der Druck- und Zugprüfung, sowie die Auswertung der Flächenreduktion durch den enzymatischen Abbau wurden als Mittelwertkurven mit den entsprechenden Standardabweichungen abgebildet. Es wurde jeweils eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-way-ANOVA) gerechnet. Als Post-hoc-Test wurde der Tukey-Kramer-Test verwendet.

Die Ergebnisse des quantitativen Kollagenassays wurden mithilfe eines Säulendiagramms mit entsprechender Standardabweichung dargestellt. Es wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-way-ANOVA) mit anschließendem Tukey-Kramer post-hoc Test berechnet.

Bei allen statistischen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von 5 % ($p < 0,05$) angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Intrastromale Sauerstoffmessung

Die intrastromale Sauerstoffkonzentration wurde nach der Epithelentfernung in einer Tiefe von circa $220 \pm 25 \mu\text{m}$ gemessen. Der Verlauf wird in Abb. 8 dargestellt.

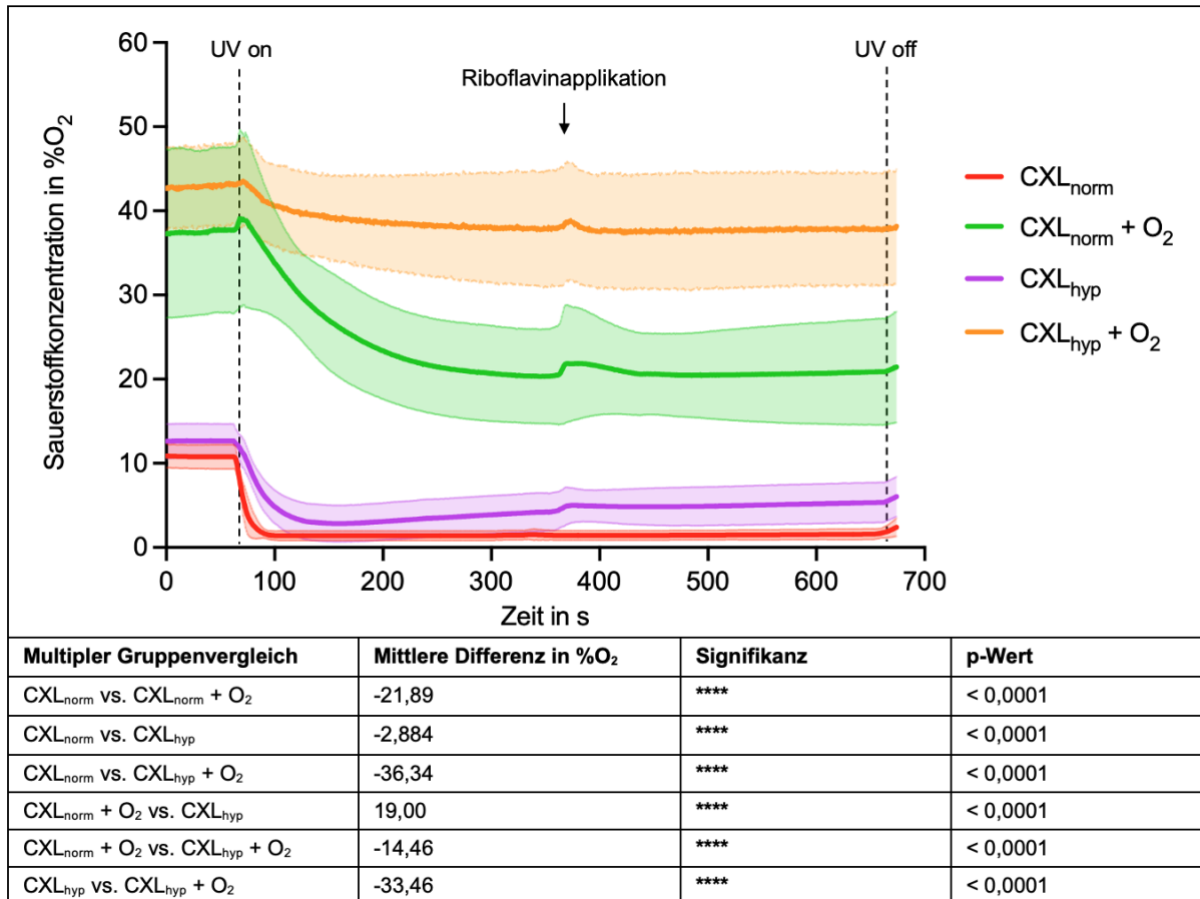


Abb. 8: Sauerstoffkonzentration während des CXL in allen vier Behandlungsgruppen. Die Sauerstoffkonzentration in %O₂ wird im zeitlichen Verlauf abgebildet. 5 Minuten nach Bestrahlungsbeginn (UV on) wurde Riboflavin appliziert. Nach insgesamt 10 Minuten Bestrahlung mit UVA-Licht wurde die Lampe abgeschaltet (UV off). Die Ergebnisse des multiplen Gruppenvergleichs werden in der Tabelle unter dem Diagramm dargestellt.

Die Ausgangswerte lagen im Mittel bei 11 % ($\pm 1,4$ %) in der Gruppe CXL_{norm}, 13 % ($\pm 1,9$ %) in der Gruppe CXL_{hyp}, 37 % ($\pm 9,4$ %) in der Gruppe CXL_{norm} + O₂ und 43 % (± 4 %) in der Gruppe CXL_{hyp} + O₂. In allen Behandlungsgruppen fiel die Sauerstoffkonzentration bei Beginn der Bestrahlung mit UVA-Licht ab. In der Gruppe CXL_{norm} sank die Sauerstoffkonzentration dabei innerhalb weniger Sekunden auf circa 1,5 %. In der Gruppe CXL_{hyp} fiel die Sauerstoffkonzentration langsamer innerhalb von

etwa einer Minute auf einen Wert von ungefähr 3 %. Der Abfall in der Gruppe CXL_{norm} + O₂ war ebenfalls deutlich langsamer. Innerhalb von ungefähr drei Minuten sank die Sauerstoffkonzentration in dieser Gruppe auf circa 21 %. In der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ war kein sehr deutlicher Abfall zu beobachten. Die Sauerstoffkonzentration sank hier innerhalb von circa drei Minuten um nur wenige Prozent auf einen Wert von circa 38 %.

Zum Zeitpunkt der Riboflavinapplikation, fünf Minuten nach Bestrahlungsbeginn, war in allen Behandlungsgruppen ein mechanisch verursachter Ausschlag der Sauerstoffkurven zu beobachten.

Nach zehn Minuten wurde die UVA-Bestrahlung beendet. Es konnte nicht gemessen werden, wie lange es dauert, bis die Sauerstoffwerte wieder das Ausgangsniveau erreichen, da die Aufenthaltszeit in der Druckkammer zeitlich begrenzt war.

Die Varianzanalyse ergab für jeden Gruppenvergleich einen signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$). Dementsprechend war die gemessene Sauerstoffkonzentration in der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ signifikant höher als in allen anderen Versuchsgruppen. In absteigender Reihenfolge folgten die Sauerstoffkonzentrationen in der Gruppe CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp} und CXL_{norm}.

3.2 Enzymatische Testung

Der Verlauf des enzymatischen Abbaus des kornealen Kollagens durch Collagenase A wurde anhand der täglichen makroskopischen Aufnahmen ausgewertet. Beispielhaft sind in Abb. 9 je eine Hornhautstanze aus der Kontrollgruppe und allen Behandlungsgruppen an drei verschiedenen Zeitpunkten (3, 5, 7 Tage) abgebildet.

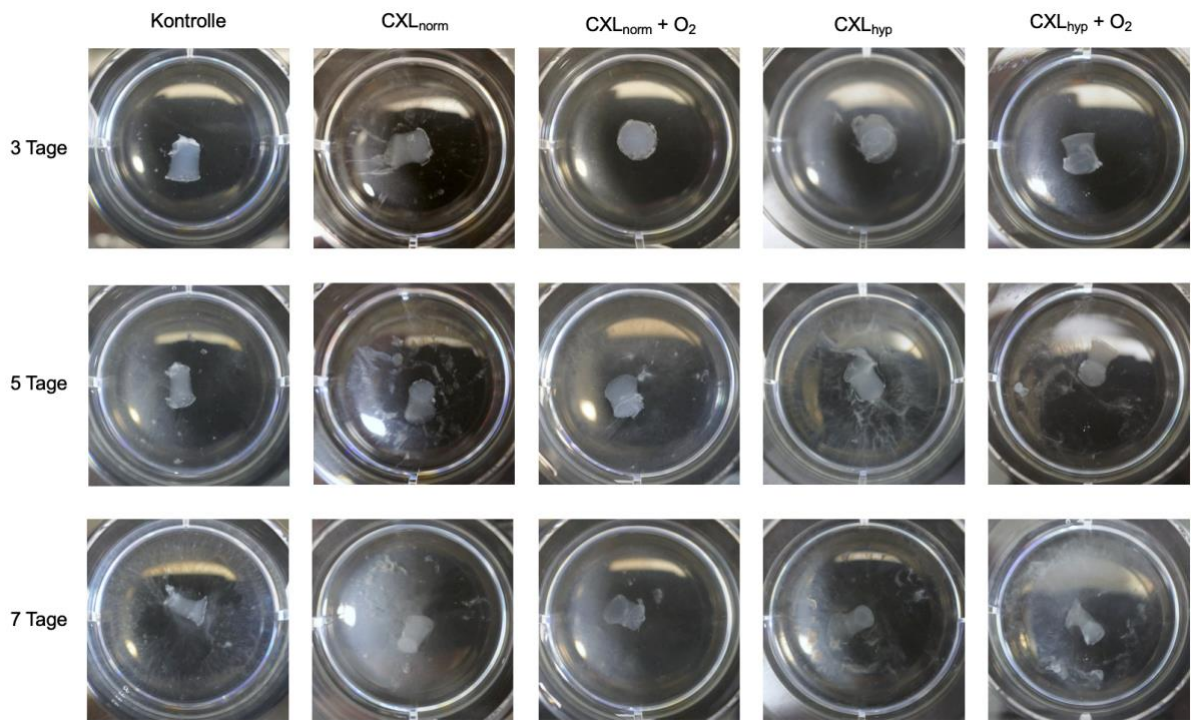


Abb. 9: Makroskopische Aufnahmen des enzymatischen Abbaus. Kontrollgruppe und Behandlungsgruppen an drei verschiedenen Zeitpunkten (3, 5, 7 Tage).

In Abb. 10 wird die Flächenreduktion über die Zeit in den vier Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte für jeden Tag mit der entsprechenden Standardabweichung abgebildet. Die Kurven zeigen alle einen ähnlichen Verlauf. Dabei überlagern sich die Standardabweichungen der einzelnen Gruppen deutlich. Die Zeit bis zum kompletten Abbau der Hornhautstanzen betrug über die Gruppen hinweg circa 8 - 11 Tage.

Die Varianzanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede im Verlauf des enzymatischen Abbaus zwischen den einzelnen Gruppen.

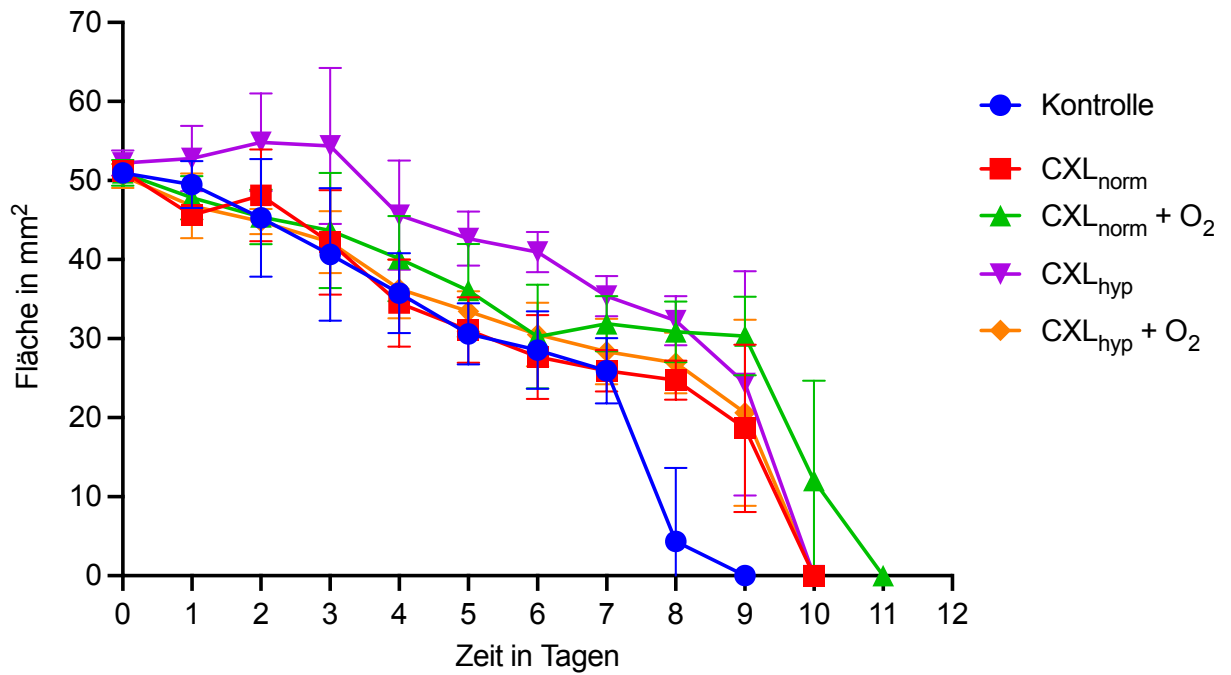


Abb. 10: Flächenreduktion der Hornhautstanzen durch den enzymatischen Abbau. Abgebildet wird die Fläche in mm² über den zeitlichen Verlauf (Zeit in Tagen).

Neben der Flächenreduktion wurde die Resistenz der Hornhäute gegen den Abbau durch Collagenase A mittels eines quantitativen Kollagenassays beurteilt. Die gelöste Kollagenmenge wurde zu drei Zeitpunkten (3, 5, 7 Tage) bestimmt. Die jeweiligen Mittelwerte der Gruppen mit den entsprechenden Standardabweichungen werden in Abb. 11 gezeigt. In allen Gruppen zeigte sich ein Anstieg der gelösten Kollagenmenge über die Zeit.

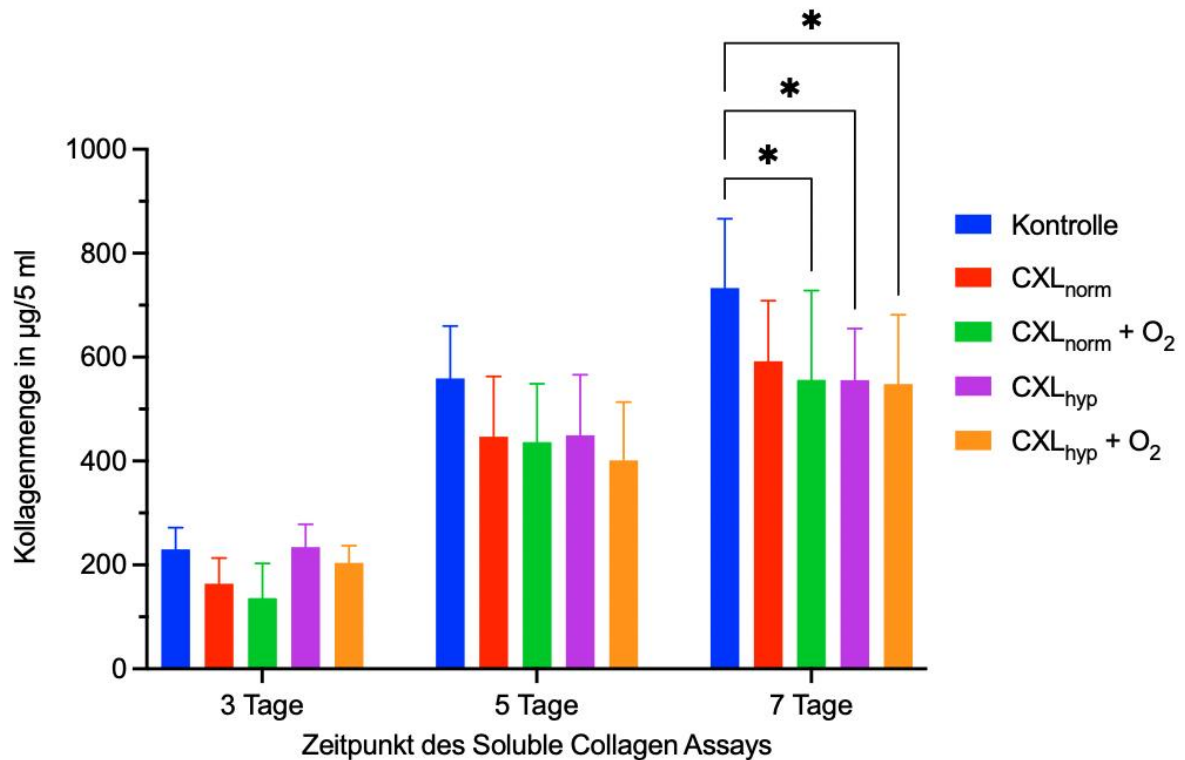


Abb. 11: Soluble Collagen Assay. Dargestellt werden die Mittelwerte (+ SD) der Kollagenmenge in $\mu\text{g}/5\text{ ml}$ Lösung an drei verschiedenen Zeitpunkten (3, 5, 7 Tage). * $p < 0,05$; two-way ANOVA.

Die Ergebnisse der Varianzanalyse zeigen nur nach 7 Tagen eine signifikant größere gelöste Kollagenmenge in der Kontrollgruppe als in der Gruppe CXL_{norm} + O₂ ($p = 0,0205$). Die mittlere Differenz betrug $176,8\ \mu\text{g}$. Ebenso wurde in der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt eine signifikant größere Kollagenmenge als in der Gruppe CXL_{hyp} ($p = 0,0202$) und in der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ ($p = 0,0137$) gemessen. Zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe CXL_{hyp} zeigte sich eine mittlere Differenz von $177\ \mu\text{g}$, sowie eine Differenz von $184,8\ \mu\text{g}$ zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe CXL_{hyp} + O₂. Außerdem zeigte sich die Tendenz, dass nach 7 Tagen in der Kontrollgruppe auch im Vergleich zu der Gruppe CXL_{norm} eine größere Kollagenmenge nachweisbar war. Die mittlere Differenz betrug bei diesen beiden Gruppen $141,1\ \mu\text{g}$. Dieses Ergebnis war allerdings nicht signifikant ($p = 0,1023$). Zu den anderen Zeitpunkten konnte zwischen keiner Versuchsgruppe ein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

3.3 Biomechanische Testung

3.3.1 Druckprüfung

Die Ergebnisse der Druckprüfung werden in Abb. 12 gezeigt. Es wird die für die Verformung von zwei Millimetern benötigte Kraft dargestellt. Im ersten Diagramm werden die Mittelwertkurven der einzelnen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe gezeigt. Die folgenden Abbildungen zeigen für die einzelnen Gruppen die Mittelwertkurve mit der entsprechenden Standardabweichung, da diese wegen Überschneidungen in einem gemeinsamen Diagramm nicht sichtbar werden. Unterhalb der Diagramme sind die Ergebnisse des multiplen Gruppenvergleichs mit den entsprechenden p-Werten zusammengefasst.

Die Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe CXL_{norm} und ebenso zwischen der Gruppe CXL_{norm} + O₂ und der Gruppe CXL_{hyp}. Im Vergleich zu allen anderen Gruppen wurde für die Verformung der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ signifikant mehr Kraft benötigt (alle p-Werte < 0,001). Des Weiteren wurden in der Kontrollgruppe signifikant größere Kräfte gemessen als in der Gruppe CXL_{norm} + O₂ (p = 0,0063) und in der Gruppe CXL_{hyp} (p = 0,0022). Ebenso zeigten sich signifikant größere Kräfte in der Gruppe CXL_{norm} im Vergleich mit der Gruppe CXL_{norm} + O₂ (p = 0,0013) und mit der Gruppe CXL_{hyp} (p = 0,0004).

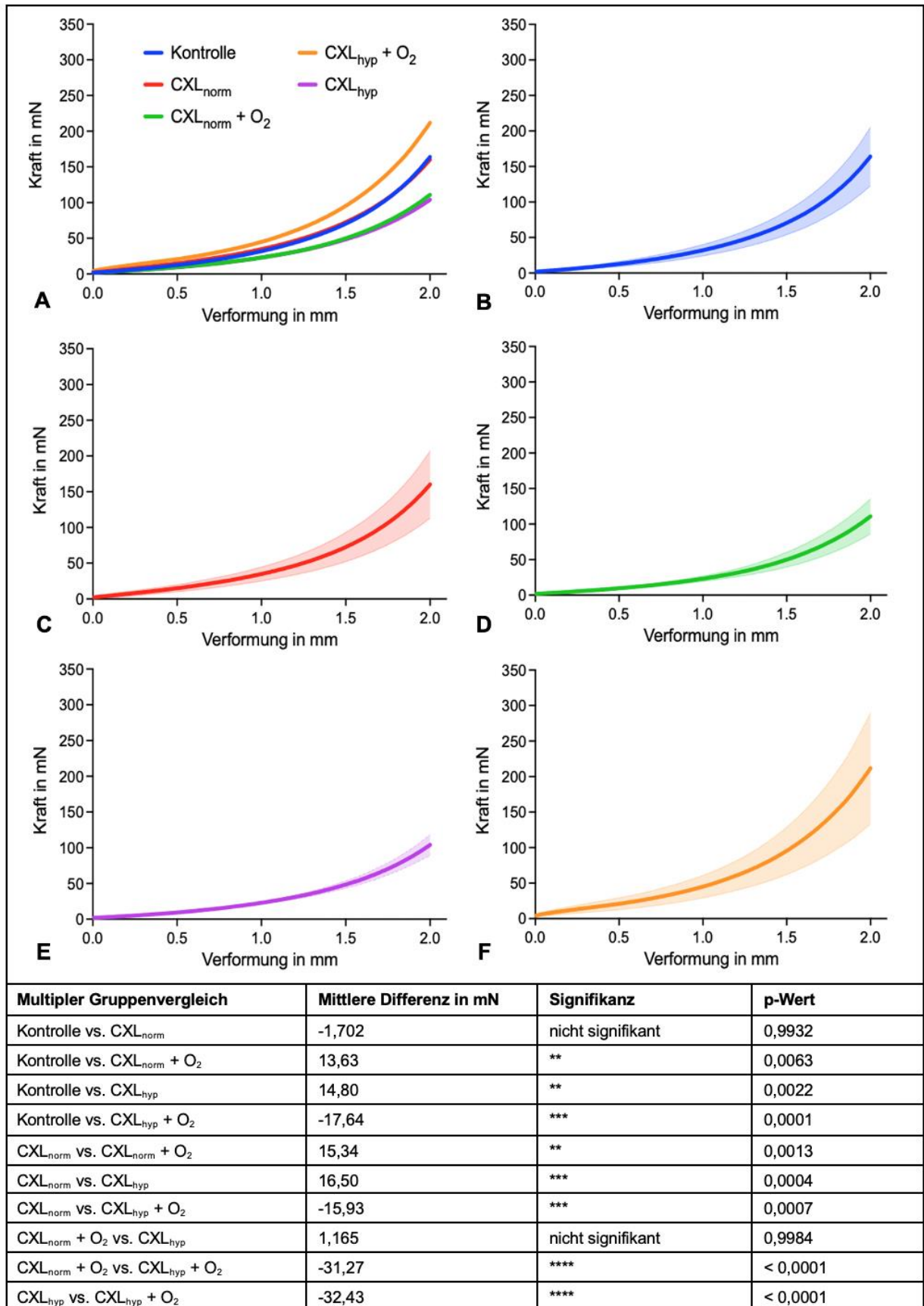


Abb. 12: Druckprüfung am ganzen Auge. Mittelwertkurven aller Behandlungsgruppen (A); Kontrollgruppe mit SD (B); CXL_{norm} mit SD (C); CXL_{norm} + O₂ mit SD (D); CXL_{hyp} mit SD (E); CXL_{hyp} + O₂ mit SD (F); Tabelle mit den Ergebnissen des multiplen Gruppenvergleichs.

3.3.2 Zugprüfung

Die Ergebnisse der Zugprüfung werden in Abb. 13 gezeigt. Es wird die Dehnung der kornealen Streifen und die dafür aufgebrauchte Kraft dargestellt. Im ersten Diagramm werden die Mittelwertkurven der einzelnen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe gezeigt. Die folgenden Abbildungen zeigen für die einzelnen Gruppen die Mittelwertkurve mit der entsprechenden Standardabweichung. Unterhalb der Diagramme sind die Ergebnisse des multiplen Gruppenvergleichs mit den entsprechenden p-Werten zusammengefasst.

Die Varianzanalyse ergab in der Kontrollgruppe im Vergleich zu allen Behandlungsgruppen je eine signifikant niedrigere benötigte Kraft für die Dehnung ($p < 0,0001$). Ebenso war die für die Dehnung notwendige Kraft in der Gruppe CXL_{norm} signifikant niedriger als in der Gruppe CXL_{norm} + O₂ ($p < 0,0001$) und in der Gruppe CXL_{hyp} ($p = 0,0229$). In der Gruppe CXL_{norm} + O₂ wurde außerdem signifikant mehr Kraft für die Dehnung benötigt als in der Gruppe CXL_{hyp} ($p = 0,0004$) und in der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ ($p < 0,0001$). In der Gruppe CXL_{hyp} ergaben sich signifikant höhere Kräfte als in der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ ($p = 0,0137$). Nur zwischen den Gruppen CXL_{norm} und CXL_{hyp} + O₂ ergab sich in der Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied.

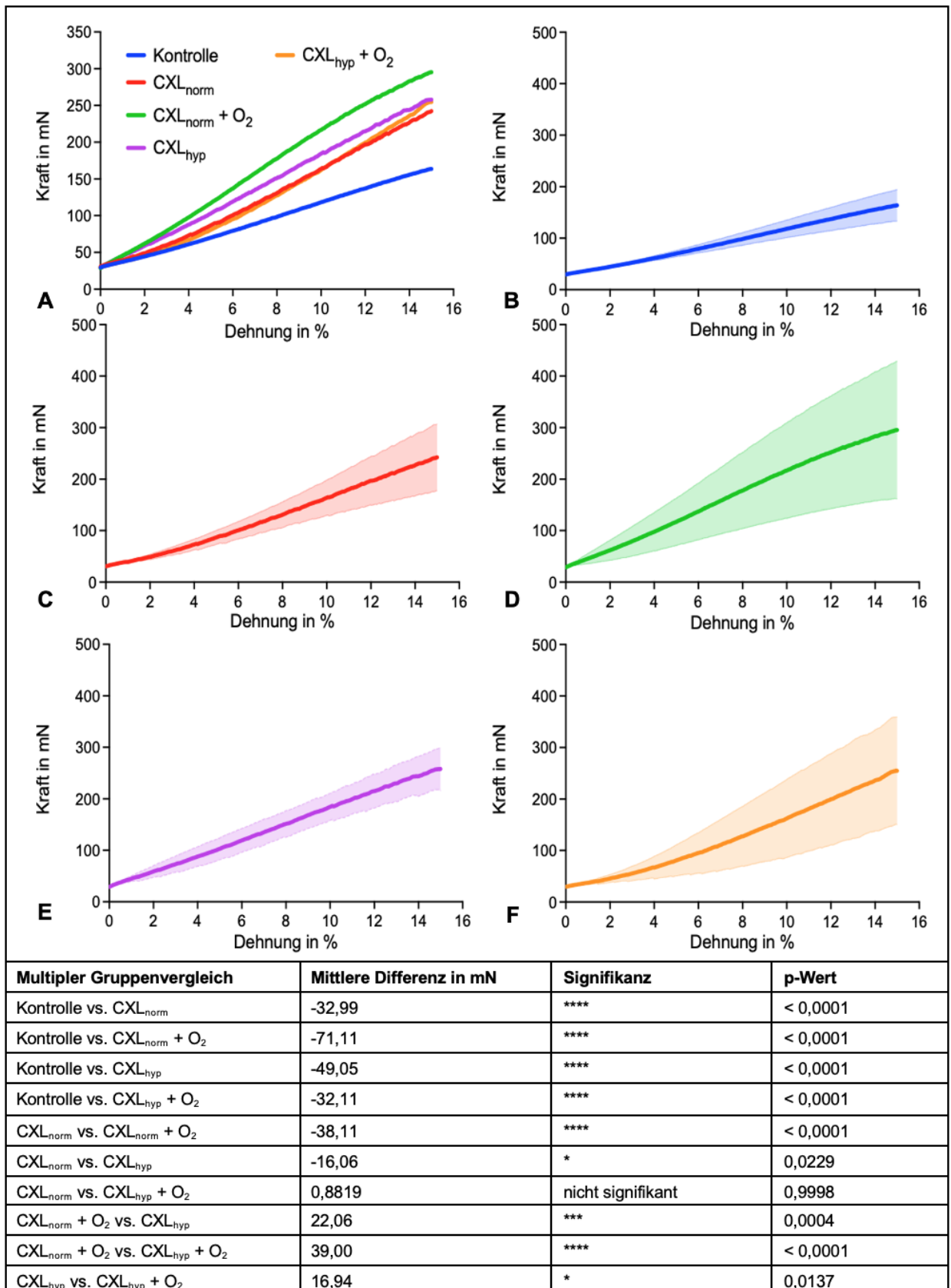


Abb. 13: Zugprüfung an porziner Cornea. Mittelwertkurven aller Behandlungsgruppen (A); Kontrollgruppe mit SD (B); CXL_{norm} mit SD (C); CXL_{norm} + O₂ mit SD (D); CXL_{hyp} mit SD (E); CXL_{hyp} + O₂ mit SD (F); Tabelle mit den Ergebnissen des multiplen Gruppenvergleichs.

4 Diskussion

4.1 Erhöhung der intrastromalen Sauerstoffkonzentration

Da Sauerstoff einen limitierenden Faktor bei der CXL-Reaktion darstellt, könnte die Wirksamkeit von CXL durch eine Erhöhung der intrastromalen Sauerstoffverfügbarkeit deutlich verstärkt werden (Richoz et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde um zu überprüfen, ob durch hyperbare Bedingungen und zusätzlichen Sauerstoff die intrastromale Sauerstoffkonzentration in der Cornea erhöht werden kann, in den verschiedenen Behandlungsgruppen diese während des CXL gemessen und der Verlauf der Sauerstoffkurven verglichen.

Bislang existieren wenige Studien zur intrastromalen Sauerstoffkonzentration während CXL. Einige Autoren messen mittels Mikrosensor die Sauerstoffkonzentration während verschiedener CXL-Protokolle in unterschiedlichen Tiefen in porzinen Hornhäuten und untersuchen gleichzeitig, ob diese durch eine zusätzliche Sauerstoffzufuhr erhöht werden kann (Hill et al., 2020; Kamaev et al., 2012; Seiler et al., 2020).

Seiler et al. vergleichen die Sauerstoffkonzentrationen in porzinen Corneae während CXL mit UVA-Intensitäten von 3, 9, 18, und 30 mW/cm² (Seiler et al., 2020). Die Sauerstoffkonzentration wird jeweils in einem gelaserten Tunnel mit einer Tiefe von 100, 200 und 300 µm bei Raumluft und bei > 95 % Umgebungssauerstoff gemessen. Die initialen Sauerstoffkonzentrationen werden von den Autoren nicht aufgeführt. Aus den Graphiken lassen sich in einer Tiefe von 200 µm Ausgangswerte von ungefähr 14 % bei Raumluft und 90 % bei zusätzlicher Sauerstoffzufuhr ablesen. Diese Messdaten passen zu den in der vorliegenden Studie in einer Tiefe von circa 220 µm gemessenen Ausgangswerten von 11 % ($\pm 1,4$ %) in der Gruppe CXL_{norm}. In der Gruppe CXL_{norm} + O₂ fanden sich mit 37 % ($\pm 9,4$ %) hingegen deutlich niedrigere Werte. Es zeigte sich aber ebenfalls eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration.

Hill et al. messen die Sauerstoffkonzentration in porzinen Hornhäuten unter einem gelaserten Flap in einer Tiefe von 230 µm während der Anwendung verschiedener transepithelialer CXL-Protokolle bei Raumluft und mit zusätzlicher Sauerstoffzufuhr (Hill et al., 2020). Die Autoren konnten zeigen, dass eine Sauerstoffkonzentration von > 90 % in der Umgebung zu einer circa fünffachen Erhöhung der intrastromalen Sauerstoffkonzentration in der Cornea führt im Vergleich zu Raumluft. In der vorliegenden Studie konnte durch die zusätzliche Sauerstoffzufuhr die initiale Sauerstoffkonzentration in der Hornhaut circa um den Faktor 3,4 erhöht werden.

Beide diskutierten Studien zeigen eine Erhöhung der initialen intrastromalen Sauerstoffkonzentration durch eine zusätzliche Sauerstoffzufuhr, die in ihrem absoluten Wert den Ausgangswert in der vorliegenden Studie übersteigt. Dies lässt sich möglicherweise durch Abweichungen in der Messmethode, untersucherabhängige Faktoren und interindividuelle Unterschiede zwischen den Proben erklären.

Des Weiteren können Seiler et al. zeigen, dass die Sauerstoffkonzentration mit zunehmender Tiefe und Bestrahlungsintensität abnimmt und nach Beginn der UVA-Bestrahlung schnell abfällt (Seiler et al., 2020). Dieser Abfall der Sauerstoffkonzentration konnte in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. Seiler et al. messen in der CXL-Gruppe mit einer Bestrahlungsintensität von 9 mW/cm^2 , entsprechend der in der vorliegenden Studie verwendeten Bestrahlungsintensität, in einer Tiefe von $200 \mu\text{m}$ einen Abfall der Sauerstoffkonzentration auf unter 1 % bei Raumluft. Der Verlauf der Sauerstoffkurve während CXL bei Raumluft entspricht ungefähr dem Verlauf in der vorliegenden Arbeit, wobei hier dauerhaft eine Sauerstoffkonzentration von circa 1,5 % nachgewiesen werden konnte.

Bei zusätzlicher Sauerstoffgabe während des CXL fällt die Sauerstoffkonzentration in der Studie von Seiler et al. auf $2,6 \pm 3,2 \%$. Im Gegensatz dazu blieb in der vorliegenden Studie die Sauerstoffkonzentration in der Gruppe $\text{CXL}_{\text{norm}} + \text{O}_2$ nach einem Abfall auf einem konstanten Level von 21 %. Damit konnte die von Seiler et al. gezeigte Abnahme der Sauerstoffkonzentration bei einer Bestrahlungsintensität von 9 mW/cm^2 nicht in diesem Ausmaß bestätigt werden. In der Arbeit von Seiler et al. konnte lediglich bei einer Bestrahlungsintensität von 3 mW/cm^2 und zusätzlicher Sauerstoffgabe die intrastromale Sauerstoffkonzentration während des CXL auf einem konstanten Niveau von ungefähr 47 % gehalten werden.

Hill et al. zeigen ebenfalls, dass bei Beginn der UVA-Bestrahlung die Sauerstoffkonzentration in den CXL-Gruppen unter Raumluft innerhalb weniger Sekunden auf 0 % abfällt und nach Beendigung der Bestrahlung erst wieder ansteigt (Hill et al., 2020). In der Gruppe mit zusätzlichem Sauerstoff blieb die Sauerstoffkonzentration nach einem initialen schnellen Abfall bis 13 % auf einem konstanten Level von 21 %. In der vorliegenden Arbeit fiel die Konzentration hingegen langsamer ab auf circa 21 % und blieb dann auf diesem Niveau.

In der Studie von Hill et al. zeigen die Daten der Behandlungsgruppe mit zusätzlichem Sauerstoff ebenso wie in der vorliegenden Studie eine größere Streuung (Hill et al., 2020). Die Autoren argumentieren, dass durch einen steileren Sauerstoffgradienten

zwischen der Oberfläche und dem Stroma, mögliche Einflussfaktoren wie die Lage der Probe, die Gasdurchlässigkeit der Hornhaut und der Sauerstoffverbrauch, einen größeren Effekt haben könnten.

Grundsätzlich kann in der vorliegenden Arbeit im Vergleich mit den Studien von Seiler et al. und Hill et al. trotz teilweise unterschiedlicher CXL-Protokolle, Messmethoden und absoluter Messwerte gezeigt werden, dass durch eine zusätzliche Sauerstoffzufuhr die intrastromale Sauerstoffkonzentration in der Hornhaut während CXL erhöht werden kann und die Sauerstoffkurven in den Gruppen CXL_{norm} und CXL_{norm} + O₂ ähnlich verlaufen.

In einer weiteren Studie zur intrastromalen Sauerstoffkonzentration während CXL konnten Kamaev et al. ebenfalls nachweisen, dass die Sauerstoffkonzentration nach Beginn der UVA-Bestrahlung innerhalb von Sekunden auf 0 % abfällt (Kamaev et al., 2012). Die porzinen Hornhäute wurden bei Raumluft mit UVA-Intensitäten von 3 und 30 mW/cm² behandelt und die Sauerstoffkonzentration in einer Tiefe von 100 µm gemessen. Daher sind die Messdaten bis auf den ähnlichen Verlauf der Sauerstoffkurven nicht sinnvoll mit denen der vorliegenden Arbeit zu vergleichen.

Eine Recherche in *PubMed* und *Google Scholar* mit den Schlagwörtern „HBO, hyperbaric oxygen therapy, Corneal Crosslinking, CXL, keratoconus“ ergab keine Treffer in Bezug auf die Anwendung von CXL bei Keratokonus unter hyperbaren Bedingungen.

Nach dem Gesetz von Dalton hat jedes Gas in einem Gasgemisch einen bestimmten Partialdruck abhängig von seinem Anteil am Gesamtvolumen. Wenn der Druck des Gasgemisches unter hyperbaren Bedingungen in der Sauerstoffdruckkammer erhöht wird, so erhöht sich auch der Partialdruck der einzelnen Anteile. Dementsprechend steigt schon ohne zusätzliche Sauerstoffgabe der Sauerstoffpartialdruck unter hyperbaren Bedingungen (Jaeger et al., 2002). Die Sauerstoffpartialdrücke in der vorliegenden Arbeit betragen nach dem Gesetz von Dalton, ausgehend von einem ungefähren Sauerstoffanteil von 21 % in der Raumluft und 100 % bei zusätzlicher Sauerstoffzufuhr, in der Gruppe CXL_{norm} 0,21 bar, in der Gruppe CXL_{hyp} 0,504 bar; in der Gruppe CXL_{norm} + O₂ 1 bar und in der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ 2,4 bar.

Die Diffusion des Sauerstoffs ist unter anderem vom seinem Partialdruck und der Diffusionsstrecke abhängig und nimmt daher mit der Entfernung zur Oberfläche ab (Seiler et al., 2020). Dies erklärt, warum durch eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes die intrastromale Sauerstoffkonzentration steigt und dass die gemessenen Sauerstoffkonzentrationen im Stroma nicht denen in der Umgebungsluft

entsprechen. Durch den Sauerstoffverbrauch der Hornhaut kommt es tiefenabhängig zu einer zusätzlichen Abnahme der Sauerstoffkonzentration (Freeman, 1972; Seiler et al., 2020)

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen intrastromalen Sauerstoffkonzentrationen in den verschiedenen Behandlungsgruppen unterscheiden sich signifikant voneinander und entsprechen in aufsteigender Reihenfolge von der Gruppe CXL_{norm}, über CXL_{hyp}, CXL_{norm} + O₂ zu CXL_{hyp} + O₂ der Reihenfolge der zugehörigen Sauerstoffpartialdrücke.

In der vorliegenden Studie wurde die Sauerstoffkonzentration in der Umgebung nicht zusätzlich kontrolliert. Es ist aber davon auszugehen, dass dies keine Limitation darstellt, da durch einen kontinuierlichen, gleichbleibenden Zufluss, ein konstant hohes Niveau der Umgebungssauerstoffkonzentration gewährleistet war. Durch die Verwendung von Ex-vivo-Schweineaugen könnten Abweichungen vom physiologischen Sauerstoffverbrauch und der Sauerstoffdiffusion in die Hornhaut entstehen. Ebenso können interindividuelle Unterschiede einen Einfluss auf die Messdaten haben, da kein paarweiser Vergleich von Augen desselben Schweins durchgeführt wurde. Des Weiteren wurde vor der Epithelentfernung keine Messung der Epitheldicke durchgeführt, sodass die effektive Messtiefe zwischen den Augen variieren könnte. In dieser Studie wird eine Messtiefe von circa 220 µm angegeben, ausgehend von einer Epitheldicke von 80 µm ± 25 (Sanchez et al., 2011). Die Augen wurden aus organisatorischen Gründen vor der Behandlung und der Sauerstoffmessung unterschiedlich lange gelagert, was auch zu einer Streuung der Messdaten beitragen könnte.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die intrastromale Sauerstoffkonzentration durch hyperbare Bedingungen und durch zusätzlichen Sauerstoff während CXL erhöht werden kann. Dabei zeigten sich die höchsten Sauerstoffkonzentrationen und der geringste Abfall während der CXL-Reaktion bei der Kombination aus hyperbaren Bedingungen und zusätzlicher Sauerstoffgabe.

4.2 Effektivität des *Corneal Crosslinkings*

4.2.1 Enzymatische Stabilität

Um die Effektivität des CXL zu überprüfen und den Behandlungseffekt zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu vergleichen wurde die Resistenz der Hornhäute gegen

den Abbau durch Collagenase A getestet. Verschiedene Autoren konnten einen signifikanten Unterschied zwischen gecrosslinkten Hornhäuten und unbehandelten Kontrollen bezogen auf die Zeit bis zum kompletten Abbau durch Collagenase A nachweisen (Brekelmans et al., 2020; Kanellopoulos et al., 2016; Schilde et al., 2008; Spoerl et al., 2004).

Spoerl et al. untersuchten die Resistenz von Schweinehornhäuten gegen den Abbau durch Pepsin, Trypsin und Collagenase A nach CXL mit einer UVA-Intensität von 1, 2 und 3 mW/cm² (Spoerl et al., 2004). Die Autoren geben an eine 0,1 %ige Collagenase-A-Lösung, entsprechend einer Aktivität der Collagenase A von 0,1 U/ml, zu verwenden. Die unbehandelten Kontrollen waren nach 6 Tagen komplett abgebaut und die gecrosslinkten Hornhäute nach jeweils 7, 10 und 14 Tagen entsprechend der Bestrahlungsintensität. Obwohl in der vorliegenden Arbeit das gleiche Enzym mit einer niedrigeren Aktivität von 0,01 U/ml verwendet wurde, betrug die Zeit bis zum vollständigen Abbau der Hornhäute 8 bis 11 Tage. Im Unterschied zu der Arbeit von Spoerl et al. wurden die Hornhäute mit einer Intensität von 9 mW/cm² bestrahlt. Es besteht kein Grund anzunehmen, dass der deutlich schnellere enzymatischen Abbau damit zusammenhängt.

Schilde et al. verwendeten ebenfalls eine Enzymaktivität von 0,1 U/ml und einer Bestrahlungsintensität von 3 mW/cm², aber dünnere Flaps von 200 µm im Vergleich zu ganzen Hornhautstanzen (Schilder et al., 2008).

Brekelmans et al. verwendeten eine 0,3 %ige Collagenase-A-Lösung (Brekelmans et al., 2020). Dadurch verkürzt sich die Zeit bis zum kompletten Abbau deutlich auf weniger als 6 Stunden für die unbehandelten Kontrollen.

Kanellopoulos et al. konnten an mit 9 mW/cm² gecrosslinkten humanen Hornhäuten ebenfalls zeigen, dass diese resistenter gegen den Abbau durch Collagenase A sind, allerdings verwendeten die Autoren ebenfalls eine 0,3 %ige Collagenase-A-Lösung (Kanellopoulos et al., 2016).

Insgesamt sind die vorliegenden Studien zur Resistenz von gecrosslinkten Hornhäuten gegen den Abbau durch Collagenase A sehr heterogen und erschweren dadurch einen Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Studien, in denen die Auswirkung einer erhöhten intrastromalen Sauerstoffverfügbarkeit während CXL auf die Resistenz gegen den enzymatischen Abbau untersucht wird, liegen nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde der enzymatische Abbau über die Zeit durch die Flächenreduktion der Hornhautstanzen bestimmt. Dabei konnten weder zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen noch zwischen den Behandlungsgruppen und

den unbehandelten Kontrollen signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die Tatsache, dass die Methode es nicht ermöglicht zwischen gecrosslinkten und unbehandelten Corneae zu unterscheiden, lässt sich durch mehrere Ansätze erklären. Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit der Methodik aus anderen vorliegenden Arbeiten durch ungenaue Angaben zur Enzymaktivität oder Inkubationstemperatur erschwert. Dies führt zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit mit den vorangehend diskutierten Erkenntnissen.

Außerdem kann eine bakterielle Kontamination der Proben trotz Waschung mit Penicillin und Streptomycin nicht sicher ausgeschlossen werden. Dadurch könnte der enzymatische Abbau beschleunigt oder verfälscht werden. Eine weitere Limitation der vorliegenden Studie ist die geringe Probenanzahl und die aus organisatorischen Gründen verhältnismäßig lange Lagerungszeit der Schweineaugen bis maximal 36 Stunden.

Die makroskopische Beurteilung der Flächenreduktion ist trotz der Verblindung eine subjektive und störanfällige Methode. Deshalb wurde zur objektiveren Beurteilung des enzymatischen Abbaus ein quantitatives Kollagenassay angewandt. Dieser quantitative Nachweis wurde bisher nicht im Zusammenhang mit CXL durchgeführt. Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen konnte, ebenso wie bei der Beurteilung der Flächenreduktion, kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen konnte nach 7 Tagen in den Gruppen CXL_{norm} + O₂ und in den beiden hyperbaren CXL-Gruppen signifikant geringere Kollagenmengen nachgewiesen werden. Dies spricht für einen langsameren Abbau durch Collagenase A in diesen Behandlungsgruppen und damit für den Nachweis einer höheren Stabilität der Corneae. Dies war durch die Bestimmung der Zeit bis zum vollständigen Abbau und die Messung der Flächenreduktion über die Zeit nicht nachweisbar. Möglicherweise stellt der quantitative Nachweis der gelösten Kollagenmenge eine Verbesserung der Methodik dar und kann durch eine Anpassung der Messzeitpunkte noch zu einer besseren Differenzierung zwischen den einzelnen CXL-Protokollen führen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit durch die enzymatische Testung keine verbesserte Effektivität des CXL unter hyperbaren Bedingungen bzw. mit einer erhöhten intrastromalen Sauerstoffkonzentration nachgewiesen werden. Der fehlende Nachweis einer Verbesserung ist möglicherweise aber auch auf die genannten Limitationen in dieser Arbeit zurückzuführen.

4.2.2 Biomechanische Stabilität

4.2.2.1 Druckprüfung

In der Diagnostik des Keratokonus existiert die Möglichkeit mittels ORA die Verformbarkeit der Hornhaut zu testen (Gatzioufas & Seitz, 2013). Anlehnend an dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe einer Materialprüfmaschine die benötigte Kraft zur Verformung der Hornhäute gemessen, um die durch CXL verbesserte Stabilität nachzuweisen. Bisher wurde diese Form der Materialprüfung nicht zur Überprüfung der Effektivität des CXL angewandt, daher können die Ergebnisse dieser Studie nicht mit anderen verglichen werden.

Das Elastizitätsmodul ist eine Größe, mit der beschrieben wird, wie widerstandsfähig ein Material gegen eine Verformung durch Druck oder Zug ist. Es wird durch das Hookesche Gesetz beschrieben. Dieses besagt, dass der Quotient aus der Spannung und der elastischen Längenänderung dem Elastizitätsmodul entspricht (Wesche, 1996). Angenommen durch CXL wird das Elastizitätsmodul erhöht, da die Hornhäute steifer werden, muss bei gleicher Fläche mehr Kraft für die Verformung der mit CXL behandelten Hornhäute aufgebracht werden als für die Verformung der unbehandelten Kontrollen. Basierend auf diesen theoretischen Überlegungen und der weiteren Annahme, dass die Effektivität des CXL durch eine erhöhte intrastromale Sauerstoffkonzentration verbessert wird, sollte für die Verformung der unbehandelten Kontrollen am wenigsten Kraft benötigt werden und dann in aufsteigender Reihenfolge die Gruppen CXL_{norm} , CXL_{hyp} , $CXL_{norm} + O_2$ und $CXL_{hyp} + O_2$ folgen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie entsprechen nur teilweise dieser Theorie. Für die Verformung der Gruppe $CXL_{hyp} + O_2$ wurde jeweils mehr Kraft benötigt als für die anderen Gruppen. Dies spricht dafür, dass die Kombination aus hyperbaren Bedingungen und zusätzlicher Sauerstoffgabe zu dem besten CXL-Ergebnis geführt hat. Allerdings entsprechen alle weiteren Ergebnisse nicht der zugrundeliegenden Hypothese. Insbesondere die Tatsache, dass für die unbehandelten Kontrollen im Vergleich zu den gecrosslinkten Hornhäuten teilweise mehr Kraft für die Verformung benötigt wird, lässt schlussfolgern, dass weitere Faktoren die Ergebnisse der Druckprüfung beeinflussen. Ein Haupteinflussfaktor könnte der Augeninnendruck sein, da dieser wahrscheinlich physiologisch und bedingt durch die Lagerung der Schweinaugen schwankt. Der Augeninnendruck wurde in der vorliegenden Studie allerdings nicht kontrolliert. Durch eine Standardisierung des Augeninnendruckes könnte die Messmethode möglicherweise verbessert werden.

Da es sich um eine nicht etablierte Methode handelt und daher keine vergleichbaren Experimente publiziert wurden, kann nicht abschließend beurteilt werden, ob die Druckprüfung zur Überprüfung der Effektivität des CXL geeignet ist. Im Zuge dessen erlauben die Ergebnisse dieser Arbeit keine endgültige Aussage über die Verbesserung der Effektivität des CXL bei erhöhter intrastromaler Sauerstoffkonzentration.

4.2.2.2 Zugprüfung

Zur weiteren biomechanischen Testung wurde eine Zugprüfung durchgeführt. Diese Methode ist bereits etabliert und wurde in zahlreichen Arbeiten zur Prüfung der Effektivität des CXL angewandt.

Wollensak et al. konnten zeigen, dass durch Standard-CXL die Steifigkeit der Hornhäute deutlich erhöht wird (Wollensak et al., 2003b). Dabei wurde zur Dehnung der behandelten porzinen Hornhäute 71,9 % mehr Spannung und zur Dehnung der humanen Hornhäute 328,9 % mehr Spannung benötigt als bei den unbehandelten Kontrollen. Andere Autoren konnten auch bei CXL-Protokollen mit einer Bestrahlungsintensität von 9 mW/cm^2 , wie in der vorliegenden Arbeit, eine Erhöhung der Steifigkeit der Hornhäute im Vergleich zu der Kontrollgruppe nachweisen (Hammer et al., 2014; Krueger et al., 2014; Schumacher et al., 2011). Wobei die Autoren im Vergleich zu der Effektivität des Standard-Protokolls mit 3 mW/cm^2 zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Hammer et al. konnten einen abnehmenden biomechanischen Effekt mit zunehmender UV-Intensität nachweisen, dabei wurde zur Dehnung der Standard-CXL-Gruppe signifikant mehr Spannung benötigt als für die Dehnung der Gruppe mit einer Bestrahlungsintensität von 9 mW/cm^2 . Krueger et al. und Schumacher et al. hingegen konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Bestrahlungsintensitäten messen.

Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass für die Dehnung gecrosslinkter Hornhäute mehr Spannung bzw. Kraft benötigt wird als für unbehandelte Hornhäute, da die Steifigkeit der Hornhäute durch CXL erhöht wird.

Des Weiteren haben einige Autoren bereits die Auswirkung einer zusätzlichen Sauerstoffzufuhr während CXL auf die biomechanischen Eigenschaften der Hornhäute untersucht (Diakonidis et al., 2016; Hill et al., 2020; Wang et al., 2020). Die Ergebnisse dieser Studien sind nicht eindeutig. Wang et al. zeigen, dass bei 6 und 8 % Dehnung das Elastizitätsmodul der Hornhäute aus der CXL-Gruppe mit zusätzlicher Sauerstoffzufuhr höher ist als in der Standard-CXL-Gruppe (Wang et al., 2020). Dies

deutet darauf hin, dass durch eine erhöhte intrastromale Sauerstoffverfügbarkeit die Effektivität des CXL erhöht werden kann. Hill et al. untersuchten den Einfluss von zusätzlichem Sauerstoff bei der Anwendung von transepitheliale CXL. Die Autoren konnten zeigen, dass die Erhöhung der Sauerstoffzufuhr bei transepitheliale CXL zu einem verbesserten CXL-Effekt führt. Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen der Standard-Epi-off-Gruppe und der transepithelialen CXL-Gruppe mit zusätzlichem Sauerstoff festgestellt werden.

Im Gegensatz zu diesen beiden Studien konnten Diakonis et al. in ihrer Arbeit keinen Vorteil einer zusätzlichen Sauerstoffzufuhr nachweisen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen humanen Hornhäuten, die mit akzeleriertem CXL mit einer UV-Intensität von 30 mW/cm^2 behandelt wurden, und der Behandlung mit demselben Protokoll mit zusätzlicher Sauerstoffzufuhr. Außerdem waren beide Behandlungsgruppen dem Standard-Protokoll unterlegen. Die fehlende Wirkung der zusätzlichen Sauerstoffgabe könnte dadurch zu erklären sein, dass in diesem Versuchsaufbau keine geschlossene Kammer zur Gewährleistung einer konstanten Erhöhung der Sauerstoffkonzentration verwendet wurde und außerdem eine sehr kurze Bestrahlungszeit von nur 3 Minuten gewählt wurde.

Basierend auf den zuvor diskutierten Studien und der Hypothese, dass die Effektivität des CXL durch eine erhöhte intrastromale Sauerstoffkonzentration zunimmt, sollte für die Dehnung der unbehandelten Kontrollen am wenigsten Kraft benötigt werden und dann in aufsteigender Reihenfolge die Gruppen CXL_{norm} , CXL_{hyp} , $\text{CXL}_{\text{norm}} + \text{O}_2$ und $\text{CXL}_{\text{hyp}} + \text{O}_2$ folgen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen, dass die Steifigkeit der Hornhäute durch CXL zunimmt, da für die Dehnung aller Behandlungsgruppen signifikant mehr Kraft benötigt wurde als für die Kontrollgruppe. Der Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen entspricht nicht vollständig den erwarteten Ergebnissen. Zwischen den Gruppen CXL_{norm} und $\text{CXL}_{\text{hyp}} + \text{O}_2$ konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Außerdem wurde für die Dehnung der Hornhäute aus Gruppe $\text{CXL}_{\text{norm}} + \text{O}_2$ mehr Kraft benötigt als für die Gruppe $\text{CXL}_{\text{hyp}} + \text{O}_2$, wobei in letzterer eine signifikant höhere Sauerstoffkonzentration nachgewiesen werden konnte.

Diese unerwarteten Ergebnisse könnten zum einen durch die kleine Fallzahl der Studie und zum anderen durch die teilweise große Streuung der Messwerte erklärt werden. Dadurch, dass Augen von verschiedenen Schweinen miteinander verglichen wurden, kann auch von interindividuellen Unterschieden ausgegangen werden, die die Messwerte möglicherweise verfälschen könnten.

In der vorliegenden Studie wurde für die Messung der intrastromalen Sauerstoffsättigung ein Tunnel in die Hornhäute gelasert. Dieser könnte zusätzlich die Biomechanik beeinflussen. Trotz einer möglichst standardisierten Vorgehensweise ergeben sich durch das manuelle Zuschneiden der Hornhautstreifen wahrscheinlich Schwankungen in der Streifenbreite. Dies könnte zu Unterschieden zwischen den einzelnen Proben führen, die nicht auf die CXL-Behandlung zurückzuführen sind bzw. ebenfalls eine Erklärung für die Streuung der Messdaten darstellen. Seiler et al. konnten in ihrer Studie zur intrastromalen Riboflavinapplikation zwar zeigen, dass in diesem Fall der gelaserte Tunnel nicht zu einer signifikanten Veränderung der Biomechanik führt, allerdings beträgt die Tunnelbreite nur 0,4 mm im Vergleich zu 1,2 mm in der vorliegenden Studie (Seiler et al., 2014).

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass CXL zu einer erhöhten Steifigkeit der Hornhäute führt. Es kann keine abschließende Aussage über den Einfluss der erhöhten intrastromalen Sauerstoffkonzentration während CXL gemacht werden. Da einzelne unerwartete Ergebnisse durch die genannten Limitationen der Studie erklärt werden können, sollten weitere Untersuchungen mit größerer Fallzahl zur Effektivität des CXL bei erhöhter intrastromaler Sauerstoffkonzentration durchgeführt werden.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Modifizierte CXL-Protokolle, wie transepitheliales und akzeleriertes CXL, haben bisher nicht die gleiche Effektivität gezeigt wie das etablierte Standard-Protokoll. Dies wird von einigen Autoren auf eine zu niedrige Sauerstoffverfügbarkeit zurückgeführt (Liu Y, Liu Y, Zhang Y-N, et al., 2017). Durch eine Erhöhung der Sauerstoffverfügbarkeit während CXL könnte die Effektivität von modifizierten CXL-Protokollen verbessert werden und somit die Behandlung des Keratokonus noch sicherer, nebenwirkungsärmer und zeitsparender gestaltet werden (Hill et al., 2020; Richoz et al., 2013).

Die vorliegende Studie untersuchte zum einen, ob die intrastromale Sauerstoffkonzentration während CXL durch hyperbare Bedingungen und zusätzliche Sauerstoffgabe erhöht werden kann und zum anderen, ob dies zu einer verbesserten Effektivität des CXL führt. Dafür wurden porcine Hornhäute in einer Sauerstoffdruckkammer unter hyperbaren Bedingungen und zusätzlicher Sauerstoffgabe gecrosslinkt und gleichzeitig der Verlauf der Sauerstoffkonzentration

im Stroma mittels Oxymeter gemessen. Anschließend wurde die Resistenz der Hornhäute gegen den Abbau durch Collagenase A überprüft und die Veränderung der biomechanischen Eigenschaften mittels Druck- und Zugprüfung getestet, um die Effektivität des CXL nachzuweisen.

Durch die Messung der intrastromalen Sauerstoffkonzentration konnte gezeigt werden, dass diese durch zusätzliche Sauerstoffgabe und hyperbare Bedingungen erhöht werden kann. Die höchste intrastromale Sauerstoffkonzentration wurde durch die Kombination aus zusätzlicher Sauerstoffzufuhr und hyperbaren Bedingungen erreicht, dabei konnte auch während des CXL eine konstant hohe Sauerstoffkonzentration aufrechterhalten werden. Die Studie konnte in Bezug auf die Effektivität des CXL keine Überlegenheit der CXL-Protokolle mit erhöhter intrastromaler Sauerstoffkonzentration nachweisen. Allerdings wird durch die diskutierten Limitationen der Nachweismethoden deutlich, dass die Notwendigkeit für weitere Anpassungen und Verbesserungen besteht. Aufgrund der erhobenen Messdaten kann somit keine abschließende Aussage über die Auswirkung der verbesserten Sauerstoffverfügbarkeit auf die Effektivität des CXL getroffen werden.

Falls sich im Laufe weiterer Studien die Bedeutung des Sauerstoffs für das CXL-Ergebnis bestätigen lässt, sollte untersucht werden, ob sich durch HBO auch die intrastromale Sauerstoffkonzentration während transepitheliale CXL erhöht. Damit könnte die Behandlung des Keratokonus bei gleicher Effektivität durch Belassen des Epithels nebenwirkungsärmer werden.

Folgend besteht bei Bestätigung der verbesserten Effektivität des CXL durch eine erhöhte Sauerstoffversorgung die Notwendigkeit In-vivo-Studien durchzuführen, um diese Ergebnisse am Patienten zu reproduzieren. Obwohl bislang keine schweren Nebenwirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie auf das Auge bekannt sind (Oguz & Sobaci, 2008), müsste in diesem Kontext selbstverständlich auch potentielle Nebenwirkungen evaluiert werden.

Literatur-und Quellenverzeichnis

- Abalain, J. H., Dossou, H., Colin, J., & Floch, H. H. (2000). Levels of Collagen Degradation Products (Teloepitides) in the Tear Film of Patients with Keratoconus. *Cornea*, *19*(4), 474–476. <https://doi.org/10.1097/00003226-200007000-00014>
- Aldahlawi, N. H., Hayes, S., O’Brart, D. P. S., & Meek, K. M. (2015). Standard versus accelerated riboflavin–ultraviolet corneal collagen crosslinking: Resistance against enzymatic digestion. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, *41*(9), 1989–1996. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2015.10.004>
- Aldahlawi, N. H., Hayes, S., O’Brart, D. P. S., O’Brart, N. D., & Meek, K. M. (2016). An investigation into corneal enzymatic resistance following epithelium-off and epithelium-on corneal cross-linking protocols. *Experimental Eye Research*, *153*, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.10.014>
- Belin, M., & Ambrósio, R. (2013). Scheimpflug imaging for keratoconus and ectatic disease. *Indian Journal of Ophthalmology*, *61*(8), 401. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.116059>
- Brekelmans, J., Veugen, J., Rieff, K., Dickman, M. M., Goz, A., Wolffs, P., Brandis, A., Berendschot, T. T. J. M., Nuijts, R. M. M. A., Scherz, A., & Marcovich, A. L. (2020). Enzymatic Digestion of Porcine Corneas Cross-linked by Hypo- and Hyperosmolar Formulations of Riboflavin/ultraviolet A or WST11/Near-Infrared Light. *Translational Vision Science & Technology*, *9*(10), 4. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.10.4>
- Bühren, J., Bischoff, G., & Kohnen, T. (2011). Keratokonus: Klinik, Diagnostik, Therapiemöglichkeiten. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, *228*(10), 923–942. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280224>
- Bunsen, R., & Roscoe, H. (1863). Photochemische Untersuchungen. *Annalen der Physik und Chemie*, *193*(12), 529–562. <https://doi.org/10.1002/andp.18631931202>
- Colin, J., & Velou, S. (2003). Current surgical options for keratoconus. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, *29*(2), 379–386. [https://doi.org/10.1016/S0886-3350\(02\)01968-5](https://doi.org/10.1016/S0886-3350(02)01968-5)
- Cursiefen, C., Schaub, F., & Bachmann, B. (2016). Update: Tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik (DALK) bei Keratokonus: Wann, Wie und Warum. *Der Ophthalmologe*, *113*(3), 204–212. <https://doi.org/10.1007/s00347-015-0204-6>
- Davidson, A. E., Hayes, S., Hardcastle, A. J., & Tuft, S. J. (2014). The pathogenesis of keratoconus. *Eye*, *28*(2), 189–195. <https://doi.org/10.1038/eye.2013.278>
- Diakonis, V. F., Likht, N. Y., Yesilirmak, N., Delgado, D., Karatapanis, A. E., Yesilirmak, Y., Fraker, C., Yoo, S. H., & Ziebarth, N. M. (2016). Corneal elasticity after oxygen enriched high intensity corneal cross linking assessed using atomic force microscopy. *Experimental Eye Research*, *153*, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.10.008>
- Duke-Elder, S. L. (1965). *System of ophthalmology VolIII: diseases of the outer eye part 2*.
- Edwards, M., McGhee, C. N., & Dean, S. (2001). The genetics of keratoconus. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, *29*(6), 345–351. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9071.2001.d01-16.x>
- Fernandes, B. F., Logan, P., Zajdenweber, Moyses. E., Santos, L. N., Cheema, D. P., & Burnier, M. N. (2008). Histopathological study of 49 cases of keratoconus. *Pathology*, *40*(6), 623–626. <https://doi.org/10.1080/00313020802320648>
- Freeman, R. D. (1972). Oxygen consumption by the component layers of the cornea. *The Journal of Physiology*, *225*(1), 15–32. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1972.sp009927>
- Gatzioufas, Z., & Seitz, B. (2013). Neues zur Biomechanik der Kornea beim Keratokonus. *Der Ophthalmologe*, *110*(9), 810–817. <https://doi.org/10.1007/s00347-013-2818-x>
- Godefrooij, D. A., Gans, R., Imhof, S. M., & Wisse, R. P. L. (2016). Nationwide reduction in the number of corneal transplantations for keratoconus following the implementation of cross-linking. *Acta Ophthalmologica*, *94*(7), 675–678. <https://doi.org/10.1111/aos.13095>

- Goebels, S., Eppig, T., Seitz, B., & Langenbucher, A. (2013). Früherkennung des Keratokonus—Systemassistierte Screening-Verfahren heute. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 230(10), 998–1004. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328694>
- Greenstein, S. A., Fry, K. L., Bhatt, J., & Hersh, P. S. (2010). Natural history of corneal haze after collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: Scheimpflug and biomicroscopic analysis. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 36(12), 2105–2114. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.06.067>
- Grünauer-Kloevekorn, C., & Duncker, G. (2006). Keratokonus: Epidemiologie, Risikofaktoren und Diagnostik. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 223(6), 493–502. <https://doi.org/10.1055/s-2005-859021>
- Hammer, A., Richoz, O., Mosquera, S. A., Tabibian, D., Hoogewoud, F., & Hafezi, F. (2014). Corneal Biomechanical Properties at Different Corneal Cross-Linking (CXL) Irradiances. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(5), 2881. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13748>
- Händel, A., Siebelmann, S., Matthaei, M., Moalem, Y., Cursiefen, C., & Bachmann, B. (2019). Therapie des Keratokonus. *Karger Kompass Ophthalmologie*, 5(1), 8–13. <https://doi.org/10.1159/000496592>
- Hill, J., Liu, C., Dearnorff, P., Tavakol, B., Eddington, W., Thompson, V., Gore, D., Raizman, M., & Adler, D. C. (2020). Optimization of Oxygen Dynamics, UV-A Delivery, and Drug Formulation for Accelerated Epi-On Corneal Crosslinking. *Current Eye Research*, 45(4), 450–458. <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1669663>
- Jaeger, K., Jüttner, B., & Franko, W. (2002). Hyperbar Oxygen Therapy—Options and Limitations. *ains · Anästhesiologie · Intensivmedizin · Notfallmedizin · Schmerztherapie*, 37(1), 38–42. <https://doi.org/10.1055/s-2002-20080>
- Jhanji, V., Sharma, N., & Vajpayee, R. B. (2011). Management of keratoconus: Current scenario. *British Journal of Ophthalmology*, 95(8), 1044–1050. <https://doi.org/10.1136/bjo.2010.185868>
- Kamaev, P., Friedman, M. D., Sherr, E., & Muller, D. (2012). Photochemical Kinetics of Corneal Cross-Linking with Riboflavin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(4), 2360. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9385>
- Kanellopoulos, A. J., Loukas, Y. L., & Asimellis, G. (2016). Cross-Linking Biomechanical Effect in Human Corneas by Same Energy, Different UV-A Fluence: An Enzymatic Digestion Comparative Evaluation. *Cornea*, 35(4), 557–561. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000758>
- Kobashi, H., & Rong, S. S. (2017). Corneal Collagen Cross-Linking for Keratoconus: Systematic Review. *BioMed Research International*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/8145651>
- Kohlhaas, M. (2008). Kollagen-Crosslinking mit Riboflavin und UVA-Licht beim Keratokonus. *Der Ophthalmologe*, 105(8), 785–796. <https://doi.org/10.1007/s00347-008-1739-6>
- Kohlhaas, M. (2017). Komplikationen und postoperative Therapiestrategien beim Crosslinking. *Der Ophthalmologe*, 114(8), 693–696. <https://doi.org/10.1007/s00347-017-0511-1>
- Kohlhaas, M., Schilde, T., Unger, G., Wittig, C., & Pillunat, L. E. (2006). Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneastreated with riboflavin and ultraviolet A light. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 32(2), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2005.12.092>
- Koller, T., Mrochen, M., & Seiler, T. (2009). Complication and failure rates after corneal crosslinking. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 35(8), 1358–1362. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2009.03.035>
- Koller, T., & Seiler, T. (2007). Therapeutische Quervernetzung der Hornhaut mittels UVA und Riboflavin. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 224(09), 700–706. <https://doi.org/10.1055/s-2007-963492>
- Krachmer, J. H., Feder, R. S., & Belin, M. W. (1984). Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Survey of Ophthalmology*, 28(4), 293–322. [https://doi.org/10.1016/0039-6257\(84\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0039-6257(84)90094-8)
- Krueger, R. R., Herekar, S., & Spoerl, E. (2014). First Proposed Efficacy Study of High Versus Standard Irradiance and Fractionated Riboflavin/Ultraviolet A Cross-Linking With Equivalent

- Energy Exposure. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, 40(6), 353–357. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000095>
- Krumeich, J. H., Daniel, J., & Knülle, A. (1998). Live-epikeratophakia for keratoconus. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 24(4), 456–463. [https://doi.org/10.1016/S0886-3350\(98\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0886-3350(98)80284-8)
- Li, J., Ji, P., & Lin, X. (2015). Efficacy of Corneal Collagen Cross-Linking for Treatment of Keratoconus: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLOS ONE*, 10(5), e0127079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127079>
- Li, W., & Wang, B. (2017). Efficacy and safety of transepithelial corneal collagen crosslinking surgery versus standard corneal collagen crosslinking surgery for keratoconus: A meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Ophthalmology*, 17(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12886-017-0657-2>
- Liu Y, Liu Y, Zhang Y-N, et al. (2017). Systematic review and Meta-analysis comparing modified cross-linking and standard cross-linking for progressive keratoconus. *International Journal of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.18240/ijo.2017.09.15>
- Mackiewicz, Z., Määttä, M., Stenman, M., Konttinen, L., Tervo, T., & Konttinen, Y. T. (2006). Collagenolytic Proteinases in Keratoconus. *Cornea*, 25(5), 603–610. <https://doi.org/10.1097/01.icc.0000208820.32614.00>
- Maier, P., Reinhard, T., & Kohlhaas, M. (2019). Corneal collagen cross-linking in the stabilization of keratoconus. *Deutsches Ärzteblatt Online*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0184>
- Matthys, A., Cassagne, M., Galiacy, S. D., El Hout, S., Fournié, P., & Malecaze, F. (2021). Transepithelial Corneal Cross-linking With Supplemental Oxygen in Keratoconus: 1-Year Clinical Results. *Journal of Refractive Surgery*, 37(1), 42–48. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20201111-01>
- Mazzotta, C., Sgheri, A., Bagaglia, S. A., Rechichi, M., & Di Maggio, A. (2020). Customized corneal crosslinking for treatment of progressive keratoconus: Clinical and OCT outcomes using a transepithelial approach with supplemental oxygen. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 46(12), 1582–1587. <https://doi.org/10.1097/j.jcrs.00000000000000347>
- Mazzotta, C., Traversi, C., Paradiso, A. L., Latronico, M. E., & Rechichi, M. (2014). Pulsed Light Accelerated Crosslinking versus Continuous Light Accelerated Crosslinking: One-Year Results. *Journal of Ophthalmology*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/604731>
- Meek, K. M., Tuft, S. J., Huang, Y., Gill, P. S., Hayes, S., Newton, R. H., & Bron, A. J. (2005). Changes in Collagen Orientation and Distribution in Keratoconus Corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(6), 1948. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-1253>
- Műßig, L., Zemova, E., Pattmüller, J., Seitz, B., Eppig, T., Szentmáry, N., & Langenbucher, A. (2014). Gerätegestützte Diagnostikverfahren des Keratokonus im Vergleich. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 231(12), 1215–1223. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1368599>
- Naderan, M., Jahanrad, A., & Balali, S. (2017). Histopathologic findings of keratoconus corneas underwent penetrating keratoplasty according to topographic measurements and keratoconus severity. *International Journal of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.18240/ijo.2017.11.02>
- Oguz, H., & Sobaci, G. (2008). The Use of Hyperbaric Oxygen Therapy in Ophthalmology. *Survey of Ophthalmology*, 53(2), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2007.12.002>
- Rabinowitz, Y. S. (1998). Keratoconus. *Survey of Ophthalmology*, 42(4), 297–319. [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(97\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(97)00119-7)
- Raiskup, F., Pinelli, R., & Spoerl, E. (2012). Riboflavin Osmolar Modification for Transepithelial Corneal Cross-Linking. *Current Eye Research*, 37(3), 234–238. <https://doi.org/10.3109/02713683.2011.637656>
- Raiskup, F., & Spoerl, E. (2013). Corneal Crosslinking with Riboflavin and Ultraviolet A. I. Principles. *The Ocular Surface*, 11(2), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2013.01.002>
- Raiskup, F., Veliká, V., Veselá, M., & Spörl, E. (2015). Hornhautvernetzung beim Keratokonus: „Epi-off“ oder „Epi-on“? *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 232(12), 1392–1396. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546155>

- Richoz, O., Hammer, A., Tabibian, D., Gatzoufas, Z., & Hafezi, F. (2013). The Biomechanical Effect of Corneal Collagen Cross-Linking (CXL) With Riboflavin and UV-A is Oxygen Dependent. *Translational Vision Science & Technology*, 2(7), 6. <https://doi.org/10.1167/tvst.2.7.6>
- Rohrbach, J., Szurman, P., El-Wardani, M., & Grüb, M. (2006). Zur Häufigkeit der exzessiven Verdickung der epithelialen Basalmembran beim Keratokonus. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 223(11), 889–893. <https://doi.org/10.1055/s-2006-927096>
- Romero-Jiménez, M., Santodomingo-Rubido, J., & Wolffsohn, J. S. (2010). Keratoconus: A review. *Contact Lens and Anterior Eye*, 33(4), 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2010.04.006>
- Sanchez, I., Martin, R., Ussa, F., & Fernandez-Bueno, I. (2011). The parameters of the porcine eyeball. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 249(4), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s00417-011-1617-9>
- Schilde, T., Kohlhaas, M., Spoerl, E., & Pillunat, L. E. (2008). Enzymatischer Nachweis der Tiefenabhängigkeit der Vernetzungswirkung von Riboflavin/UVA an der Hornhaut. *Der Ophthalmologe*, 105(2), 165–169. <https://doi.org/10.1007/s00347-007-1587-9>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schumacher, S., Oeftiger, L., & Mrochen, M. (2011). Equivalence of Biomechanical Changes Induced by Rapid and Standard Corneal Cross-linking, Using Riboflavin and Ultraviolet Radiation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(12), 9048. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7818>
- Seiler, T. G., Fischinger, I., Senfft, T., Schmidinger, G., & Seiler, T. (2014). Intrastromal Application of Riboflavin for Corneal Crosslinking. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(7), 4261. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14021>
- Seiler, T. G., Komninou, M. A., Nambiar, M. H., Schuerch, K., Frueh, B. E., & Büchler, P. (2020). Oxygen kinetics during corneal crosslinking with and without supplementary oxygen. *American Journal of Ophthalmology*, S0002939420306292. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2020.11.001>
- Seiler, Theo. G., Schmidinger, G., Fischinger, I., Koller, T., & Seiler, T. (2013). Komplikationen der Vernetzung der Hornhaut. *Der Ophthalmologe*, 110(7), 639–644. <https://doi.org/10.1007/s00347-012-2682-0>
- Seitz, B., Cursiefen, C., El-Husseiny, M., Viestenz, A., Langenbacher, A., & Szentmáry, N. (2013). DALK und perforierende Laserkeratoplastik bei fortgeschrittenem Keratokonus. *Der Ophthalmologe*, 110(9), 839–848. <https://doi.org/10.1007/s00347-013-2822-1>
- Shajari, M., Kolb, C. M., Agha, B., Steinwender, G., Müller, M., Herrmann, E., Schmack, I., Mayer, W. J., & Kohnen, T. (2019). Comparison of standard and accelerated corneal cross-linking for the treatment of keratoconus: A meta-analysis. *Acta Ophthalmologica*, 97(1), e22–e35. <https://doi.org/10.1111/aos.13814>
- Sherwin, T., & Brookes, N. H. (2004). Morphological changes in keratoconus: Pathology or pathogenesis. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 32(2), 211–217. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2004.00805.x>
- Spoerl, E., Huhle, M., & Seiler, T. (1998). Induction of Cross-links in Corneal Tissue. *Experimental Eye Research*, 66(1), 97–103. <https://doi.org/10.1006/exer.1997.0410>
- Spoerl, E., Mrochen, M., Sliney, D., Trokel, S., & Seiler, T. (2007). Safety of UVA-Riboflavin Cross-Linking of the Cornea. *Cornea*, 26(4), 385–389. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3180334f78>
- Spoerl, E., Wollensak, G., & Seiler, T. (2004). Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Current Eye Research*, 29(1), 35–40. <https://doi.org/10.1080/02713680490513182>
- Stachs, O., Bochert, A., Gerber, T., Koczan, D., Thiessen, H. J., & Guthoff, R. F. (2004). Die Struktur der Extrazellulärmatrix bei Keratokonus. *Der Ophthalmologe*, 101(4), 384–389.

<https://doi.org/10.1007/s00347-003-0902-3>

- Stoiber, J. (2008). Die stadiengerechte Therapie des Keratokonus. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 225(08), R121–R141. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1038426>
- Sykakis, E., Karim, R., Evans, J. R., Bunce, C., Amissah-Arthur, K. N., Patwary, S., McDonnell, P. J., & Hamada, S. (2015). Corneal collagen cross-linking for treating keratoconus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010621.pub2>
- Toker, E., Çerman, E., Özcan, D. Ö., & Seferoğlu, Ö. B. (2017). Efficacy of different accelerated corneal crosslinking protocols for progressive keratoconus. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 43(8), 1089–1099. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2017.05.036>
- Torres-Netto, E. A., Kling, S., Hafezi, N., Vinciguerra, P., Randleman, J. B., & Hafezi, F. (2018). Oxygen Diffusion May Limit the Biomechanical Effectiveness of Iontophoresis-Assisted Transepithelial Corneal Cross-linking. *Journal of Refractive Surgery*, 34(11), 768–774. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20180830-01>
- Tuft, S. J., Moodaley, L. C., Gregory, W. M., Davison, C. R., & Buckley, R. J. (1994). Prognostic Factors for the Progression of Keratoconus. *Ophthalmology*, 101(3), 439–447. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(94\)31313-3](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(94)31313-3)
- Vinciguerra, P., Randleman, J. B., Romano, V., Legrottaglie, E. F., Rosetta, P., Camesasca, F. I., Piscopo, R., Azzolini, C., & Vinciguerra, R. (2014). Transepithelial Iontophoresis Corneal Collagen Cross-linking for Progressive Keratoconus: Initial Clinical Outcomes. *Journal of Refractive Surgery*, 30(11), 746–753. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20141021-06>
- Wagner, H., Barr, J. T., & Zadnik, K. (2007). Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study: Methods and findings to date. *Contact Lens and Anterior Eye*, 30(4), 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2007.03.001>
- Wang, J., Wang, L., Li, Z., Wang, Y. M., Zhu, K., & Mu, G. (2020). Corneal Biomechanical Evaluation After Conventional Corneal Crosslinking With Oxygen Enrichment. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, 46(5), 306–309. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000645>
- Wernli, J., Schumacher, S., Spoerl, E., & Mrochen, M. (2013). The Efficacy of Corneal Cross-Linking Shows a Sudden Decrease with Very High Intensity UV Light and Short Treatment Time. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(2), 1176. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11409>
- Wesche, K. (1996). Baustoffkenngrößen. In K. Wesche (Hrsg.), *Baustoffe für tragende Bauteile: Band 1: Grundlagen. Baustoffkenngrößen, Meß- und Prüftechnik, Statistik und Qualitätssicherung* (S. 28–182). Vieweg+Teubner Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-322-80189-0_2
- Wollensak, G. (2006). Crosslinking treatment of progressive keratoconus: New hope. *Current Opinion in Ophthalmology*, 17(4), 356–360. <https://doi.org/10.1097/01.icu.0000233954.86723.25>
- Wollensak, G., & Iomdina, E. (2009). Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 35(3), 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2008.11.036>
- Wollensak, G., Spoerl, E., & Seiler, T. (2003a). Riboflavin/ultraviolet-a–induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*, 135(5), 620–627. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(02\)02220-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(02)02220-1)
- Wollensak, G., Spoerl, E., & Seiler, T. (2003b). Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin–ultraviolet-A-induced cross-linking. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 29(9), 1780–1785. [https://doi.org/10.1016/S0886-3350\(03\)00407-3](https://doi.org/10.1016/S0886-3350(03)00407-3)
- Ziaei, M., Gokul, A., Vellara, H., Patel, D., & McGhee, C. N. J. (2020). Prospective two year study of changes in corneal density following transepithelial pulsed, epithelium-off continuous and epithelium-off pulsed, corneal crosslinking for keratoconus. *Contact Lens and Anterior Eye*, 43(5), 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2020.03.004>

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Geerling dafür, dass er mir ermöglicht hat, meine Promotion an seinem Institut durchzuführen.

Ich bedanke mich bei meinem Erstgutachter und Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Johannes Menzel-Severing für die hervorragende persönliche Betreuung. Herrn Prof. Dr. med. Johannes Schnependahl danke ich für die Übernahme der Zweitgutachterfunktion meiner Promotionsarbeit.

Insbesondere danke ich Frau Dr. rer. nat. Joana Witt für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die stetige Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen. Bei den Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Ophthalmologie des Universitätsklinikums Düsseldorf möchte ich mich für die freundliche und hilfsbereite Aufnahme bedanken.

Ich danke Herrn Dr. med. Sven Dreyer für die Möglichkeit meine Versuche in der Druckkammer des Universitätsklinikums Düsseldorf durchführen zu dürfen und dem gesamten Team der Druckkammer für die investierte Zeit und die Hilfe bei den zahlreichen Messungen vor Ort.

Außerdem bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieses Promotionsprojekts durch die Dr. Rolf M. Schwiete Stiftung und den Sicca-Förderpreis 2021 des Ressorts Trockenes Auge und Oberflächenerkrankungen des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands gefördert durch die Firma Bausch und Lomb.