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

"*Epi-off*" und "*Epi-on*"

Korneales Kollagen-*Cross-Linking* mit hyperbarem Sauerstoff: Verbesserte Sauerstoff-Verfügbarkeit und korneale Stabilität?

Dissertation

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

vorgelegt von

Theresa Margaritha Streit

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: PD Dr. med. Martin Neukirchen

"Das Wichtigste ist, dass man nicht aufhört, zu fragen."

Albert Einstein

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Menzel-Severing J, Seiler T G, Streit T, Schmiedel J, Dreyer S, Witt J & Geerling G, (2024), *Hyperbaric Oxygenation Maintains Elevated Stromal Oxygen Availability During Corneal Collagen Crosslinking with and Without Epithelial Removal,*

Current Eye Research, 1-7.

Zusammenfassung

Korneales Kollagen-*Cross-Linking* (CXL) ist ein etabliertes, sauerstoffabhängiges Therapieverfahren bei Keratokonus. Während das korneale Epithel in sogenannten "*Epi-off*"-Protokollen mittels Epithelabrasio entfernt wird, verbleibt es beim "*Epi-on*"-CXL intakt. In einem *ex-vivo* Modell testeten wir anhand von Schweinehornhäuten die Hypothese, dass die Verwendung hyperbaren Sauerstoffs die intrakorneale Sauerstoffkonzentration während des *Epi-off*- und *Epi-on*-CXL erhöhen und die Wirkung von CXL verstärken kann.

Wir führten *Epi-off-* und *Epi-on-*CXL (3 mW/cm²) mit intrakornealen Sauerstoffmessungen an porzinen Hornhäuten unter normobaren (1 bar) oder hyperbaren Bedingungen (2,4 bar), mit und ohne zusätzlichen Sauerstoff, in einer Druckkammer durch. Anschließend verglichen wir die Interventionsgruppen hinsichtlich ihrer Zug- und Druckstabilität sowie ihrer Resistenz gegenüber einem enzymatischen Verdau (0,01 U/ml Kollagenase A) mit unbehandelten Kontrollhornhäuten.

Die Gabe von zusätzlichem Sauerstoff während des CXL konnte bei den *Epi-off-* und den *Epi-on-*Gruppen sowohl unter normobaren als auch unter hyperbaren Bedingungen die mittlere intrakorneale Sauerstoffkonzentration am Ende des CXL signifikant erhöhen (normobar: p = 0,0293, p = 0,0005, hyperbar: p = 0,0011, p = 0,0380). Bezüglich der biomechanischen Eigenschaften zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Zeit bis zum vollständigen enzymatischen Verdau erhöhte sich von 3 ± 0 Tage in der normobaren auf $5,4 \pm 1,7$ Tage in der hyperbaren *Epi-off-*Gruppe (p = 0,0252).

Hyperbare Sauerstoffbedingungen erhöhten die intrakorneale Sauerstoffkonzentration während des *Epi-off-* und *Epi-on-*CXL, führten allerdings nicht zu einer verbesserten kornealen Biomechanik. Dies ist möglicherweise auf die Dicke der verwendeten Schweinehornhäute in unserem Modell zurückzuführen (durchschnittlich 800 - 900 µm), da CXL vor allem in den vorderen 400 µm der Hornhaut wirkt. Zukünftige Versuche sollten daher an dünneren Hornhautproben durchgeführt werden.

Abstract

Corneal collagen cross-linking (CXL) is an established, oxygen dependent treatment for patients with keratoconus. According to different treatment protocols the corneal epithelium is either removed in advance (epithelium-off) or remains intact during the treatment (epithelium-on). Using an ex-vivo porcine cornea model, we tested the hypothesis that hyperbaric oxygen can increase intracorneal oxygen concentrations during epithelium-off and epithelium-on CXL, enhancing the effects of CXL.

CXL was performed using UV-A irradiances of 3 mW/cm² on porcine corneas under normobaric (1 bar) or hyperbaric conditions (2.4 bar) in a hyperbaric treatment chamber, both with and without supplemented oxygen, on epithelium-off and epithelium-on groups. Intracorneal oxygen concentrations were measured during irradiation. Biomechanical properties in terms of tensile and compression tests as well as corneal resistance to enzymatic digestion (0.01 U/ml Collagenase A) were chosen as efficacy outcomes. Untreated porcine corneas served as controls.

Considering epithelium-off and epithelium-on groups respectively, supplemental oxygen under normobaric as well as under hyperbaric pressure conditions could significantly elevate the mean intracorneal oxygen concentration at the end of CXL (normobaric: p = 0.0293, p = 0.0005, hyperbaric: p = 0.0011, p = 0.0380). Biomechanical properties showed no statistically significant differences between the treatment groups. Mean enzymatic digestion time increased from 3 ± 0 days in the normobaric to 5.4 ± 1.7 days in the hyperbaric epithelium-off group (p = 0.0252).

While hyperbaric oxygen conditions increase intracorneal oxygen concentrations during CXL regardless of the epithelial condition, they did not affect the biomechanical properties of full thickness porcine corneas. However, as the effect of CXL is usually limited to the anterior $400 \,\mu\text{m}$ of corneal tissue and since the average porcine cornea is around $800 - 900 \,\mu\text{m}$ thick, we may have easily missed any stiffening effect and plan to further assess potential advantages of hyperbaric oxygen during CXL on thinner specimens.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CXL	Corneal collagen cross-linking; Korneales Kollagen-Cross-Linking
d	Tage
DALK	Tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dpt	Dioptrien
Epi-off	Korneales Kollagen-Cross-Linking mit Epithelabrasio
Epi-on	Transepitheliales Korneales Kollagen-Cross-Linking
G	Gauge
HBO	Hyperbare Sauerstofftherapie
ICRS	Intrastromale korneale Ringsegmente
K _{max}	Maximale Hornhautbrechkraft
kPa	Kilopascal
L	Liter
Lot No.	Chargennummer
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mW	Milliwatt
Ν	Newton
n	Fallzahl
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
р	Signifikanzniveau
Pa	Pascal
PBS	Phosphate buffered saline
РКР	Perforierende Keratoplastik
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
rpm	Revolutions per minute
S	Sekunden
SD	Standardabweichung
TW	Thin Wall
U	Units
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
UV	Ultraviolettstrahlung
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Zı	usam	menfas	sung I	
A	bstra	ict		
A	bkür	zungsvo	erzeichnisIII	
In	halts	sverzeic	hnisV	
1	Ein	Einleitung		
	1.1	Aufba	u der Hornhaut1	
	1.2	Kerato	vkonus1	
		1.2.1	Epidemiologie des Keratokonus1	
		1.2.2	Ätiologie des Keratokonus2	
		1.2.3	Klinik des Keratokonus	
		1.2.4	Diagnostik des Keratokonus	
		1.2.5	Therapie des Keratokonus4	
	1.3	Korne	ales Kollagen-Cross-Linking als Therapie bei Keratokonus4	
		1.3.1	Korneales Kollagen-Cross-Linking im experimentellen Kontext	
		1.3.2	Sauerstoffabhängigkeit des Kornealen Kollagen-Cross-Linkings	
	1.4	Hypot	hese der Arbeit	
	1.5	Ziele o	ler Arbeit	
2	Mat	terial u	nd Methoden10	
	2.1	Prober	ngewinnung10	
	2.2	Epi-of	<i>F</i> -Versuchsreihe	
		2.2.1	Korneales Kollagen-Cross-Linking mit intrakornealer Sauerstoffmessung .15	
		2.2.2	Biomechanische Prüfung (Zug- und Druckprüfung)18	
		2.2.3	Enzymatische Prüfung (Kollagen-Assay und vollständiger Verdau)21	
	2.3	Epi-on	-Versuchsreihe	
		2.3.1	Korneales Kollagen-Cross-Linking mit intrakornealer Sauerstoffmessung .22	
		2.3.2	Biomechanische Prüfung (Zugprüfung)22	
	2.4	2.4 Statistische Analyse		

3	Ergebnisse			
	3.1	3.1 <i>Epi-off</i> -Versuchsreihe		24
		3.1.1	Intrakorneale Sauerstoffmessung	24
		3.1.2	Zugprüfung	28
		3.1.3	Druckprüfung	31
		3.1.4	Enzymatische Prüfung anhand eines Kollagen-Assays	34
		3.1.5	Enzymatische Prüfung anhand des vollständigen Verdaus	37
	3.2 <i>Epi-on</i> -Versuchsreihe		38	
		3.2.1	Intrakorneale Sauerstoffmessung	38
		3.2.2	Zugprüfung	42
	3.3	Epi-o <u>f</u>	f versus Epi-on	46
		3.3.1	Epi-off versus Epi-on: Intrakorneale Sauerstoffmessung	46
		3.3.2	Epi-off versus Epi-on: Zugprüfung	48
4	Dis	kussior	1	51
	4.1	Korne	ales Kollagen-Cross-Linking mit intrakornealer Sauerstoffmessung	
	4.2 Biomechanische Stabilität anhand von Zugnrüfungen			
	4.3 Biomechanische Stabilität anhand von Druckprüfungen		57	
	4.4 Enzymatische Prüfung		58	
	4.5	Epi-o <u>f</u>	f versus Epi-on	62
	4.6	Limita	ationen der Arbeit	64
	4.7	Schlus	ssfolgerungen und Ausblick	67
5	Lite	eratur-	und Quellenverzeichnis	69
D	Danksagung			

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Hornhaut

Die Hornhaut (Kornea) stellt eine Barriere zwischen dem Augeninnenraum und der Außenwelt dar. Sie ist ein wesentlicher Bestandteil des dioptrischen Apparates des Auges, dessen zentrale Funktion in der Brechung des Lichtes besteht. Unter physiologischen Bedingungen weist die Hornhaut eine Brechkraft von 43 Dioptrien auf und übernimmt damit den größten Anteil der Gesamtbrechkraft des Auges (58 - 65 dpt)¹. Die Nährstoffversorgung der Kornea erfolgt über Diffusion aus dem Kammerwasser und der Tränenflüssigkeit, die Hornhaut selbst ist gefäßfrei. Man unterscheidet klassischerweise fünf Schichten der Hornhaut. Die äußerste Schicht stellt das vordere Kornealepithel dar, gefolgt von der Bowman-Lamelle, der Substantia propria (korneales Stroma), der Descemet-Membran (Basalmembran des Endothels) und dem Korneaendothel. Die Einteilung in eine weitere, sechste Hornhautschicht, in Form einer vor der Descemet-Membran liegenden Dua-Schicht, wird diskutiert². Die gesunde humane Hornhaut besitzt in ihrem Zentrum eine Dicke von etwa 550 µm, in der Peripherie von etwa 700 µm, und weist beim Erwachsenen einen Durchmesser von 10 - 12 mm auf⁴.

1.2 Keratokonus

Der Keratokonus ist eine Form der kornealen Ektasie, bei der die Hornhaut ausdünnt und sich konusförmig vorwölbt. Dieser Prozess führt bei den Betroffenen zu einem irregulären myopen Astigmatismus und einer damit einhergehenden Visusminderung¹. Es handelt sich um eine potenziell progrediente Erkrankung der menschlichen Hornhaut, die meist zunächst auf einem Auge auftritt und sich im Verlauf bilateral manifestiert¹.

1.2.1 Epidemiologie des Keratokonus

Die Angaben zur weltweiten Prävalenz des Keratokonus variieren in der Literatur, was auf methodische und ethnische Unterschiede zurückgeführt wird. Lange Zeit ging man davon aus, dass es sich beim Keratokonus um ein sehr seltenes Krankheitsbild mit einer Prävalenz von 1:2000 handelte³. Neuere Studien schätzen die Prävalenz des Keratokonus in Europa allerdings deutlich höher ein. So gehen aktuelle Studien von einer Prävalenz von 0,19 % in der Allgemeinbevölkerung in Norwegen⁴ und 0,27 % in den Niederlanden⁵ aus. Für die deutsche Bevölkerung zwischen 40 - 80 Jahren wurde die Keratokonus-Prävalenz kürzlich in der sogenannten Gutenberg Gesundheitsstudie, einer großen prospektiven Kohortenstudie im Landkreis Mainz-Bingen, auf 0,49 % (1:200) geschätzt⁶. Damit ist in Deutschland von einer 10-mal höheren Prävalenz als bisher angenommen auszugehen⁶.

Während die epidemiologischen Studien aus Norwegen und den Niederlanden außerdem nahelegen, dass Männer häufiger am Keratokonus erkranken als Frauen^{4,5}, konnte die Gutenberg Gesundheitsstudie für die deutsche Bevölkerung keinen Geschlechterunterschied in der Keratokonus-Prävalenz feststellen⁶.

1.2.2 Ätiologie des Keratokonus

Der Keratokonus zählt zu den nicht-entzündlichen kornealen Erkrankungen, deren genaue Ätiologie bisher noch nicht abschließend geklärt ist. Derzeit werden diverse Risikofaktoren für die Entstehung eines Keratokonus diskutiert. Da der Keratokonus in der Regel sporadisch auftritt, handelt es sich bei vielen dieser potenziellen Risikofaktoren um Umweltfaktoren. Hierzu gehören zum Beispiel das vermehrte Reiben der Augen⁷ sowie das Tragen von Kontaktlinsen⁸. Da es allerdings auch Berichte familiärer Keratokonus-Häufungen gibt, werden auch genetische Einflussfaktoren untersucht⁹. Unter anderem wurden hierbei genetische Übereinstimmungen zwischen Keratokonus-Erkrankten und Patient:innen mit genetischen Hypermobilitäts-Erkrankungen wie dem Ehlers-Danlos-Syndrom¹⁰ sowie eine erhöhte Keratokonus-Prävalenz unter Patient:innen mit Trisomie 21 gefunden¹¹. Zwar gelten gemeinhin auch die atopische Dermatitis und Allergien als wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung eines Keratokonus¹², allerdings konnte für die deutsche Kohorte in der Gutenberg Gesundheitsstudie kein epidemiologischer Zusammenhang zwischen Atopie und Keratokonus festgestellt werden⁶.

1.2.3 Klinik des Keratokonus

Die Erstdiagnose des Keratokonus wird klassischerweise in der Pubertät gestellt^{4,13}. Als Erstsymptom beklagen Patient:innen mit Keratokonus typischerweise eine abnehmende Sehschärfe, die sich im Verlauf der Erkrankung häufig nicht mehr zufriedenstellend mit Brillengläsern oder Kontaktlinsen korrigieren lässt. Die Patient:innen bemerken zudem häufig Lichtringe um Lichtquellen (sogenannte *Halos*) und eine verstärkte Blendungsempfindlichkeit. Die Klinik des Keratokonus sistiert zwar in seltenen Fällen spontan, zeigt sich in den meisten Fällen allerdings schubweise progredient. Ein Progress ist bis zur vierten Lebensdekade der Patient:innen möglich¹³.

1.2.4 Diagnostik des Keratokonus

Die Diagnose des Keratokonus wird klinisch gestellt. Patient:innen mit Keratokonus weisen in der Spaltlampenuntersuchung typischerweise eine kegelförmige Vorwölbung aller Hornhautschichten auf. Lässt man die Patient:innen nach unten schauen, so erkennt man die Konusform der Hornhaut anhand eines v-förmig deformierten Unterlids (Munson-Zeichen)¹⁴. Häufig finden sich bei Patient:innen mit Keratokonus außerdem sogenannte Vogt-Striae¹⁴. Hierbei handelt es sich um vertikal verlaufende, parallele Einrisse der Descemet-Membran¹. An der Basis des Hornhautkegels lassen sich zudem gegebenenfalls eisenhaltige Hämosiderin-Ablagerungen im kornealen Epithel als Kayser-Fleischer-Ring erkennen¹⁴. Ein akuter Keratokonus zeichnet sich dadurch aus, dass durch einen Riss der Descemet-Membran ein schmerzhaftes Hornhautödem entsteht. Nach dem Schub bleiben Hornhautnarben zurück^{1,14}.

Detaillierte Diagnostik und Verlaufskontrollen können bei Patient:innen mit Keratokonus insbesondere durch computergestützte Hornhauttopographie-Systeme erfolgen, die die Brechungswerte und Hornhautradien einzelner Hornhautbezirke berechnen^{1,14}. Per Scheimpflug-Bildgebung können zusätzlich die Topographie der Hornhautrückfläche sowie die Hornhautdicke bestimmt werden¹. Je nach maximaler Brechkraft der Hornhaut (K_{max}), der Hornhautdicke, dem Ausmaß von Astigmatismus und Myopie sowie dem Vorhandensein von Hornhautnarben, wird der Schweregrad eines Keratokonus-Befundes klassifiziert¹⁴.

1.2.5 Therapie des Keratokonus

Die Therapie der Keratokonus erfolgt derzeit überwiegend symptomatisch. Man versucht in Frühstadien der Erkrankung in der Regel zunächst, den Keratokonus bedingten Astigmatismus mit einer Brille oder formstabilen Kontaktlinsen zu korrigieren¹. Eine weitere therapeutische Möglichkeit zum Ausgleich der Hornhautverkrümmung besteht in der Einlage sogenannter intrastromaler kornealer Ringsegmente (ICRS)¹⁵. Um den raschen Progress des Keratokonus zu verlangsamen oder sogar gänzlich aufzuhalten, hat sich in vielen Keratokonus-Fällen das sogenannte Korneale Kollagen-Cross-Linking (CXL) als therapeutische Maßnahme bewährt¹. Hierbei werden neue Kollagen-Quervernetzungen induziert und das Hornhautstroma auf diese Weise stabilisiert¹. Als therapeutische ultima für Patient:innen mit Keratokonus kommt schließlich nur noch eine ratio Hornhauttransplantation in Frage¹⁵. Eine tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik (DALK) verspricht dabei eine schwächere Immunreaktionen als eine perforierende Keratoplastik (PKP)¹. Dieser immunologische Vorteil der lamellären Keratoplastik ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei der DALK um ein Verfahren handelt, bei dem lediglich Hornhautepithel, Bowman-Lamelle und Hornhautstroma transplantiert werden, während die patienteneigene Descemet-Membran und das Endothel bestehen bleiben. Für sehr fortgeschrittene Keratokonus-Befunde eignet sich allerdings eher eine PKP, bei der alle Hornhautschichten transplantiert werden¹.

1.3 Korneales Kollagen-Cross-Linking als Therapie bei Keratokonus

Seit einigen Jahren ist das sogenannte Korneale Kollagen-*Cross-Linking* (CXL) mit Riboflavin (Vitamin B2) und Ultraviolettstrahlung (UV-A) als Therapiemöglichkeit im klinisch-ophthalmologischen Alltag fest etabliert. Das 1998 von Spoerl *et al.* erstmalig im ophthalmologischen Kontext angewendete Verfahren wurde 2003 von Wollensak *et al.* als therapeutische Option für Patient:innen mit Keratokonus eingeführt^{16,17}. Das dort beschriebene Vorgehen ist heute unter dem Namen "Dresdener Protokoll" bekannt. Nach Dresdener Protokoll wird zunächst das korneale Epithel der Patient:innen entfernt und die Kornea im Anschluss mit 0,1 % Riboflavin angereichert. Anschließend erfolgt eine Bestrahlung der Hornhaut mit UV-A-Licht der Wellenlänge 370 ± 5 nm bei einer Bestrahlungsstärke von 3 mW/cm² über einen Zeitraum von 30 Minuten. Vor und während der Bestrahlung erfolgt die Applikation von 0,1 % Riboflavin-Augentropfen in einem Intervall von fünf Minuten. Aufgrund der vorgesehenen Epithelabrasio zählt man das Dresdener Protokoll zu den sogenannten "*Epi-off*-CXL"-Protokollen.

Seit der Einführung des Dresdener Protokolls konnten Studien zeigen, dass es sich beim CXL um ein sicheres Therapieverfahren handelt¹⁸, das die Progredienz des Keratokonus verlangsamen kann^{19,20}. Systematische Übersichtsarbeiten kamen außerdem zu dem Ergebnis, dass CXL dazu in der Lage ist, die Progredienz der Erkrankung in einigen Fällen vollständig aufzuhalten^{21,22}. Trotz dieser therapeutischen Errungenschaften durch das weniger invasive CXL besteht die einzige kausale Therapie des Keratokonus heutzutage nach wie vor in der Durchführung einer Hornhauttransplantation. Die Anzahl der Hornhauttransplantationen bei Keratokonus-Erkrankten konnte zwar mit der Einführung des CXL reduziert werden²³, der Keratokonus stellt aber nach wie vor die Indikation für 12 % aller Hornhauttransplantationen in Europa dar²⁴.

1.3.1 Korneales Kollagen-Cross-Linking im experimentellen Kontext

Um den Erfolg des CXL unter experimentellen Bedingungen evaluieren zu können, werden behandelte Hornhäute üblicherweise auf ihre Biomechanik und/oder auf ihre Resistenz gegenüber dem Abbau durch Verdauungsenzyme hin bewertet. Mehrere Studien untersuchten die mechanische Stabilität von *gecrosslinkten* Korneae mit Hilfe von Zugprüfungen an Hornhautstreifen. Diese Studien konnten zeigen, dass CXL die mechanische Stabilität der behandelten Hornhäute im Vergleich zu unbehandelten Korneae erhöht^{16,25,26}.

Ein weiteres etabliertes Verfahren zur Beurteilung der Effektivität des CXL stellt die Testung auf eine enzymatische Resistenz dar. Hierbei wird die Widerstandsfähigkeit von Hornhautproben gegenüber einem Verdau durch Verdauungsenzyme eingeschätzt. *Gecrosslinkte* Hornhäute zeigten sich hierbei resistenter gegenüber einem Abbau durch Kollagenase A als unbehandelte Korneae²⁷. Dies könnte therapeutisch insbesondere deshalb von Vorteil sein, da man im kornealen Gewebe von Patient:innen mit Keratokonus eine erhöhte Aktivität von Verdauungsenzymen^{28,29} sowie eine reduzierte Aktivität von Proteinase-Inhibitoren gefunden hat^{30,31}.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sich die Effekte des CXL vor allem in den anterioren 400 µm der behandelten Korneae abzeichnen. Dies gilt sowohl für die erwünschten CXL-Effekte der erhöhten Resistenz gegenüber einem enzymatischen Verdau²⁷, als auch für unerwünschte zytotoxische Effekte auf das korneale Gewebe, die mit den photochemischen Reaktionen des CXL einhergehen³². Um das Risiko endothelialer Schäden zu verringern, wird CXL als therapeutisches Verfahren in der Regel ausschließlich an Hornhäuten mit einer minimalen Hornhautdicke von 400 µm empfohlen³².

Da es durch die im konventionellen Dresdener Protokoll durchgeführte Epithelabrasio zu okulären Schmerzen, Epitheleintrübungen und -vernarbungen sowie Keratitiden kommen kann, bestehen Bemühungen, das CXL-Protokoll zu optimieren³³. Solche Modifikationen beinhalten unter anderem sogenannte "*Epi-on*" beziehungsweise "transepitheliale" CXL-Protokolle. Bei diesem Ansatz wird keine Epithelabrasio vorgenommen und das korneale Epithel verbleibt intakt. Während die *Epi-on* CXL-Gruppen den *Epi-off* CXL-Gruppen in manchen experimentellen Studien noch unterlegen sind³³, weisen aktuelle Übersichtsarbeiten auf vergleichbare klinische Erfolge zwischen *Epi-off-* und *Epi-on*-Gruppen hin^{34,35}. Ein Nachteil des transepithelialen CXL könnte darin bestehen, dass das intakte korneale Epithel eine zusätzliche Barriere für Riboflavin, UV-A-Licht und Sauerstoff darstellt.

1.3.2 Sauerstoffabhängigkeit des Kornealen Kollagen-Cross-Linkings

Beim CXL kommt es zu photochemischen Reaktionen zwischen UV-A Licht und Riboflavin. Indem Riboflavin als Photosensibilisator dient, verstärkt es die Bildung freier Sauerstoffradikale^{21,25}. Diese freien Sauerstoffradikale führen zur Knüpfung neuer kovalenter Bindungen innerhalb der Kornea, am ehesten innerhalb und zwischen den Kollagenmolekülen an der Oberfläche der Kollagenfibrillen und im Bereich der Proteoglykane, die die Kollagenfibrillen umgeben³⁶. Da es sich beim CXL folglich um einen Sauerstoff-abhängigen Prozess handelt³⁷, liegt die Annahme nahe, dass die Effekte des CXL durch das intrakorneale Sauerstoffangebot limitiert werden. Daraus ergibt sich die Überlegung, dass CXL in seiner Effektivität durch ein erhöhtes Angebot an Sauerstoff innerhalb der Kornea gesteigert werden könnte. Seiler *et al.* konnten in einer experimentellen Studie an porzinen Hornhäuten bereits zeigen, dass die intrakorneale Sauerstoffkonzentration durch die Sauerstoffkonzentration der Umgebungsluft beeinflussbar ist, indem sie die intrakorneale Sauerstoffkonzentration in 100, 200 und 300 µm Hornhauttiefe sowohl bei 20 als auch bei 100 % Sauerstoffgehalt in der Umgebung maßen³⁸.

CXL mit zusätzlichem Sauerstoff hat mittlerweile allerdings nicht nur in experimentellen, sondern auch in klinischen Studien Anwendung gefunden. Eine aktuelle Metaanalyse aus dem Jahr 2022 konnte zeigen, dass ein erhöhtes Angebot von Sauerstoff während des CXL effektiv und nachhaltig für mindestens sechs Monate ohne unerwünschte Nebenwirkungen K_{max} senken sowie den Visus von Patient:innen verbessern konnte³⁹. In dieser Metaanalyse wurden Studien mit verschiedenen Möglichkeiten zur Erhöhung des Sauerstoffangebots eingeschlossen: Sauerstoffbrillen⁴⁰⁻⁴², Sauerstoffmasken⁴³, Lid-Spekula⁴⁴ und gepulste Bestrahlung⁴⁵.

Letztlich ist es der Partialdruck eines Gases, der bestimmt, in welchem Ausmaß ein Gas in ein Gewebe diffundiert und sich in Flüssigkeiten löst. Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) entspricht dem Anteil am Gesamtdruck innerhalb eines Gasgemisches, der von Sauerstoff eingenommen wird. Bei einem Gesamtluftdruck auf Meeresniveau von 101 kPa (1 bar) liegt der Sauerstoffpartialdruck bei circa 21 kPa (0,21 bar), da der Sauerstoffanteil in unserer Atemluft 21 % beträgt.

Durch die Gabe von reinem Sauerstoff (100 %) kann der Sauerstoffanteil in der Umgebungsluft und damit folglich auch der pO₂ gesteigert werden. Unter Normaldruck (circa 1 bar) kann der Sauerstoffpartialdruck auf diese Weise von 0,21 bar auf 1,0 bar erhöht werden.

In einer Druckkammer wird der Gesamtluftdruck erhöht. Ein höherer Luftdruck geht ebenfalls mit einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck einher. Während der Gesamtluftdruck auf Meereshöhe circa 1 bar beträgt, kann er in einer Druckkammer gesteigert werden, beispielsweise auf 2,4 bar. Verwendet man 100 % reinen Sauerstoff bei einem Umgebungsdruck von 2,4 bar, so erreicht man entsprechend einen Sauerstoffpartialdruck von 2,4 bar. Bei der Hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) macht man sich im klinischen Alltag unter anderem bei der Behandlung von Kohlenmonoxid-Vergiftungen und Wundheilungsstörungen das Zusammenspiel von 100 % reinem Sauerstoff und Überdruck in der Druckkammer zu Nutze, um den Sauerstoffpartialdruck und damit die Sauerstoffdiffusion in Blut und Gewebe von Patient:innen zu steigern.

1.4 Hypothese der Arbeit

Dieser Arbeit liegt die Annahme zugrunde, dass durch die Gabe von zusätzlichem Sauerstoff und/oder durch die Erhöhung des Umgebungsdrucks die Verfügbarkeit von Sauerstoff innerhalb der Kornea während des CXL gesteigert werden kann und dass diese Steigerung der intrakornealen Sauerstoffkonzentration zu verbesserten CXL-Ergebnissen, insbesondere verbesserten Ergebnissen nach transepithelialem CXL, führen könnte. Verbesserte CXL-Ergebnisse könnten sich in Form von erhöhter biomechanischer Stabilität oder einer erhöhten Resistenz gegenüber einem Abbau durch Verdauungsenzyme äußern.

1.5 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit soll anhand von porzinen Augen untersucht werden, ob die intrakorneale Sauerstoffkonzentration während des CXL durch die Gabe von zusätzlichem Sauerstoff, durch hyperbare Bedingungen und/oder hyperbare Bedingungen mit zusätzlicher Sauerstoffgabe gesteigert werden kann. Diese Hypothese soll sowohl für *Epi-off-* als auch für *Epi-on-*CXL-Gruppen geprüft werden. Es soll festgestellt werden, ob sich die intrakorneale Sauerstoffkonzentration zwischen den *Epi-off-* und den *Epi-on-*Gruppen unterscheidet.

Die Effekte des CXL sollen anhand der biomechanischen Eigenschaften der behandelten Korneae in Form von Zug- und Druckprüfungen sowie anhand der enzymatischen Resistenz der untersuchten Hornhäute gegenüber einem Verdau durch Kollagenase A beurteilt werden. Diese Arbeit soll untersuchen, ob sich je nach Intervention Unterschiede hinsichtlich Zugund Druckstabilität der Hornhäute auffinden lassen. Sie soll außerdem eruieren, ob sich über die verschiedenen Gruppen hinweg Unterschiede hinsichtlich der Resistenz gegenüber einem enzymatischen Verdau durch Kollagenase A zeigen.

Diese Arbeit möchte mit ihren Ergebnissen versuchen, Erkenntnisse zur langfristigen Entwicklung eines optimierten CXL-Protokolls beizutragen. Ziel eines solchen Protokolls sollte es sein, idealerweise ein CXL-Verfahren für Patient:innen mit Keratokonus zu etablieren, das mit einer verbesserten Wirksamkeit (z.B. durch hyperbare Sauerstoffeinwirkung) bei reduziertem Nebenwirkungsprofil (z.B. durch Belassen des Hornhautepithels) einhergeht.

2 Material und Methoden

2.1 Probengewinnung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden an porzinen Augen durchgeführt. Die Schweineaugen wurden mit freundlicher Genehmigung von der Theo Keinhörster Großschlachterei mit Fleischandel e.K. in Recklinghausen für die Zwecke dieses Promotionsvorhabens zur Verfügung gestellt und wären anderenfalls regulär als Schlachtabfallprodukt entsorgt worden. Bei den Schweinen, deren Augen verwendet wurden, handelte es sich um Hausschweine, die im Alter von etwa sechs Monaten geschlachtet wurden. Ein gängiges Vorgehen im Schlachtbetrieb besteht darin, die Schweinekörper *post mortem* mit erhitztem Wasser zu reinigen. Um hitzebedingte Hornhautschäden durch diesen Prozess zu vermeiden, wurden die porzinen Augen, die als Probenmaterial dieser Arbeit dienten, vor dem Abbrühen der Schweinekörper entnommen. Die Enukleation der Augen fand durch die Mitarbeiter:innen der Schlachterei statt. Der Transport der Versuchsaugen von der Großschlachterei in Recklinghausen zum Labor für Experimentelle Ophthalmologie in Düsseldorf wurde in 1-facher Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) vorgenommen. Vom Zeitpunkt der Entnahme bis zum Start eines Versuch-Durchlaufs vergingen zwischen zwei und 30 Stunden.

Für die Durchführung der Versuche wurden ausschließlich Schweineaugen verwendet, deren Hornhäute makroskopisch intakt waren. Augen mit offensichtlich beschädigter Hornhaut wurden verworfen. Um die Handhabung mit den Proben zu erleichtern, wurden die Schweineaugen zunächst bis auf den Bulbus frei präpariert (Abbildung 1). Hierfür wurden adhärente Muskeln, Fettgewebe sowie die Konjunktiva entfernt. Unterdessen wurde darauf geachtet, dass die Augen stets ausreichend mit 1-facher PBS befeuchtet waren.



Abb. 1: **Präparation der Schweineaugen.** Das adhärente Gewebe, das sich an den von dem Schlachthof zur Verfügung gestellten Augen befand (linkes Auge), wurde zu Beginn der Versuche entfernt (rechtes Auge).

Alle für diese Arbeit verwendeten porzinen Augen wurden nach ihrer Enukleation und Präparation mit einem Femtosekundenlaser (FEMTO LDV Z8, Ziemer *Ophthalmic Systems* AG, Port, Schweiz) behandelt. Hierbei wurde im zentralen Hornhautbereich ein intrakornealer *Flap* mit einem Durchmesser von 7,5 mm in 70 µm Tiefe sowie ein nach intrakorneal reichender Tunnel von 5 mm Länge und 1,2 mm Breite in 300 µm Tiefe angelegt.

Die anschließend durchgeführten Experimente wurden in zwei Versuchsreihen absolviert: "*Epi-off*" und "*Epi-on*". *Epi-off* meint hierbei Versuche an Schweineaugen nach der Durchführung einer manuellen kornealen Epithelabrasio mittels eines Hockeymessers (Hockeyskalpell, *Feather Safety Razor Co.*, Osaka, Japan). *Epi-on*-Versuche beschreiben hingegen Experimente an porzinen Augen mit erhaltenem kornealem Epithel. Nach Enukleation, Präparation und Anlage von intrakornealem Tunnel wurden die Augen der Interventionsgruppen mit CXL behandelt. Sowohl für die *Epi-off*- als auch für die *Epi-on*-Versuchsreihe wurden jeweils die folgenden vier Interventionsgruppen gewählt:

CXL _{norm}	Normobare Bedingungen, keine zusätzliche Sauerstoffgabe
$CXL_{norm} + O_2$	Normobare Bedingungen, zusätzliche Sauerstoffgabe
CXL _{hyp}	Hyperbare Bedingungen, keine zusätzliche Sauerstoffgabe
$CXL_{hyp} + O_2$	Hyperbare Bedingungen, zusätzliche Sauerstoffgabe

Tabelle 1: Interventionsgruppen dieser Arbeit. Sowohl die *Epi-off-* als auch die *Epi-on-*Versuchsreihe beinhalteten die in dieser Tabelle dargestellten vier Interventionsgruppen CXL_{norm} , $CXL_{norm} + O_2$, CXL_{hyp} und $CXL_{hyp} + O_2$.

Die Durchführung des CXL an den Interventionsgruppen CXL_{norm} und CXL_{norm} + O₂ erfolgte unter normobaren Bedingungen. Normobar meint hier, dass CXL unter Außendruck-Verhältnissen stattfand, wie sie auch unter Normalbedingungen gelten (101325 Pa = 1,01325 bar). CXL an den Interventionsgruppen CXL_{hyp} und $CXL_{hyp} + O_2$ wurde unter hyperbaren Außendruck-Bedingungen von 2,4 bar durchgeführt. Diese konnten in der Druckkammer (Haux-Life-Support GmbH, Karlsbad-Ittersbach) des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) erreicht werden (Abbildung 3). Bei den Interventionsgruppen $CXL_{norm} + O_2$ und $CXL_{hyp} + O_2$ wurde die Umgebungsluft zusätzlich mit 100 % Sauerstoff angereichert (11 LO₂/min für zwei Minuten vor Beginn des CXL, 4 LO₂/min während des CXL).

Für die *Epi-off*-Versuchsreihe (n = 56) wurden in dieser Arbeit die Endpunkte Zug- und Druckstabilität sowie Resistenz gegenüber enzymatischem Verdau durch Kollagenase A festgelegt. Die Proben der *Epi-on*-Versuchsreihe wurden aufgrund einer geringeren Fallzahl (n = 25) lediglich hinsichtlich ihrer Zugstabilität geprüft. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des gesamten Studienplans.



Abb. 2: Schematische Darstellung des Studienplans. Alle Versuchsaugen erhielten nach der Enukleation eine vorbereitende Präparation und eine intrakorneale Tunnelanlage mittels Femtosekundenlaser, bevor sie auf die *Epi-off-* (n = 56) beziehungsweise die *Epi-on*-Versuchsreihe (n = 25) aufgeteilt wurden.



Abb. 3: **Druckkammer des Universitätsklinikums Düsseldorf.** In der Druckkammer der HBO-Therapie am UKD fanden die hyperbaren Versuche mit einem Umgebungsdruck von 2,4 bar statt.

Insgesamt wurden 81 Schweineaugen für diese Arbeit verwendet (siehe Tabellen 2 und 3)⁴⁶. Die Zuordnung individueller Augen in *Epi-off/Epi-on* beziehungsweise Versuchs- und Kontrollgruppen erfolgte zufällig.

Epi-off	Anzahl Versuchsaugen
Augen gesamt	n = 56
Augen Interventionsgruppen gesamt	n = 40
Interventionsgruppe CXL _{norm}	n = 10
Interventions gruppe $CXL_{norm} + O_2$	n = 10
Interventionsgruppe CXL _{hyp}	n = 10
Interventions gruppe $CXL_{hyp} + O_2$	n = 10
Augen Kontrolle	n = 16

Tabelle 2: Übersicht Versuchsaugen *Epi-off*. Für die *Epi-off*-Versuchsreihe wurden insgesamt 56 Schweineaugen verwendet, von denen 40 Augen mit CXL behandelt wurden und 16 Augen als Kontrolle dienten. (Tabelle modifiziert nach Menzel-Severing *et al.*, *Curr Eye Res.*, 2024)

Epi-on	Anzahl Versuchsaugen
Augen gesamt	n = 25
Augen Interventionsgruppen gesamt	n = 20
Interventionsgruppe CXL _{norm}	n = 5
Interventions gruppe $CXL_{norm} + O_2$	n = 5
Interventionsgruppe CXL _{hyp}	n = 5
Interventions gruppe $CXL_{hyp} + O_2$	n = 5
Augen Kontrolle	n = 5

Tabelle 3: Übersicht Versuchsaugen *Epi-on*. Von den 25 Versuchsaugen der *Epi-on*-Versuchsreihe erhielten 20 Augen eine Intervention mit CXL und fünf Augen dienten als Kontrolle. (Tabelle modifiziert nach Menzel-Severing *et al.*, *Curr Eye Res.*, 2024)

2.2 Epi-off-Versuchsreihe

Im Folgenden sind die Methodik des CXL mit intrakornealer Sauerstoffmessung und der biomechanischen sowie der enzymatischen Testung der Proben aus der *Epi-off*-Versuchsreihe dargestellt.

2.2.1 Korneales Kollagen-Cross-Linking mit intrakornealer Sauerstoffmessung

CXL wurde mit Riboflavin (0,1 % Riboflavin-5-Phosphat in 20 % Dextran T-500-Lösung) als Photosensibilisator und einem CCL-375 *vario Crosslinking System* (MLase AG, Germering) als Bestrahlungsquelle vorgenommen. Die Bestrahlung mit UV-A-Licht erfolgte mit einer Bestrahlungsstärke von 3 mW/cm² über einen Zeitraum von 30 Minuten. Fünf Minuten vor Beginn der Bestrahlung begann die Applikation von Riboflavin auf die porzine Hornhaut. Für den Zeitraum der Bestrahlung wurden jeweils vier bis sechs Tropfen der Riboflavin-Lösung in einem fünf-minütigen Intervall auf die Hornhaut getropft. 25 Minuten nach Beginn der UV-A-Bestrahlung wurde zum letzten Mal Riboflavin appliziert.

Im Folgenden wird der Versuchsaufbau während des CXL näher beschrieben. Zum besseren Verständnis soll die Abbildung 4 verhelfen.



Abb. 4 Versuchsaufbau, hier mit zusätzlichem Sauerstoff. Innerhalb der auf diesem Bild zu sehenden Versuchsbox befindet sich ein Versuchsauge in einem Bulbushalter (Kreis) während von außen Riboflavin (*), Sauerstoff (Pfeil) und UV-A-Licht (1) zugeführt werden. Zu sehen sind außerdem ein angeschlossenes Oxymeter (2), ein Manueller Mikromanipulator (3), der einen Sauerstoffnadelmikrosensor in seiner intrakornealen Position hält, sowie ein weiterer Zugang zur Box (x), um Sauerstoff aus der Versuchsbox abzulassen. (Abbildung modifiziert nach Menzel-Severing *et al., Curr Eye Res.,* 2024)

CXL fand über alle Versuche hinweg in einer eigens für diese Zwecke umgebauten Versuchsbox statt. Es handelte sich hierbei um eine Kiste aus transparentem Polypropylen mit den Abmessungen 56 cm x 39 cm x 28 cm (entspricht einem Volumen von 61,15 Litern). In der Versuchsbox befand sich das Versuchsauge in einem Bulbushalter (Bausch & Lomb, Laval, Kanada) auf einer Erhöhung von 16 cm (siehe Kreis auf Abbildung 4). Das CCL-375 *vario Crosslinking System* lag der verschlossenen Versuchsbox von außen auf (siehe 1 auf Abbildung 4). Auf diese Weise wurde ein Abstand von 5 cm zwischen der zu behandelnden Hornhaut und der Bestrahlungsquelle gewährleistet. Um die UV-A-Bestrahlung nicht durch das Material der Versuchsbox zu behindern, befand sich im Deckel der Versuchsbox im Bereich der Lichtquelle ein rundes Fenster mit einem Durchmesser von 2,5 cm. Dieses war während der Versuche mit handelsüblichem durchsichtigem Klebeband verschlossen, um den Sauerstoffverlust an dieser Stelle zu reduzieren. Die Applikation der Riboflavin-Lösung auf den zentralen Hornhautbereich der Versuchsaugen erfolgte von außen durch den Deckel der Versuchsbox hindurch mit einer Einmalkanüle der Größe 21 G x 4 4/5 0,8 x 120 mm (Sterican®, B. Braun SE, Melsungen) (siehe * auf Abbildung 4). Vor Beginn des CXL

erfolgte eine manuelle Epithelabrasio der Versuchsaugen mit einem Hockeymesser (*Epi-off*), die auch für die entsprechenden *Epi-off*-Kontrollaugen durchgeführt wurde.

Während des CXL wurde die intrakorneale Sauerstoffkonzentration gemessen. Das hierfür verwendete Oxymeter (OXY-1 ST, *PreSens Precision Sensing* GmbH, Regensburg) (siehe 2 auf Abbildung 4) war mit einem Sauerstoff-Nadelmikrosensor (NTH-Pst-7, *PreSens Precision Sensing* GmbH, Regensburg) verbunden. Dieser wurde mit Hilfe eines Manuellen Mikromanipulators (*Manual Micromanipulator MM, PreSens Precision Sensing* GmbH, Regensburg) (siehe 3 auf Abbildung 4) auf Höhe des Versuchsauges fixiert. Der Sensor selbst kam in dem zuvor mittels Femtosekundenlaser angelegten intrakornealen Tunnel der Schweineaugen zum Liegen (Abbildung 5). Vor dem Einführen des empfindlichen Sauerstoffnadelmikrosensors in seine intrakorneale Position wurde der gelaserte intrakorneale Tunnel allerdings zunächst mit einer Injektionskanüle (21 G x 1 ½ TW, BD *EclipseTM Needle*, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) vorsondiert, um seine Durchgängigkeit zu testen. Diese Sondierung des intrakornealen Tunnels erfolgte auch bei den Kontrollaugen.



Abb. 5: Versuchsauge im Bulbushalter mit intrakorneal liegendem Nadelmikrosensor. In dem porzinen Versuchsauge auf diesem Bild befindet sich der Nadelmikrosensor zur Sauerstoffmessung in dem zuvor per Femtosekundenlaser angelegten intrakornealen Tunnel.

Das Oxymeter befand sich außerhalb der Versuchskiste. Die Versuchsbox beinhaltete einen Zugang, durch den das Kabel gelegt wurde, das den Sauerstoffnadelmikrosensor mit dem Oxymeter verband. An dem Oxymeter war zusätzlich eine Temperatursonde angeschlossen, die die Raumtemperatur außerhalb der Versuchsbox maß. Temperatur- und intrakorneale Sauerstoffmessungen wurden zehn Sekunden vor Beginn der ersten Riboflavin-Applikation gestartet und nach dem vollendeten CXL noch vier weitere Minuten fortgesetzt. Die übermittelten Daten aus den Temperatur- und intrakornealen Sauerstoffmessungen wurden unterdessen mit einem Laptop und dem Programm *PreSens Measurement Studio 2* erfasst. Der hier beschriebene Ablauf von CXL und Sauerstoffmessung war für alle Interventionsgruppen identisch. Die Kontrollgruppen erhielten keine Behandlung mit CXL.

Um eine zusätzliche Gabe von Sauerstoff während des CXL zu ermöglichen ($CXL_{norm} + O_2$, $CXL_{hyp} + O_2$), verfügte die Versuchsbox über zwei weitere Zugänge. Über einen von diesen (siehe Pfeil in Abbildung 4) wurde die verschlossene Kiste vor Beginn der Riboflavin-Applikation für zwei Minuten mit einer Zufuhr von 11 L O₂/min mit 100 % Sauerstoff angereichert. Während des CXL gewährleistete derselbe Sauerstoff-Anschluss einen konstanten Zufluss von 4 L O₂/min in die Versuchsbox. An dem zweiten Zugang (siehe x in Abbildung 4) wurde unter hyperbaren Bedingungen ($CXL_{hyp} + O_2$) ein zusätzlicher Schlauch zum Ableiten von Sauerstoff angeschlossen. Dies war aus Brandschutzgründen innerhalb der Druckkammer notwendig. Alle Öffnungen der Versuchsbox wurden, sofern möglich, während der Versuche mit handelsüblichem Klebeband abgedichtet, um das Entweichen von Sauerstoff zu reduzieren.

2.2.2 Biomechanische Prüfung (Zug- und Druckprüfung)

Nach dem *Epi-off*-CXL wurden die behandelten Hornhäute der *Epi-off*-Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp}, CXL_{hyp} + O₂ sowie die Hornhäute der *Epi-off* Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer biomechanischen Stabilität getestet. Hierfür wurden Zugprüfungen an Hornhautstreifen (n = 5 pro *Epi-off*-Interventionsgruppe, n = 10 in der *Epi-off*-Kontrollgruppe) und Druckprüfungen an ganzen Hornhäuten (n = 5 pro *Epi-off*-Gruppe) durchgeführt. Die für die Zugprüfung als Testmaterial dienenden Hornhautstreifen wurden mit einer aus zwei Rasierklingen konstruierten Stanze angefertigt. Die Hornhäute wurden mit dieser Stanze längs entlang des gelaserten Tunnels im zentralen Hornhautbereich geschnitten. Die auf diese Weise gewonnenen Hornhautstreifen waren 5,5 mm breit und beinhalteten einen skleralen oberen und unteren Rand von circa 3 - 4 mm. Die Probendicke betrug etwa 1,2 mm. Nach ihrer Präparation wurden die Hornhautstreifen über Nacht zum Entquellen bei 4 °C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen) mit 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen) und 6 % Dextran T-500 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) aufbewahrt. Die Zugprüfung wurde am Folgetag an einer Materialprüfmaschine (ZwickiLine, Zwick Roell, Ulm) mit der Xpert III-Testing Software für Static Testing Systems vorgenommen. Die Hornhautstreifen wurden hierfür vertikal in die Materialprüfmaschine eingespannt und mit einer Vorkraft von 5000 Pa vorgedehnt. Die weitere Dehnung der Hornhautstreifen im Rahmen der Zugprüfung erfolgte mit einer Prüfgeschwindigkeit von 1,5 mm/min bis zu einer maximalen Längenänderung der Proben um 15 %. Die Zugprüfung ist in Abbildung 6 zu sehen. Nach der Zugprüfung wurden die verwendeten Hornhautstreifen verworfen.

Die Druckprüfung fand am ersten Tag nach der Enukleation der porzinen Augen statt. Hierfür wurde die porzine Hornhaut inklusive eines 3 - 4 mm breiten skleralen Randsaums präpariert. Mithilfe eines Kugelstempels konnte durch die Materialprüfmaschine (ZwickiLine, Zwick Roell, Ulm) die Kraft in Newton erfasst werden, die für die Verformung der untersuchten Hornhäute nötig war. Zu sehen ist dies in der Abbildung 7. Die Prüfung wurde mit einer Vorkraft von 0,002 N und einer Prüfgeschwindigkeit von 2 mm/min bis zu einer maximalen Verformung der Probe um 1,5 mm durchgeführt. Um die Hornhäute während der Prüfung zu stabilisieren, lagen sie einem eigens für diese Zwecke angefertigten Silikonkissen auf.



Abb. 6: **Zugprüfung.** Hier sieht man einen Hornhautstreifen von 5,5 mm Breite (Pfeil), der im Rahmen der Zugprüfung in der Materialprüfmaschine eingespannt ist.



Abb. 7: **Druckprüfung.** Die Druckprüfung fand mit einem Kugelstempel (1) der Materialprüfmaschine an einer korneoskleralen Probe (2) statt, die auf einem Silikonkissen (3) lag.

2.2.3 Enzymatische Prüfung (Kollagen-Assay und vollständiger Verdau)

Im Anschluss an die Druckprüfung wurde aus den druckgeprüften Hornhäuten eine runde Hornhautstanze mit einem Durchmesser von 8 mm angefertigt. Hierfür wurde eine Hautbiopsie-Stanze (*Disposable Biopsy Punch* 8 mm, *Integra LifeSciences*, North Billerica, Massachusetts, USA) verwendet. Die auf diese Weise gewonnenen Hornhautstanzen wurden über Nacht bei 4 °C in je 5 ml 1 x PBS + 5 % Penicillin/Streptomycin aufbewahrt, um die Keimbesiedlung der Proben zu reduzieren. Am darauffolgenden Tag begann die Testung der Hornhautstanzen auf ihre Resistenz gegenüber einem enzymatischen Verdau. Als Verdauungsenzym wurde eine Kollagenase A aus *Clostridium histolyticum* (Lot No.: 35830424, 0,223 U/mg, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) gewählt.

Die Hornhautstanzen wurden für die enzymatische Prüfung in je 5 ml 0,01 U/ml Kollagenase A bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Zur besseren Durchmischung der Lösung befanden sich die Proben während der Inkubation auf einem Kreisschüttler (*Advanced Mini Shaker 15*, VWR International GmbH, Darmstadt) bei 130 rpm. Ein Kollagen-*Assay* (SircolTM *Soluble Collagen Assay*, *Biocolor Ltd*, Carrickfergus, Vereinigtes Königreich) diente der Quantifizierung des während der Inkubation in Lösung gegangenen Kollagens. Der *Assay* wurde am dritten, fünften und siebten Tag nach dem Start der Inkubation anhand von je 50 µl Probenlösung durchgeführt. Unmittelbar vor der Durchführung jedes Kollagen-*Assays* wurde für jede Probe getestet, ob sich die Hornhautstanze mit einer Pipette suspendieren ließ. Der entsprechende Zeitpunkt, an dem dies der Fall war, wurde als "Tag des vollständigen Verdaus" dokumentiert. Am siebten Inkubationstag wurde das Testmaterial nach der Durchführung des Kollagen-*Assays* verworfen. Die Stichprobengröße für die enzymatische Testung betrug n = 5 pro *Epi-off*-Gruppe CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp}, CXL_{hyp} + O₂ und *Epi-off*-Kontrollgruppe.

2.3 Epi-on-Versuchsreihe

Im Folgenden ist das Vorgehen bei der Epi-on-Versuchsreihe dargestellt.

2.3.1 Korneales Kollagen-Cross-Linking mit intrakornealer Sauerstoffmessung

Das CXL der *Epi-on*-Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp}, CXL_{hyp} + O₂ mit Messung der intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen sowie die Handhabung der *Epi-on*-Kontrollgruppe (n = 5 pro Gruppe) erfolgte, bis auf die Epithelabrasio an den Versuchsaugen, analog zu den *Epi-off*-Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp}, CXL_{hyp} + O₂ beziehungsweise der *Epi-off*-Kontrollgruppe.

2.3.2 Biomechanische Prüfung (Zugprüfung)

Die Hornhäute der *Epi-on-*Gruppen CXL_{norm} , $CXL_{norm} + O_2$, CXL_{hyp} , $CXL_{hyp} + O_2$ und *Epi-on* Kontrolle wurden per Zugprüfung (n = 5 pro Gruppe) auf ihre biomechanische Stabilität hin getestet. Das Prüfprotokoll entsprach dabei dem der Zugprüfung der *Epi-off-*Gruppen.

2.4 Statistische Analyse

Kategoriale Variablen wurden als absolute und relative Anteile dargestellt. Metrische Variablen (z.B. die in Newton gemessene Standardkraft) wurden mit Mittelwerten und Standardabweichungen zusammengefasst.

Mittelwertsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit Hilfe von gemischten mehrfaktoriellen Varianzanalysen inferenzstatistisch geprüft (z.B. die für eine Verformung von 0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm benötigte Standardkraft in Newton in der Gruppe CXL_{norm} im Vergleich zu der Gruppe $CXL_{norm} + O_2$, der Gruppe CXL_{hyp} , der Gruppe $CXL_{hyp} + O_2$ und der Kontrollgruppe).

Die bei messwiederholten Daten vorausgesetzte Sphärizitätsannahme konnte mit dem zur Verfügung stehenden Programm nicht geprüft werden. In solchen Fällen wurde daher stets die Greenhouse-Geiser-Korrektur verwendet. Paarweise Vergleiche wurden *post hoc* mittels Tukey-Testes vorgenommen.

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software*, San Diego, California USA). Ergebnisse mit p < 0.05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 *Epi-off-*Versuchsreihe

Nachfolgend sind die Ergebnisse aus der Epi-off-Versuchsreihe aufgeführt.

3.1.1 Intrakorneale Sauerstoffmessung

Während des CXL der *Epi-off*-Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp} und CXL_{hyp} + O₂ wurde mittels Nadelmikrosensor die intrakorneale Sauerstoffkonzentration aufgezeichnet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Abbildung 8 als intrakorneal gemessene Sauerstoffkonzentration in Prozent gegen die Zeit in Sekunden aufgetragen⁴⁶. Dargestellt sind Mittelwertskurven der Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp} und CXL_{hyp} + O₂. Auf die graphische Darstellung der zu den Mittelwerten gehörenden Standardabweichungen wurde in der Abbildung 8 verzichtet, um eine bessere Übersicht zu ermöglichen. Die Standardabweichungen sind allerdings in der Abbildung 9 ergänzt.

Der dargestellte Graph der Abbildung 8 beginnt mit der ersten Applikation von Riboflavin (0 s). Fünf Minuten nach der ersten Riboflavin-Anwendung (300 s) wurde die UV-Lampe angeschaltet und die Bestrahlung mit UV-A Licht der Wellenlänge 370 nm bei einer Bestrahlungsstärke von 3 mW/cm² begonnen. Dieser Zeitpunkt ist mit dem ersten nach unten zeigenden Pfeil und der Beschriftung "UV an" in den Abbildungen 8 und 9 gekennzeichnet. Das Anschalten der UV-Lampe markiert den Beginn des CXL. Ab diesem Zeitpunkt fallen die Kurven der Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp} zunächst ab⁴⁶. In der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ steigt die intrakorneale Sauerstoffkonzentration leicht an⁴⁶. Der zweite Pfeil in den Abbildungen 8 und 9 zeigt den Zeitpunkt an, an dem die UV-Lampe ausgeschaltet und die Bestrahlung mit UV-A Licht beendet wurde (2100 s). Zwischen den beiden Pfeilen "UV an" und "UV aus" liegt ein Zeitraum von 30 Minuten (1800 s). In dieser Zeit wurde in einem fünf-minütigen Intervall Riboflavin appliziert. Korrelierend hierzu sieht man in der Abbildung 8 kleinere Ausschläge nach oben in den Mittelwertskurven der Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂ und CXL_{hyp} + O₂, die sich ebenfalls in einem fünf-minütigen (300 s) Intervall

zueinander befinden. Die Mittelwertskurven aller vier *Epi-off*-Gruppen (CXL_{norm} , CXL_{norm} + O_2 , CXL_{hyp} , CXL_{hyp} + O_2) steigen nach Beendigung des CXL ("UV aus" in den Abbildungen 8 und 9) wieder leicht an.



Abb. 8: **Intrakorneale Sauerstoffmessung** *Epi-off.* Dargestellt sind die im Mittel gemessenen intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen vor, während und nach dem CXL der *Epi-off-*Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp} und CXL_{hyp} + O₂, beginnend mit dem Zeitpunkt der ersten Riboflavin-Applikation. (Abbildung modifiziert nach Menzel-Severing *et al.*, *Curr Eye Res.*, 2024)



Abb. 9: Übersicht intrakorneale Sauerstoffmessung *Epi-off*. Zu sehen sind die mittleren gemessenen intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen in Prozent der einzelnen *Epi-off*-Gruppen mit den dazugehörigen Standardabweichungen (Schraffur).

Zwischen den gemessenen Mittelwerten der Interventionsgruppen ergaben sich nach Durchführung einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse signifikante Unterschiede (F (3, 36) = 18,65, p < 0,0001). In der Abbildung 8 ist zu erkennen, dass die Gruppe CXL_{norm} im Vergleich zu den anderen Interventionsgruppen über den gesamten Verlauf des CXL betrachtet die geringste intrakorneale Sauerstoffkonzentration aufwies, gefolgt von der Gruppe CXL_{hyp}. Die intrakorneale Sauerstoffkonzentration lag hier im Mittel über den insgesamt betrachteten Zeitraum bei 6,85 % (SD = 4,28 %, CXL_{norm}) beziehungsweise bei
8,83 % (SD = 3,69 %, CXL_{hyp}). Unter hyperbaren Sauerstoffbedingungen (CXL_{hyp} + O₂) wurde über den gesamten aufgezeichneten Zeitraum die höchste intrakorneale Sauerstoffkonzentration erreicht. Sie lag im Mittel bei 34,62 % (SD = 15,32 %)⁴⁶. Die zweithöchste intrakorneale Sauerstoffkonzentration wies die Gruppe CXL_{norm} + O₂ mit einem Mittelwert über die gesamte Zeit von 18,89 % (SD = 10,33 %) auf⁴⁶.

Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen *Epi-off*-Interventionsgruppen zu Beginn (300 s) und Ende (2100 s) des CXL sind in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt⁴⁶.

Epi-off: 300 s (UV an)		Intrakornealer Sauerstoff [%]		P-Wert	Signi-
					fikanz
CXL _{norm}	$CXL_{norm} + O_2$	$12,29 \pm 3,48$	$20,97 \pm 10,37$	0,1131	ns
CXL _{norm}	CXL _{hyp}	$12,29 \pm 3,48$	$11,88 \pm 3,20$	0,9926	ns
CXL _{norm}	$CXL_{hyp} + O_2$	$12,29 \pm 3,48$	$32,50 \pm 10,53$	0,0006	*
$CXL_{norm} + O_2$	CXL _{hyp}	$20,97 \pm 10,37$	$11,88 \pm 3,20$	0,0918	ns
$CXL_{norm} + O_2$	$CXL_{hyp} + O_2$	$20,97 \pm 10,37$	$32,50 \pm 10,53$	0,0992	ns
CXL _{hyp}	$CXL_{hyp} + O_2$	$11,88 \pm 3,20$	$32,50 \pm 10,53$	0,0005	*

Tabelle 4: Intrakorneale Sauerstoffkonzentrationen der *Epi-off*-Gruppen zu Beginn des CXL (300 s). Die mittleren intrakorneal gemessenen Sauerstoffkonzentrationen in Prozent der *Epi-off*-Gruppen CXL_{norm} und CXL_{hyp} + O₂ sowie CXL_{hyp} und CXL_{hyp} + O₂ verhielten sich signifikant unterschiedlich (p < 0,05) zueinander.

Epi-off: 2100 s (UV aus)Intrakornealer Sauerstoff [%]		Sauerstoff [%]	P-Wert	Signi-	
					fikanz
CXL _{norm}	$CXL_{norm} + O_2$	5,71 ± 3,99	20,39 ± 13,21	0,0293	*
CXL _{norm}	CXL _{hyp}	5,71 ± 3,99	7,38 ± 3,95	0,7856	ns
CXL _{norm}	$CXL_{hyp} + O_2$	5,71 ± 3,99	36,94 ± 17,26	0,0011	*
$CXL_{norm} + O_2$	CXL _{hyp}	20,39 ± 13,21	7,38 ± 3,95	0,0547	ns
$CXL_{norm} + O_2$	$CXL_{hyp} + O_2$	20,39 ± 13,21	$36,94 \pm 17,26$	0,1144	ns
CXL _{hyp}	$CXL_{hyp} + O_2$	$7,\!38\pm3,\!95$	$36,94 \pm 17,26$	0,0017	*

Tabelle 5: Intrakorneale Sauerstoffkonzentrationen der *Epi-off-*Gruppen am Ende des CXL (2100 s). Zwischen den Gruppen CXL_{norm} und CXL_{norm} + O₂, CXL_{norm} und CXL_{hyp} + O₂ sowie CXL_{hyp} und CXL_{hyp} + O₂ bestanden signifikante Unterschiede (p < 0,05) hinsichtlich der mittleren gemessenen intrakornealen Sauerstoffkonzentration in Prozent. (Tabelle modifiziert nach Menzel-Severing *et al.*, *Curr Eye Res.*, 2024)

3.1.2 Zugprüfung

An den *Epi-off*-Interventionsgruppen (CXL_{norm} , CXL_{norm} + O_2 , CXL_{hyp} und CXL_{hyp} + O_2) sowie an den Hornhäuten der *Epi-off*-Kontrollgruppe wurden biomechanische Testungen in Form von Zug- und Druckversuchen durchgeführt.

Abbildung 10 stellt die Ergebnisse der Zugprüfungen der *Epi-off*-Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp} und CXL_{hyp} + O₂ (n = 5 pro Gruppe) sowie der *Epi-off*-Kontrollgruppe (n = 10) dar. Aufgetragen ist die Standardkraft in Newton, die im Mittel benötigt wurde, um die Proben der jeweiligen Gruppen während der Zugprüfung von 0 % bis 15 % zu dehnen. Die Mittelwertskurven verhalten sich dabei annähernd linear. Die zu den Mittelwerten gehörenden Standardabweichungen wurden im Sinne einer besseren Übersichtlichkeit aufgrund der nah beieinander liegenden Kurven nicht in Abbildung 10 dargestellt. Sie können allerdings in der Abbildung 11 eingesehen werden. Zwischen den untersuchten Gruppen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (F (4, 25) = 0,2378, p = 0,9143).



Abb. 10: **Zugprüfung** *Epi-off.* Dargestellt ist die Standardkraft in Newton, die im Mittel pro Gruppe benötigt wurde, um eine Dehnung der Hornhautstreifen von 0 % bis 15 % zu erreichen.



Abb. 11: Übersicht Zugprüfung *Epi-off*. Dargestellt ist die jeweilige mittlere Standardkraft, die pro *Epi-off*-Gruppe für die Dehnung der Proben von 0 % bis 15 % aufgebracht wurde, gemeinsam mit der zugehörigen Standardabweichung (schraffierter Bereich).

In der Tabelle 6 sowie in der Abbildung 12 werden einzelne Dehnungszeitpunkte der Zugprüfung betrachtet. Dargestellt sind die Dehnungspunkte 4 %, 6 % und 8 % und die dafür im Mittel pro Gruppe benötigte Standardkraft in Newton für die *Epi-off*-Gruppen CXL_{norm}, $CXL_{norm} + O_2$, CXL_{hyp} und $CXL_{hyp} + O_2$ sowie die *Epi-off*-Kontrollgruppe⁴⁶. Die Mittelwerte der Gruppen verhielten sich zu den untersuchten Dehnungszeitpunkten nicht signifikant unterschiedlich zueinander (F (4, 24) = 0,1422, p = 0,9648)⁴⁶.

Epi-off-Gruppen	4 %	6 %	8 %
CXL _{norm}	0,1951 ± 0,1153 N	$0,2662 \pm 0,1359$ N	0,3364 ± 0,1419 N
$CXL_{norm} + O_2$	$0,2018 \pm 0,1149 \text{ N}$	$0,2942 \pm 0,1437 \text{ N}$	$0,3939 \pm 0,1745$ N
CXL _{hyp}	$0,2101 \pm 0,0429 \text{ N}$	$0,3065 \pm 0,0566$ N	$0,4021 \pm 0,0620 \text{ N}$
$CXL_{hyp} + O_2$	$0,2107 \pm 0,0266$ N	$0,3054 \pm 0,0329$ N	$0,3966 \pm 0,0411 \text{ N}$
Kontrolle	$0,1861 \pm 0,1280$ N	$0,2687 \pm 0,1684$ N	$0,3522 \pm 0,1914$ N

Tabelle 6: Zugprüfung *Epi-off* zu den Dehnungszeitpunkten 4 %, 6 % und 8 %. Dargestellt ist die Standardkraft in Newton, die im Mittel pro Gruppe benötigt wurde, um eine Dehnung der Hornhautstreifen von 4 %, 6 % und 8 % zu erzielen sowie die zugehörige Standardabweichung pro Mittelwert.



Abb. 12: **Zugprüfung** *Epi-off* zu den Dehnungszeitpunkten 4 %, 6 % und 8 %. Die mittlere Standardkraft in Newton, hier dargestellt mit dazugehöriger Standardabweichung, unterschied sich unter den *Epi-off*-Gruppen an den Dehnungszeitpunkte 4 %, 6 % und 8 % nicht signifikant voneinander. (Abbildung modifiziert nach Menzel-Severing *et al.*, *Curr Eye Res.*, 2024)

3.1.3 Druckprüfung

Die Ergebnisse der Druckversuche an den *Epi-off*-Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp}, CXL_{hyp} + O₂ sowie an der *Epi-off*-Kontrollgruppe (n = 5 pro Gruppe) sind in der Abbildung 13 dargestellt. Aufgetragen ist die mittlere Standardkraft in Newton, die für eine Verformung der Hornhautproben um bis zu 1,5 mm aufgebracht wurde. Zwischen den Mittelwerten der untersuchten Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede (F (4, 20) = 0,5266, p = 0,7174). Die Standardabweichungen sind in der Abbildung 13 zugunsten der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie sind in der Abbildung 14 allerdings ergänzt.



Abb. 13: **Druckprüfung** *Epi-off.* Dargestellt ist die Standardkraft in Newton, die im Mittel pro Gruppe benötigt wurde, um eine Verformung der Hornhautproben von 0 mm bis 1,5 mm auszulösen.



Abb. 14: Übersicht Druckprüfung *Epi-off*. Ergänzend zu der mittleren Standardkraft in Newton, die für eine Verformung der einzelnen *Epi-off*-Gruppen von 0 mm bis 1,5 mm benötigt wurde, ist hier jeweils die entsprechende Standardabweichung (schraffierter Bereich) dargestellt.

In der Tabelle 7 sowie in der Abbildung 15 sind einzelne Zeitpunkte der Druckprüfung aufgetragen. Es handelt sich um die erhobenen Messdaten zu den Zeitpunkten einer Hornhaut-Verformung um 0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm. Die Mittelwerte der untersuchten Gruppen bei einer Verformung von 0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (F (4, 20) = 0,5057, p = 0,7321).

Epi-off-Gruppen	0,5 mm	1,0 mm	1,5 mm
CXL _{norm}	0,3188 ± 0,0485 N	$1,0919 \pm 0,1139$ N	2,1653 ± 0,1855 N
$CXL_{norm} + O_2$	0,3331 ± 0,0455 N	1,1133 ± 0,0926 N	$2,2060 \pm 0,1397$ N
CXL _{hyp}	$0,2965 \pm 0,1785$ N	$0,9930 \pm 0,4799 \text{ N}$	2,0198 ± 0,6809 N
$CXL_{hyp} + O_2$	$0,3814 \pm 0,0359 \text{ N}$	$1,2114 \pm 0,0605 \text{ N}$	$2,3176 \pm 0,0714$ N
Kontrolle	$0,2906 \pm 0,1631$ N	$0,9315 \pm 0,5205$ N	$1,9263 \pm 0,8609$ N

Tabelle 7: Druckprüfung der *Epi-off-*Gruppen bei 0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm Verformung. Dargestellt sind die Standardkraft in Newton, die im Mittel pro Gruppe benötigt wurde, um eine Verformung der Proben um 0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm zu bewirken, sowie die dazugehörigen Standardabweichungen.



Abb. 15: **Druckprüfung der** *Epi-off-***Gruppen bei 0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm Verformung.** Zwischen den Mittelwerten der *Epi-off-*Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Verformung um 0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm in der Druckprüfung.

3.1.4 Enzymatische Prüfung anhand eines Kollagen-Assays

Die Tabellen 8, 9 und 10 stellen die Ergebnisse des Kollagen-*Assays* am dritten, fünften und siebten Tag nach Beginn der Inkubation der Hornhautproben in Kollagenase A dar.

<i>Epi-off</i> : 3. Inkubationstag		Kollagengehalt in 5 ml [µg]		P-Wert	Signi-
					fikanz
CXL _{norm}	$CXL_{norm} + O_2$	398,37 ± 156,58	$14,99 \pm 33,19$	0,0219	*
CXL _{norm}	CXL _{hyp}	398,37 ± 156,58	67,74 ± 125,26	0,0389	*
CXL _{norm}	$CXL_{hyp} + O_2$	398,37 ± 156,58	$7,90 \pm 21,33$	0,0219	*
CXL _{norm}	Kontrolle	$398,37 \pm 156,58$	$173,31 \pm 114,43$	0,1537	ns
$CXL_{norm} + O_2$	CXL _{hyp}	$14,99 \pm 33,19$	67,74 ± 125,26	0,8811	ns
$CXL_{norm} + O_2$	$CXL_{hyp} + O_2$	$14,99 \pm 33,19$	$7,90 \pm 21,33$	0,9932	ns
$CXL_{norm} + O_2$	Kontrolle	$14,99 \pm 33,19$	$173,31 \pm 114,43$	0,0900	ns
CXL _{hyp}	$CXL_{hyp} + O_2$	67,74 ± 125,26	$7,90 \pm 21,33$	0,8219	ns
CXL _{hyp}	Kontrolle	67,74 ± 125,26	$173,31 \pm 114,43$	0,6176	ns
$CXL_{hyp} + O_2$	Kontrolle	$7,90 \pm 21,33$	$173,31 \pm 114,43$	0,0770	ns

Tabelle 8: **Dritter Inkubationstag in Kollagenase A.** Dargestellt sind die mittleren gemessenen Kollagenwerte in Mikrogramm in 5 ml Lösung mit den dazugehörigen Standardabweichungen und P-Werten am dritten Inkubationstag der Hornhautproben in Kollagenase A.

Epi-off: 5. Ink	ubationstag	Kollagengehalt in 5 ml [µg]		P-Wert	Signi-
					fikanz
CXL _{norm}	$CXL_{norm} + O_2$	363,29 ± 114,29	$135,06 \pm 98,68$	0,0567	ns
CXL _{norm}	CXL _{hyp}	363,29 ± 114,29	$114,89 \pm 51,92$	0,0280	*
CXL _{norm}	$CXL_{hyp} + O_2$	363,29 ± 114,29	356,78 ± 372,21	>0,999	ns
CXL _{norm}	Kontrolle	$363,29 \pm 114,29$	235,58 ± 118,61	0,4230	ns
$CXL_{norm} + O_2$	CXL _{hyp}	$135,06 \pm 98,68$	$114,89 \pm 51,92$	0,9929	ns
$CXL_{norm} + O_2$	$CXL_{hyp} + O_2$	$135,06 \pm 98,68$	356,78 ± 372,21	0,7109	ns
$CXL_{norm} + O_2$	Kontrolle	$135,06 \pm 98,68$	$235,58 \pm 118,61$	0,5678	ns
CXL _{hyp}	$CXL_{hyp} + O_2$	$114,89 \pm 51,92$	356,78 ± 372,21	0,6383	ns
CXL _{hyp}	Kontrolle	$114,89 \pm 51,92$	235,58 ± 118,61	0,2637	ns
$CXL_{hyp} + O_2$	Kontrolle	$356,78 \pm 372,21$	$235,58 \pm 118,61$	0,9476	ns

 Tabelle 9: Fünfter Inkubationstag in Kollagenase A. Aufgeführt sind die mittleren Kollagenwerte in Mikrogramm in 5 ml Lösung sowie ihre Standardabweichungen und P-Werte, gemessen am fünften Tag nach Inkubation der Hornhautproben in Kollagenase A.

Epi-off: 7. Ink	ubationstag	Kollagengehalt in 5 ml [µg]		P-Wert	Signi-
					fikanz
CXL _{norm}	$CXL_{norm} + O_2$	409,26 ± 114,18	$308,52 \pm 367,85$	0,9715	ns
CXL _{norm}	CXL _{hyp}	$409,26 \pm 114,18$	$315,59 \pm 192,86$	0,8745	ns
CXL _{norm}	$CXL_{hyp} + O_2$	$409,26 \pm 114,18$	$152,19 \pm 112,45$	0,0418	*
CXL _{norm}	Kontrolle	$409,26 \pm 114,18$	$204,00 \pm 140,83$	0,1369	ns
$CXL_{norm} + O_2$	CXL _{hyp}	$308,52 \pm 367,85$	$315,59 \pm 192,86$	>0,999	ns
$CXL_{norm} + O_2$	$CXL_{hyp} + O_2$	$308,52 \pm 367,85$	$152,19 \pm 112,45$	0,8820	ns
$CXL_{norm} + O_2$	Kontrolle	$308,52 \pm 367,85$	$204,00 \pm 140,83$	0,9691	ns
CXL _{hyp}	$CXL_{hyp} + O_2$	$315,59 \pm 192,86$	$152,19 \pm 112,45$	0,5246	ns
CXL _{hyp}	Kontrolle	315,59 ± 192,86	$204,00 \pm 140,83$	0,8133	ns
$CXL_{hyp} + O_2$	Kontrolle	$152,19 \pm 112,45$	$204,00 \pm 140,83$	0,9564	ns

Tabelle 10: **Siebter Inkubationstag in Kollagenase A.** Hier sind die mittleren gemessenen Kollagenwerte in Mikrogramm in 5 ml Lösung mit Standardabweichungen und P-Werten vom siebten Tag nach Inkubation der Hornhautproben in Kollagenase A aufgelistet.

Am siebten Tag wurde bei der Gruppe CXL_{norm} eine mittlere Kollagenkonzentration von 409,257 µg/5 ml (SD = 114,176 µg/5 ml) gemessen. Die in Lösung gegangene Kollagenkonzentration der Gruppe CXL_{norm} am siebten Inkubationstag stellt damit den Maximalwert der Mittelwerte aller Gruppen über alle gemessenen Zeitpunkte hinweg dar.

In der Abbildung 16 sind die Ergebnisse des Kollagen-*Assays* vom dritten, fünften und siebten Tag nach Beginn der Inkubation mit Kollagenase A abgebildet. Für jede Gruppe ist der mittlere Kollagengehalt in Mikrogramm dargestellt, der während der Inkubationszeit in 5 ml der Kollagenase-Lösung übergetreten ist. Zwischen den Mittelwerten der untersuchten Gruppen bestehen signifikante Unterschiede (F (4, 21) = 4,213, p = 0,0117).



Abb. 16: Kollagen-Assay Epi-off. Dargestellt sind die im Mittel in Lösung getretene Menge Kollagen in Mikrogramm pro 5 ml Lösung, die am dritten, fünften und siebten Tag nach Beginn der Inkubation der Hornhautstanzen in 0,01 U/ml Kollagenase A per Kollagen-Assay bestimmt wurde, sowie die zugehörigen Standardabweichungen.

3.1.5 Enzymatische Prüfung anhand des vollständigen Verdaus

Die Tabelle 11 stellt eine Übersicht der Verdauzeiten der *Epi-off*-Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp}, CXL_{hyp} + O₂ sowie der *Epi-off*-Kontrollgruppe dar. Die Dauer bis zum Erreichen des vollständigen enzymatischen Verdaus der Hornhäute ist pro Gruppe als Mittelwert mit der dazu gehörenden Standardabweichung dargestellt. Als Maßeinheit für die Verdauzeit wurde die Anzahl der Tage gewählt, die seit dem Start der Inkubation bis zum vollständigen enzymatischem Verdau der Hornhäute verstrich. Die höchsten Mittelwerte erreichten die Gruppen CXL_{norm} + O₂ (5,4 d, SD = 0,9 d) und CXL_{hyp} (5,4 d, SD = 1,7 d). Der geringste Mittelwert wurde für die Gruppe CXL_{norm} aufgezeichnet (3 d, SD = 0 d). Die Proben der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ waren im Mittel nach fünf Tagen (SD = 0 d), die der Kontrollgruppe nach 4,33 Tagen (SD = 1,6 d) verdaut.

<i>Epi-off-</i> Gruppe	Verdauzeit [d]
CXL _{norm}	3,0 ± 0,0
$CXL_{norm} + O_2$	5,4 ± 0,9
CXL _{hyp}	5,4 ± 1,7
$CXL_{hyp} + O_2$	5,0±0,0
Kontrolle	4,33 ± 1,6

Tabelle 11: **Dauer bis zum vollständigen Verdau in Tagen.** Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen geben die Tage an, die durchschnittlich pro *Epi-off-*Gruppe bis zum vollständigen Verdau der Hornhäute durch 0,01 U/ml Kollagenase A verstrichen sind.

In der Abbildung 17 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Tabelle 11 graphisch aufgearbeitet. Zwischen den Mittelwerten der untersuchten Gruppen bestehen statistisch signifikante Unterschiede (F (4, 21) = 3,866, p = 0,0166). Sie liegen zwischen den Mittelwerten der Gruppe CXL_{norm} (3 d, SD = 0 d) und der Gruppe CXL_{norm} + O₂ (5,4 d, SD = 0,9 d) sowie zwischen denen der Gruppe CXL_{norm} (3 d, SD = 0 d) und der Gruppe CXL_{hyp} (5,4 d, SD = 1,7 d).



Abb. 17: Verdauzeiten *Epi-off*. Dargestellt sind die Tage, die durchschnittlich pro Gruppe bis zum vollständigen Verdau der Hornhäute durch 0,01 U/ml Kollagenase A verstrichen sind sowie die zugehörigen Standardabweichungen und signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.2 *Epi-on*-Versuchsreihe

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Epi-on-Versuchsreihe aufgeführt.

3.2.1 Intrakorneale Sauerstoffmessung

Auch für die *Epi-on-*Gruppen CXL_{norm} , $CXL_{norm} + O_2$, CXL_{hyp} , $CXL_{hyp} + O_2$ fand vor, während und nach dem CXL eine intrakorneale Sauerstoffmessung statt. Die hierbei erhobenen Mittelwerte pro Interventionsgruppe sind in der Abbildung 18 graphisch abgebildet⁴⁶. Zu sehen ist die mittlere Sauerstoffkonzentration pro Gruppe in Prozent, aufgetragen über die Zeit in Sekunden. Auf die graphische Darstellung der Standardabweichungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. In der



Abbildung 19 wurden die Standardabweichungen zu den einzelnen Mittelwertskurven ergänzt.

Abb. 18: **Intrakorneale Sauerstoffmessung** *Epi-on*. Dargestellt sind die im Mittel gemessenen intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen vor, während und nach dem CXL der *Epi-on*-Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp} und CXL_{hyp} + O₂, beginnend mit dem Zeitpunkt der ersten Riboflavin-Applikation. (Abbildung modifiziert nach Menzel-Severing *et al.*, *Curr Eye Res.*, 2024)



Abb. 19: Übersicht intrakorneale Sauerstoffmessung *Epi-on*. Hier sind die einzelnen Mittelwertskurven der intrakornealen Sauerstoffmessung der *Epi-on*-Gruppen in Prozent zusammen mit den dazugehörigen Standardabweichungen (Schraffur) dargestellt.

Die Aufzeichnung der intrakornealen Sauerstoffkonzentration, die in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt ist, beginnt auch für die *Epi-on*-Gruppen mit der ersten Riboflavin-Applikation fünf Minuten vor Beginn des CXL. Der erste Pfeil mit der Beschriftung "UV an" kennzeichnet das Einschalten der UV-Lampe und damit den Start des CXL. Mit Beginn des CXL fallen die durchschnittlich gemessenen intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen von 10,76 % (SD = 4,55 %, CXL_{norm}), 24,89 % (SD = 6,50 %, CXL_{norm} + O₂) und 11,50 % (SD = 2,72 %, CXL_{hyp}) in Sekunde 300 auf 9,92 % (SD = 4,25 %, CXL_{norm}), 21,98 % $(SD = 4,72 \%, CXL_{norm} + O_2)$ und 10,95 % $(SD = 2,62 \%, CXL_{hyp})$ in Sekunde 450⁴⁶. Signifikant unterschiedlich zueinander waren zu Beginn des CXL (300 s) damit die Gruppen CXL_{norm} zu CXL_{norm} + O₂ und CXL_{norm} + O₂ zu CXL_{hyp}. Die Mittelwertskurve der Gruppe CXL_{hyp} + O₂ zeigt währenddessen einen Anstieg von 19,83 % (SD = 11,63 %) in Sekunde 300 auf 20,60 % (SD = 11,15 %) in Sekunde 450 der Aufzeichnung⁴⁶.

Die Mittelwertskurven der Gruppen CXL_{norm} und CXL_{hyp} nehmen während des CXL stetig weiter ab bis zu einem Minimum von 6,95 % (SD = 2,80 %, CXL_{norm}) in Sekunde 2052 beziehungsweise 9,74 % (SD = 1,12 %, CXL_{hyp}) in Sekunde 1989. Die beiden Kurven steigen erst nach Beendigung des CXL (zweiter Pfeil mit der Kennzeichnung "UV aus") wieder an, sodass sie in Sekunde 2356 Werte von 7,70 % (SD = 2,66 %, CXL_{norm}) und 10,47 % (SD = 1,14 %, CXL_{hyp}) erreichen.

Die Mittelwertskurve der Gruppe $CXL_{norm} + O_2$ zeigt einen annähernd konstanten Verlauf. Sie startet zu Beginn des CXL (300 s) mit einem mittleren Wert von 24,89 % (SD = 6,50 %) und liegt zum Ende des CXL (2100 s) bei 26,59 % (SD = 4,64 %)⁴⁶. Nach dem Ausschalten der UV-Lampe steigt die mittlere Sauerstoffkonzentration der Gruppe $CXL_{norm} + O_2$ dann auf bis zu 28,83 % (SD = 5,61 %) in Sekunde 2355 der Aufzeichnung an.

Die Gruppe $CXL_{hyp} + O_2$ weist eine Mittelwertskurve auf, die von Beginn bis Ende der Aufzeichnung stets ansteigt⁴⁶. In Sekunde eins liegt sie bei einer mittleren intrakornealen Sauerstoffkonzentration von 15,17 % (SD = 11,02 %), schneidet in Sekunde 636 die Mittelwertskurve der Gruppe $CXL_{norm} + O_2$, steigt weiter an und erreicht schließlich den höchsten gemessenen Mittelwert von 33,22 % (SD = 13,40 %) in Sekunde 2356⁴⁶.

Bei allen dargestellten Kurven sind kleinere Ausschläge in einem regelmäßigen Abstand von fünf Minuten zueinander zu sehen, die zeitgleich mit der Applikation von Riboflavin auftreten. Besonders deutlich ausgeprägt sind sie in der Mittelwertskurve der Gruppe $CXL_{norm} + O_2$.

Die gemessenen mittleren intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen zum Zeitpunkt des Einschaltens ("UV an", 300 s) und Ausschaltens ("UV aus", 2100 s) der UV-A-Lampe sind für die *Epi-on*-Interventionsgruppen in den Tabellen 12 und 13 dargestellt⁴⁶.

<i>Epi-on</i> : 300 s (UV an)		Intrakornealer Sauerstoff [%]		P-Wert	Signi-
					fikanz
CXL _{norm}	$CXL_{norm} + O_2$	$10,76 \pm 4,55$	$24,\!89\pm6,\!50$	0,0207	*
CXL _{norm}	CXL _{hyp}	$10,76 \pm 4,55$	$11,50 \pm 2,72$	0,9884	ns
CXL _{norm}	$CXL_{hyp} + O_2$	$10,76 \pm 4,55$	19,83 ± 11,63	0,4416	ns
$CXL_{norm} + O_2$	CXL _{hyp}	$24,\!89\pm6,\!50$	$11,50 \pm 2,72$	0,0259	*
$CXL_{norm} + O_2$	$CXL_{hyp} + O_2$	$24,89 \pm 6,50$	19,83 ± 11,63	0,8298	ns
CXL _{hyp}	$CXL_{hyp} + O_2$	$11,50 \pm 2,72$	$19,83 \pm 11,63$	0,4805	ns

Tabelle 12: Intrakorneale Sauerstoffkonzentrationen der *Epi-on*-Gruppen zu Beginn des CXL (300 s). Signifikante Unterschiede bestanden zwischen den in Prozent gemessenen intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen der *Epi-on*-Gruppen CXL_{norm} und CXL_{norm} + O_2 sowie CXL_{norm} + O_2 und CXL_{hyp}.

<i>Epi-on:</i> 2100 s (UV aus)		Intrakornealer Sauerstoff [%]		P-Wert	Signi-
					fikanz
CXL _{norm}	$CXL_{norm} + O_2$	7,07 ± 2,76	$26,59 \pm 4,64$	0,0005	*
CXL _{norm}	CXL _{hyp}	7,07 ± 2,76	9,89 ± 1,08	0,2576	ns
CXL _{norm}	$CXL_{hyp} + O_2$	$7,07 \pm 2,76$	32,00 ± 12,89	0,0380	*
$CXL_{norm} + O_2$	CXL _{hyp}	$26,59 \pm 4,64$	9,89 ± 1,08	0,0034	*
$CXL_{norm} + O_2$	$CXL_{hyp} + O_2$	$26,59 \pm 4,64$	32,00 ± 12,89	0,8137	ns
CXL _{hyp}	$CXL_{hyp} + O_2$	$9,89 \pm 1,08$	$32,00 \pm 12,89$	0,0598	ns

Tabelle 13: Intrakorneale Sauerstoffkonzentrationen der *Epi-on*-Gruppen zum Ende des CXL (2100 s). Die intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen in Prozent der *Epi-on*-Gruppen CXL_{norm} und CXL_{norm} + O₂, CXL_{norm} und CXL_{hyp} + O₂, sowie CXL_{norm} + O₂ und CXL_{hyp} verhielten sich signifikant unterschiedlich zueinander. (Tabelle modifiziert nach Menzel-Severing *et al.*, *Curr Eye Res.*, 2024)

3.2.2 Zugprüfung

Die mittlere Standardkraft in Newton, die benötigt wurde, um während der Zugprüfung der *Epi-on*-Gruppen CXL_{norm} , $CXL_{norm} + O_2$, CXL_{hyp} und $CXL_{hyp} + O_2$ eine Dehnung von 0 % bis 15 % zu erreichen, ist in der Abbildung 20 graphisch dargestellt⁴⁶. Die Mittelwertskurven der untersuchten Gruppen liegen hier dicht beieinander, es konnten keine statistisch

signifikanten Unterschiede zwischen ihnen festgestellt werden⁴⁶. Auf die Darstellung der zugehörigen Standardabweichungen wurde in dieser Abbildung zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit verzichtet. Auf der Abbildung 21 sind die einzelnen Mittelwertskurven jeweils mit der entsprechenden Standardabweichung aufgeführt.



Abb. 20: **Zugprüfung** *Epi-on*. Dargestellt ist die Standardkraft in Newton, die im Mittel pro Gruppe benötigt wurde, um eine Dehnung der Hornhautstreifen von 0 % bis 15 % zu erreichen.



Abb. 21: Übersicht Zugprüfung Epi-on. Die mittlere Standardkraft in Newton, die pro Epi-on-Gruppe benötigt wurde, um eine Dehnung der Hornhaut-Streifen von 0 % bis 15 % zu erzielen, ist hier für jede Gruppe mit der dazugehörigen Standardabweichung (schraffierter Bereich) einzeln dargestellt.

Die Tabelle 14 sowie die Abbildung 22 präsentieren die gemessenen Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen für die Dehnungszeitpunkte 4 %, 6 % und 8 %. Über alle in dieser Darstellung aufgeführten Mittelwerte hinweg wurde der geringste Wert durch die Gruppe CXL_{norm} bei einer Dehnung von 4 % erzielt. Er betrug 0,2900 N (SD = 0,0764 N). Der höchste Mittelwert bei einer Dehnung von 8 % betrug 0,6452 N (SD = 0,1525 N) und wurde für die Kontrollgruppe erhoben.

Epi-on-Gruppen	4 %	6 %	8 %
CXL _{norm}	$0,2900 \pm 0,0764$ N	$0,4379 \pm 0,1097$ N	0,5800 ± 0,1383 N
$CXL_{norm} + O_2$	0,3073 ± 0,1111 N	$0,4670 \pm 0,1356$ N	$0,6289 \pm 0,1467 \text{ N}$
CXL _{hyp}	$0,3479 \pm 0,1422 \text{ N}$	$0,4946 \pm 0,1620 \text{ N}$	$0,6214 \pm 0,1619$ N
$CXL_{hyp} + O_2$	$0,3165 \pm 0,1279$ N	$0,4675 \pm 0,1575$ N	$0,6158 \pm 0,1749 \text{ N}$
Kontrolle	$0,2973 \pm 0,0877$ N	$0,4667 \pm 0,1230$ N	$0,6452 \pm 0,1525$ N

Tabelle 14: **Zugprüfung** *Epi-on* **zu** den Dehnungszeitpunkten 4 %, 6 % und 8 %. Dargestellt ist die mittlere Standardkraft mit Standardabweichung in Newton, die pro Gruppe benötigt wurde, um eine Dehnung der Proben um 4 %, 6 % und 8 % zu erzielen.



Abb. 22: Zugprüfung *Epi-on* zu den Dehnungszeitpunkten 4 %, 6 % und 8 %. Dargestellt sind die Standardkraft in Newton, die im Mittel pro Gruppe benötigt wurde, um eine Dehnung der Hornhaut-Streifen um 4 %, 6 % und 8 % zu erzielen, sowie die zugehörigen Standardabweichungen. (Abbildung modifiziert nach Menzel-Severing *et al.*, *Curr Eye Res.*, 2024)

3.3 Epi-off versus Epi-on

Nachfolgend werden die Ergebnisse aus der *Epi-off*-Versuchsreihe denen aus der *Epi-on*-Versuchsreihe gegenübergestellt.

3.3.1 Epi-off versus Epi-on: Intrakorneale Sauerstoffmessung

Die Abbildung 23 dient der Gegenüberstellung der intrakornealen Sauerstoffmessungen der einzelnen Gruppen aus den *Epi-off-* und *Epi-on-*Versuchsreihen⁴⁶. Zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit wurde hier eine Darstellung ohne Standardabweichungen gewählt. Ergänzend sind die entsprechenden Standardabweichungen in der Abbildung 24 dargestellt.



Abb. 23: Intrakorneale Sauerstoffmessung ohne Standardabweichungen: *Epi-off versus Epi-on*. Abgebildet sind die mittleren intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen in Prozent während des CXL gegen die Zeit in Sekunden der Gruppen CXL_{norm} , $CXL_{norm} + O_2$, CXL_{hyp} und $CXL_{hyp} + O_2$, jeweils einzeln im Vergleich zwischen der *Epi-off-* und *Epi-on-*Versuchsreihe, ohne Standardabweichungen. (Abbildung modifiziert nach Menzel-Severing *et al.*, *Curr Eye Res.*, 2024)



Abb. 24: Intrakorneale Sauerstoffmessung mit Standardabweichungen: *Epi-off versus Epi-on*. Hier aufgezeichnet sind die mittleren intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen in Prozent mit Standardabweichungen (schraffierter Bereich) der *Epi-off*-Gruppen (links) beziehungsweise *Epi-on*-Gruppen (rechts) CXL_{norm} , $CXL_{norm} + O_2$, CXL_{hyp} und $CXL_{hyp} + O_2$, aufgetragen gegen die Zeit in Sekunden.

In den Tabellen 15 und 16 sind die mittleren intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen aus den *Epi-off-* und *Epi-on-*Versuchsreihen zu Beginn (300 s) und Ende (2100 s) des CXL mit den dazugehörigen Standardabweichungen und P-Werten aufgeführt⁴⁶. Zwischen den Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede (CXL_{norm}: F (1, 13) = 0,050, p = 0,9932; CXL_{norm} + O₂: F (1, 13) = 0,9920, p = 0,3545; CXL_{hyp}: F (1, 13) = 0,4830, p = 0,4993; CXL_{hyp} + O₂: F (1, 13) = 1,557, p = 0,2341)⁴⁶.

300 s (UV an)	Epi-off [% O ₂]	<i>Epi-on</i> [% O ₂]	P-Wert	Signifikanz
CXL _{norm}	$12,29 \pm 3,48$	$10,76 \pm 4,55$	0,9894	ns
$CXL_{norm} + O_2$	$20,97 \pm 10,37$	$24,89 \pm 6,50$	0,9479	ns
CXL _{hyp}	$11,88 \pm 3,20$	$11,50 \pm 2,72$	> 0,999	ns
$CXL_{hyp} + O_2$	$32,50 \pm 10,53$	$19,83 \pm 11,63$	0,3817	ns

Tabelle 15: Intrakorneale Sauerstoffkonzentration zu Beginn des CXL: *Epi-off versus Epi-on*. Gegenübergestellt sind die mittleren intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen in Prozent Sauerstoff der *Epi-off-* und *Epi-on*-Versuchsreihen zu Beginn des CXL (300 s) mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen und P-Werten.

2100 s (UV an)	Epi-off [% O ₂]	<i>Epi-on</i> [% O ₂]	P-Wert	Signifikanz
CXL _{norm}	5,71 ± 3,99	$7,07 \pm 2,76$	0,9744	ns
$CXL_{norm} + O_2$	$20,39 \pm 13,27$	$26,\!59\pm4,\!63$	0,7553	ns
CXL _{hyp}	7,38 ± 3,96	9,89 ± 1,08	0,4227	ns
$CXL_{hyp} + O_2$	$36,94 \pm 17,26$	$32,00 \pm 12,89$	0,9914	ns

Tabelle 16: **Intrakorneale Sauerstoffkonzentration am Ende des CXL:** *Epi-off versus Epi-on.* Zu sehen ist der Vergleich der mittleren intrakornealen Sauerstoffkonzentration der *Epi-off-* und *Epi-on-*Versuchsreihen am Ende des CXL (2100 s) in Prozent Sauerstoff mit den entsprechenden Standardabweichungen und P-Werten. (Tabelle modifiziert nach Menzel-Severing *et al.*, *Curr Eye Res.*, 2024)

3.3.2 Epi-off versus Epi-on: Zugprüfung

Die Abbildung 25 sowie die Tabellen 17, 18 und 19 stellen eine Gegenüberstellung der in den Zugprüfungen der *Epi-off-* und *Epi-on-*Versuchsreihen erhobenen Daten, inklusive

Standardabweichungen und P-Werten, zu den Messzeitpunkten 4 %, 6 % und 8 % Dehnung dar. Signifikante Unterschiede bestehen zu den Dehnungszeitpunkten 6 % (F (1, 45) = 23,15, p < 0,0001) und 8 % (F (1, 45) = 33,44, p < 0,0001).



Abb. 25: **Zugprüfungen bei 4 %, 6 % und 8 % Dehnung:** *Epi-off versus Epi-on*. In den drei Graphen sind die mittlere Standardkraft in Newton, die in den *Epi-off-* beziehungsweise *Epi-on*-Versuchsgruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O_2 , CXL_{hyp}, CXL_{hyp} + O_2 und Kontrolle jeweils für eine Dehnung von 4 %, 6 % und 8 % aufgebracht wurden, mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

4 % Dehnung	Epi-off [N]	Epi-on [N]	P-Wert	Signifikanz
CXL _{norm}	$0,1951 \pm 0,1153$	$0,2900 \pm 0,0764$	0,5983	ns
$CXL_{norm} + O_2$	$0,2018 \pm 0,1149$	$0,3073 \pm 0,1111$	0,4855	ns
CXL _{hyp}	$0,2101 \pm 0,0429$	$0,3479 \pm 0,1422$	0,2152	ns
$CXL_{hyp} + O_2$	$0,2107 \pm 0,0266$	$0,3165 \pm 0,1279$	0,4855	ns
Kontrolle	$0,1861 \pm 0,1280$	$0,2973 \pm 0,0877$	0,2808	ns

Tabelle 17: **Zugprüfung bei 4 % Dehnung:** *Epi-off versus Epi-on.* Dargestellt sind die mittlere Standardkraft in Newton sowie die zugehörigen Standardabweichungen und P-Werte, die in den Gruppen der *Epi-off-* und *Epi-on*-Versuchsreihen benötigt wurden, um in der Zugprüfung eine Dehnung von 4 % zu erreichen.

6 % Dehnung	Epi-off [N]	Epi-on [N]	P-Wert	Signifikanz
CXL _{norm}	$0,2662 \pm 0,1359$	$0,\!4379\pm0,\!1097$	0,2250	ns
$CXL_{norm} + O_2$	$0,2942 \pm 0,1437$	$0,4670 \pm 0,1356$	0,2192	ns
CXL _{hyp}	$0,3065 \pm 0,0566$	$0,4946 \pm 0,1620$	0,1515	ns
$CXL_{hyp} + O_2$	$0,3054 \pm 0,0329$	$0,4675 \pm 0,1575$	0,2789	ns
Kontrolle	$0,2687 \pm 0,1684$	$0,4667 \pm 0,1230$	0,0495	*

Tabelle 18: **Zugprüfung bei 6 % Dehnung:** *Epi-off versus Epi-on.* Hier aufgeführt sind die mittlere Standardkraft in Newton, die in der Zugprüfung der *Epi-off-* und *Epi-on-*Versuchsreihen für eine Dehnung von 6 % benötigt wurde, sowie die entsprechenden Standardabweichungen und P-Werte.

8 % Dehnung	Epi-off [N]	Epi-on [N]	P-Wert	Signifikanz
CXL _{norm}	$0,3364 \pm 0,1419$	$0,5800 \pm 0,1383$	0,0715	ns
$CXL_{norm} + O_2$	$0,3939 \pm 0,1745$	$0,6289 \pm 0,1467$	0,0886	ns
CXL _{hyp}	$0,4021 \pm 0,0620$	$0,6214 \pm 0,1619$	0,1286	ns
$CXL_{hyp} + O_2$	$0,3966 \pm 0,0411$	$0,6158 \pm 0,1749$	0,1288	ns
Kontrolle	$0,3522 \pm 0,1914$	$0,6452 \pm 0,1525$	0,0049	*

Tabelle 19: Zugprüfung bei 8 % Dehnung: *Epi-off versus Epi-on*. Diese Tabelle zeigt die mittlere Standardkraft in Newton mit ihren Standardabweichungen und P-Werten zum Vergleich der *Epi-off-* und *Epi-on*-Versuchsreihen bei einer Dehnung von 8 % in der Zugprüfung.

4 Diskussion

Für Patient:innen, die an einem Keratokonus leiden, stellt CXL heutzutage eine etablierte Behandlungsmethode dar. CXL ermöglicht es, die Progredienz des Keratokonus und den damit einhergehenden voranschreitenden Visusverlust in einigen Fällen zu stoppen^{21,22}. Seit CXL im Jahr 2003 von Wollensak *et al.* als therapeutische Maßnahme beim Keratokonus eingeführt wurde¹⁷, wird das ursprüngliche CXL-Protokoll regelmäßig adaptiert und modifiziert, mit den Bestrebungen, den therapeutischen Erfolg zu maximieren. Man darf vermuten, dass von einem optimalen CXL-Protokoll in erster Linie die individuellen Patient:innen im Sinne einer reduzierten Krankheitslast profitieren. CXL ist allerdings auch aus ökonomischer Sicht als kosteneffektiv zu betrachten⁴⁷. Entsprechend wichtig ist es, insbesondere bei steigenden Keratokonus-Prävalenzen, bestehende CXL-Protokolle zu ergänzen und neue Möglichkeiten zu erforschen, die Sicherheit und Effektivität des CXL im klinischen Alltag weiter zu steigern.

4.1 Korneales Kollagen-Cross-Linking mit intrakornealer Sauerstoffmessung

Vorherige Studien an Schweineaugen konnten zeigen, dass es sich beim CXL um einen Sauerstoff-abhängigen Prozess handelt^{37,38}. Seiler *et al.* fanden durch intrakorneale Sauerstoffmessungen in 100, 200 und 300 μ m Hornhauttiefe außerdem heraus, dass die Sauerstoffkonzentration innerhalb des kornealen Stromas von porzinen Augen durch die Erhöhung des Sauerstoffanteils in der Umgebungsluft von 20 auf 100 % gesteigert werden kann. Angelehnt an Seiler *et al.*³⁸ erfolgten in dieser Arbeit intrakorneale Sauerstoffmessungen in einer Hornhauttiefe von 300 μ m mittels Sauerstoffsonde in einem zuvor per Femtosekundenlaser angelegten intrakornealen Tunnel. Die hierbei gemessenen Werte können bestätigen, dass CXL Sauerstoff verbraucht.

Der Sauerstoffverbrauch während des CXL ist deutlich sichtbar an den in dieser Arbeit erfassten mittleren Sauerstoffkurven der Gruppen *Epi-off* CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp} sowie *Epi-on* CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp}, die einen Sauerstoffabfall nach Beginn der Bestrahlung mit UV-Licht verzeichnen⁴⁶. Die Mittelwertskurven der *Epi-off*- und der *Epi-on*-Gruppen mit hyperbaren Sauerstoffbedingungen (CXL_{hyp} + O₂) weisen statt eines Abfalls eine steigende Tendenz der mittleren intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen auf⁴⁶. Dieser Anstieg könnte darauf hinweisen, dass die Versuchsbox zum Zeitpunkt der Messungen noch nicht vollständig mit Sauerstoff angereichert war⁴⁶.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen intrakornealen Sauerstoffmessungen erfolgten in einem intrakornealen Tunnel. Dieser intrakorneale Tunnel wurde sowohl für die *Epi-off-* als auch die *Epi-on-*Gruppen mit einem Femtosekundenlaser in einer Hornhauttiefe von 300 µm angelegt. Es bleibt allerdings zu berücksichtigen, dass die Epithelabrasio an den Hornhäuten der *Epi-off-*Gruppen erst nach dem Lasern des Tunnels stattfand, während das Epithel der *Epi-on-*Gruppen zu jedem Zeitpunkt der Versuche intakt blieb. Aufgrund der Epithelabrasio an den *Epi-off-*Hornhäuten befand sich der intrakorneale Tunnel der *Epi-on-*Gruppen daher *de facto* während des CXL tiefer zur Oberfläche (300 µm) als der intrakorneale Tunnel der *Epi-off-*Gruppen (300 µm minus der Epitheldicke). Bei einer mittleren Epitheldicke porziner Hornhäute von $80 \pm 25 \,\mu\text{m}^{48}$ ist davon auszugehen, dass die Sauerstoffmessungen in dem intrakornealen Tunnel der *Epi-off-*Gruppen in einer Tiefe von 220 ± 25 µm zur Oberfläche erfolgten. Der zusätzliche Hornhaut-*Flap*, der in 70 µm Hornhauttiefe angelegt wurde, war zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente eine obligate technische Voraussetzung zum Lasern eines intrakornealen Tunnels von Seiten der Software-Konfiguration des Femtosekundenlasers. Er erfüllte keinen eigenen Zweck im Rahmen der Experimente.

Die Tiefe des intrakornealen Tunnels in 300 µm Hornhauttiefe wurde unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Seiler et al. festgelegt³⁸. Die geringste mittlere intrakorneale Sauerstoffkonzentration, die Seiler et al. anhand ihrer intrakornealen Sauerstoffmessungen während des CXL mit einer Bestrahlungsstärke von 3 mW/cm² in 300 µm, 200 µm und 100 µm Hornhauttiefe, jeweils bei einer Sauerstoffkonzentration von 20 % und 100 % in der Umgebungsluft, feststellen 300 µm Tiefe bei konnten, wurde in einer Umgebungskonzentration von 20 % Sauerstoff gemessen³⁸. Es war daher zu erwarten, dass in 300 µm Hornhauttiefe das größte Potenzial für eine Erhöhung der intrakornealen Sauerstoffkonzentration durch die Hinzunahme hyperbarer Sauerstoffbedingungen bestand⁴⁶.

Seiler *et al.* führten außerdem intrakorneale Messungen während des CXL bei verschiedenen Bestrahlungsstärken (3, 9, 18 und 30 mW/cm²) durch³⁸. Die größten Unterschiede in der intrakornealen Sauerstoffkonzentration zwischen Messungen bei 20 % und 100 % Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft konnten Seiler *et al.* an den Proben feststellen, an denen CXL mit einer Bestrahlungsstärke von 3 mW/cm² stattgefunden hatte³⁸. Basierend auf diesen Ergebnissen war anzunehmen, dass Unterschiede hinsichtlich der Effektivität des CXL unter normobaren im Vergleich zu hyperbaren Bedingungen mit und ohne Sauerstoff am ehesten nach CXL mit einer Bestrahlungsstärke von 3 mW/cm² sichtbar werden würden⁴⁶. Aus diesem Grund wurden in der hier dargestellten Arbeit stets Bestrahlungsstärken von 3 mW/cm² verwendet⁴⁶.

Diese Arbeit konnte die Beobachtung vorheriger Studien, dass die Gabe zusätzlichen Sauerstoffs die intrakorneale Sauerstoffkonzentration während des CXL mit 3 mW/cm² erhöht, bestätigen⁴⁶. Dies konnte unabhängig von der Epithelbeschaffenheit festgestellt werden⁴⁶. Am Ende des CXL waren die intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen in den Gruppen mit zusätzlichem Sauerstoff (CXL_{norm} + O₂) sowohl in der *Epi-off-* als auch in der *Epi-on-*Versuchsreihe signifikant höher als in denen ohne zusätzliche Sauerstoffgabe (CXL_{norm})⁴⁶.

Ergänzend zu den bisher veröffentlichten Studien konnte diese Arbeit nun außerdem zeigen, dass nicht nur die Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft, sondern auch die umgebenden Druckkonditionen einen Einfluss auf die intrakorneale Sauerstoffkonzentration während des *Epi-off-* und des *Epi-on-*CXL nehmen⁴⁶. Hier konnte die Änderung des Umgebungsdrucks von 1 bar auf 2,4 bar für sich genommen (*Epi-off* CXL_{hyp}, *Epi-on* CXL_{hyp}) noch keine signifikante Erhöhung der mittleren intrakornealen Sauerstoffkonzentration im Vergleich zu den unter normobaren Bedingungen *gecrosslinkten* Gruppen (*Epi-off* CXL_{norm}, *Epi-on* CXL_{norm}) bewirken⁴⁶. Eine Kombination aus hyperbaren Bedingungen mit zusätzlichem Sauerstoff scheint allerdings einen größeren Effekt auf die intrakorneale Sauerstoffkonzentration von *Epi-off-* und *Epi-on-*Gruppen genommen zu haben als die hyperbaren Bedingungen allein. Der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen CXL_{hyp} + O₂ und CXL_{norm} in den *Epi-off-* und *Epi-on-*Versuchsreihen am Ende des CXL (2100 s) verdeutlicht die Bedeutung der kombinierten Anwendung von hyperbaren und zusätzlichen Sauerstoffbedingungen auf die intrakorneale Sauerstoffkonzentration. Anhand der Kurvenverläufe der mittleren gemessenen intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen lässt sich vermuten, dass hyperbarer Sauerstoff ($CXL_{hyp} + O_2$) die intrakorneale Sauerstoffkonzentration während des CXL tendenziell sogar noch stärker steigern kann als die reine Sauerstoffgabe unter normobaren Bedingungen ($CXL_{norm} + O_2$)⁴⁶. Statistisch haltbar war diese Beobachtung allerdings nicht⁴⁶.

Bei den Spitzen, die in regelmäßigen Abständen von fünf Minuten über die Kurvenverläufe aller aufgezeichneten mittleren Sauerstoffmessungen zu erkennen sind, handelt es sich am ehesten um Artefakte, ausgelöst durch eine mechanische Erschütterung der Hornhautoberfläche durch die Applikation von Riboflavin im fünf-minütigen Intervall.

Die Messungen der Raumtemperaturen während des CXL wurden nicht ausgewertet, da sie inhaltlich nicht in Zusammenhang mit der hier beschriebenen Arbeit gebracht wurden. Die Datenerhebung fand lediglich deshalb statt, da es sich bei der Messung der Temperatur um eine obligate Einrichtung des verwendeten Oxymeters handelte.

4.2 Biomechanische Stabilität anhand von Zugprüfungen

In Forschungsarbeiten zum CXL ist es üblich, die Effektivität des erfolgten CXL an biomechanischen Zugprüfungen zu messen. Schon Spoerl *et al.* verwendeten 1998 eine handelsübliche Materialprüfmaschine, um die Effektivität verschiedener CXL-Protokolle anhand von Spannungs-Dehnungs-Kurven zu vergleichen¹⁶. Wie bei Spoerl *et al.* wurden die für eine Zugprüfung benötigten kornealen Proben auch in der hier vorliegenden Arbeit mithilfe einer Stanze aus zwei Rasiermessern mit 5 mm Breite angefertigt, in einer Materialprüfmaschine eingespannt und einer Vorspannung von 5000 Pa ausgesetzt¹⁶. Anschließend wurde in der Zugprüfung dieser Arbeit die Kraft in Newton erfasst, die benötigt wurde, um die Proben von 0 bis 15 % zu dehnen. Besonderes Augenmerk lag hierbei, ebenfalls wie bei Spoerl *et al.*, auf den Dehnungspunkten 4 %, 6 % und 8 % Dehnung¹⁶. Die erhobenen Daten aus den Zugprüfungen an den *Epi-off-* und *Epi-on*-Gruppen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dennoch lässt sich innerhalb der *Epi-off-* sowie innerhalb der *Epi-on*-Gruppen die Tendenz erkennen, dass die

für eine Dehnung von 4 %, 6 % und 8 % aufgewandte Standardkraft in Newton für die Interventionsgruppen CXL_{norm} + O_2 , CXL_{hyp} und CXL_{hyp} + O_2 im Mittel größer war als die der Gruppe CXL_{norm}. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die Gabe von zusätzlichem Sauerstoff während des CXL (CXL_{norm} + O_2) als auch die Durchführung des CXL unter hyperbaren Bedingungen mit (CXL_{hyp} + O_2) und ohne zusätzlichen Sauerstoff (CXL_{hyp}) die Zugstabilität porziner Hornhäute im Vergleich zu dem klassischen Vorgehen von CXL unter normobaren Bedingungen ohne zusätzlichen Sauerstoff (CXL_{norm}) erhöhen könnte. Misst man die Effektivität des CXL an der Zugstabilität der Hornhäute, so könnten diese Ergebnisse womöglich darauf hindeuten, dass die Effektivität von CXL gesteigert werden könnte durch die Gabe zusätzlichen Sauerstoffs, die Schaffung hyperbarerer Umgebungsbedingungen beziehungsweise die Kombination dieser beiden.

Die Interpretationen, die sich anhand der Ergebnisse der Zugprüfungen diskutieren lassen, beruhen allerdings lediglich auf den Tendenzen, die in den Abbildungen 12 und 22 zu erkennen sind. Statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zugstabilität zwischen den untersuchten Gruppen zeigen sich nicht⁴⁶. Dies könnte daran liegen, dass tatsächlich keine Unterschiede bestehen. Unter Berücksichtigung der erkennbaren Tendenzen darf man allerdings vermuten, dass die in dieser Arbeit vorgenommenen Testungen möglicherweise schlicht nicht sensitiv genug waren, die Unterschiede zwischen den Gruppen in einem statistisch signifikanten Ausmaß zu detektieren. Dies könnte auf methodische Fehler oder auf die Verwendung bestimmter Materialien zurückzuführen sein. Die ZwickiLine-Materialprüfmaschine beispielsweise wurde vordergründig für die Werkstoffprüfung in Produktionsüberwachung und Qualitätssicherung entwickelt. Möglicherweise eignen sich Materialprüfmaschinen alternativer Firmen, wie sie in anderen Studien verwendet wurden (zum Beispiel MINIMAT, Rheometric Scientific GmbH, Bensheim¹⁶), besser für die sensitive Messung der Unterschiede zwischen den untersuchten Hornhautproben. Eine weitere Einflussgröße stellt das porzine Probenmaterial dar. Möglicherweise wären die Unterschiede zwischen den hier dargestellten Gruppen bei der Durchführung an humanen Proben aufgrund einer geringeren Hornhautdicke und des damit einhergehenden höheren Anteils an gecrosslinkter Hornhautmasse stärker ausgefallen. Man könnte vermuten, dass die Verwendung humaner statt porziner Proben den Kontrast zwischen den unterschiedlichen Interventionsgruppen verstärken könnte, so dass, bei gleicher Durchführung an menschlichen Hornhäuten, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu erwarten wären. Eine ähnliche Beobachtung machten Wollensak *et al.*, bei denen sich Unterschiede zwischen ihren Versuchsgruppen deutlich stärker an ihren humanen als an ihren porzinen Proben zeigten²⁵.

Die in der aktuellen Forschung gängige Überzeugung, dass sich die Effektivität von CXL anhand von Zugprüfungen bewerten lässt, basiert auf der Annahme, dass Hornhäute nach durchgeführtem CXL an Zugstabilität im Vergleich zu unbehandelten Hornhäuten gewinnen. In der hier vorgestellten Arbeit ließen sich allerdings weder statistisch signifikante Unterschiede noch eindeutig erkennbare Tendenzen in diese Richtung zwischen den Epi-offbeziehungsweise den Epi-on-Gruppen CXLnorm und den entsprechenden Kontrollgruppen feststellen⁴⁶. Im Gegensatz dazu überragten die Kontrollgruppen die Epi-offbeziehungsweise die Epi-on-Gruppe CXLnorm an einigen Stellen sogar hinsichtlich ihrer Zugstabilität (vgl. Abbildungen 10 und 20). Diese Ergebnisse scheinen nicht vereinbar zu sein mit denen aus vorherigen Studien. Als Erklärung für das ähnliche Verhalten der Epi-off-/Epi-on-Gruppen CXLnorm und der Kontrollgruppen in dieser Arbeit kann erneut eine mangelnde Sensitivität der hier verwendeten Messmethoden aufgeführt werden. Möglicherweise sind die Unterschiede zwischen standardmäßig gecrosslinkten Hornhäuten (Epi-off CXLnorm, Epi-on CXLnorm) und unbehandelten Korneae (Epi-off-Kontrolle, Epi-on-Kontrolle) so gering, dass sie mit der hier vorgestellten Methodik nicht erfasst werden konnten. Die Unterschiede zwischen den übrigen Interventionsgruppen (zum Beispiel Epioff CXL_{hyp} + O₂ zu Epi-off CXL_{norm}) scheinen größer zu sein, da hier trotz gleicher Methodenwahl deutliche Tendenzen hinsichtlich einer Steigerung der Zugstabilität erkennbar sind. Basierend auf dieser Annahme darf man weiterhin eine mögliche Verbesserung der CXL-Effektivität durch die Verwendung von hyperbaren Bedingungen und zusätzlichem Sauerstoff während des CXL im Vergleich zum Standardvorgehen unter normobaren Bedingungen ohne zusätzlichen Sauerstoff vermuten, wenngleich sie anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht statistisch belegbar ist.

4.3 Biomechanische Stabilität anhand von Druckprüfungen

Das Protokoll der Druckprüfung, wie sie an den Proben der *Epi-off*-Gruppen CXL_{norm}, CXL_{norm} + O₂, CXL_{hyp}, CXL_{hyp} + O₂ sowie der *Epi-off*-Kontrollgruppe vorgenommen wurde, wurde erstmalig für die hier vorliegende Arbeit etabliert. Da vorherige Studien verbesserte biomechanische Eigenschaften in Form von erhöhter Zugstabilität kornealer Proben nach erfolgtem CXL nahelegen, darf man annehmen, dass auch die Druckstabilität der mit CXL behandelten Hornhäute erhöht ist. Die hier angewandte Druckprüfung wurde mit der Fragestellung angewandt, ob sich die Druckstabilität kornealer Proben nach erfolgtem CXL unter Standardbedingungen (CXL_{norm}), CXL mit zusätzlichem Sauerstoff (CXL_{norm} + O₂), CXL unter hyperbaren Bedingungen (CXL_{hyp}) beziehungsweise CXL unter hyperbaren Bedingungen mit zusätzlichem Sauerstoff (CXL_{hyp} + O₂) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben verändert.

Die Druckprüfung erfolgte an präparierten korneoskleralen Stanzen, die auf einer Silikonform auflagen. Von einer Druckmessung am ganzen Bulbus wurde abgesehen, um den interindividuell schwankenden intraokulären Druck als Störfaktor auszuschließen. Es wurde eine Verformung der Hornhautproben von bis zu 1,5 mm gewählt, da eine stärkere Verformung angesichts einer ungefähren porzinen Hornhautdicke von 800 - 900 µm nicht sinnvoll erscheint. Es ist davon auszugehen, dass bei stärkeren Verformungen vor allem die mechanischen Eigenschaften der Silikonform, auf der die Hornhautproben während der Druckprüfung platziert waren, bestimmt worden wären.

In den Druckprüfungen dieser Arbeit konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden. Zwar lässt die Tendenz der Messwerte einen Vorteil bezüglich der kornealen Druckstabilität nach CXL unter hyperbaren Sauerstoffbedingungen im Vergleich zu den anderen Interventions- und der Kontrollgruppe vermuten, statistische Belege hierfür konnten allerdings nicht erhoben werden. Wertet man die Druckstabilität als Maß der CXL-Effektivität, zeigt demnach kein CXL-Protokoll dieser Arbeit eine statistisch eindeutige Überlegenheit gegenüber den nicht-*gecrosslinkten* Hornhäuten. Dies könnte, ähnlich wie bereits bei den Zugprüfungen diskutiert, auf eine mangelnde Sensitivität der Testmethodik zurückzuführen sein.

4.4 Enzymatische Prüfung

In der aktuellen Literatur werden Prüfungen der Resistenz von Hornhäuten nach CXL gegenüber einem Abbau durch Verdauungsenzyme verwendet, um die Effektivität des erfolgten CXL zu beurteilen^{27,33,36,49-51}. Man geht davon aus, dass CXL dazu beiträgt, die Resistenz der behandelten Hornhäute gegenüber einem Abbau durch körpereigene Verdauungsenzyme zu erhöhen. Schon im Jahr 2004 fanden Spoerl *et al.* heraus, dass *gecrosslinkte* porzine Hornhäute weniger schnell durch Pepsin, Trypsin und Kollagenase A verdaut werden als unbehandelte Schweinehornhäute²⁷. Vermutlich kommt Patient:innen mit Keratokonus eine enzymatische Resistenz nach einer therapeutischen CXL-Anwendung vor allem deshalb zugute, da man bei ihnen eine im Mittel erhöhte Aktivität von Verdauungsenzymen^{28,29} sowie eine reduzierte Aktivität von Proteinase-Inhibitoren in der Kornea gefunden hat^{30,31}.

Die enzymatischen Testungen werden im Regelfall an Hornhautstanzen durchgeführt, die bis zu ihrem vollständigen Verdau mit einem Verdauungsenzym inkubiert werden. Für diese Arbeit fiel die Wahl des Verdauungsenzyms auf Kollagenase A, da im hiesigen Labor bereits ein etabliertes Protokoll zur Inkubation mit Kollagenase A zur Verfügung stand. Dieses Protokoll sah eine Inkubation porziner Hornhautstanzen bei einer Kollagenase A Konzentration von 0,01 U/ml bei einer Enzymaktivität von 0,223 U/mgL vor. Die Kollagenase A Konzentration lag damit eine Zehnerpotenz niedriger als in vorbeschriebenen Publikationen (0,1 U/ml^{27,51}). Dies wurde bewusst toleriert, da mit einer Konzentration von 0,01 U/ml vergleichbare Verdauzeiten unbehandelter Korneae zu denen in den aktuell veröffentlichten Studien erreicht wurden. Anhand der für diese Arbeit durchgeführten Versuche ließ sich beispielsweise eine mittlere Verdaudauer für die Kontrollgruppe von 4,33 Tagen (SD = 1,6 d) verzeichnen. Die porzine Kontrollgruppe bei Spoerl *et al.* aus dem Jahr 2004 lag mit einer durchschnittlichen Dauer von 6 Tagen in einer ähnlichen zeitlichen Größenordnung²⁷. Die abweichenden Konzentrationen der Kollagenase A Lösung von 0,1 U/ml und 0,01 U/ml könnten auf methodische Unterschiede wie zum Beispiel variierende enzymatische Aktivitäten der jeweils verwendeten Enzymchargen zurückzuführen sein. Der Vergleich der Ergebnisse aus dem Protokoll dieser Arbeit mit denen aus bestehenden Publikationen wird allerdings in vielen Fällen dadurch erschwert, dass die Angaben bezüglich der spezifischen Enzymaktivität nicht veröffentlicht wurden. Die Angabe zur Konzentration der Enzymlösung allein ist, ohne Kenntnis über die spezifische Enzymaktivität der vorliegenden Enzymcharge, nicht ausreichend, um eine Einschätzung der Enzymaktivität vorzunehmen, da die Enzyme verschiedener Chargen ungleich aktiv sind. Differenzen in den mittleren Verdauzeiten zwischen verschiedenen Studien können auch darin begründet sein, dass unterschiedlich große korneale Stanzproben verwendet wurden. Während die hier aufgezeichneten Ergebnisse aus Versuchen an runden, porzinen Proben mit einem Durchmesser von 8 mm herrühren, wurden bei Spoerl *et al.* runde porzine Proben mit einem Durchmesser von 10 mm²⁷ und bei Schilde *et al.* beispielsweise 200 µm dicke, per Keratom geschnittene Hornhaut-*Flaps* verwendet⁵¹.

Um die mikrobielle Kontamination der Proben während der Inkubation mit Kollagenase A bei 37 °C möglichst gering zu halten, wurden die Hornhautstanzen vor Beginn der Inkubation für die Experimente dieser Arbeit über Nacht in eine Lösung mit 1-fachem PBS und 5 % Penicillin/Streptomycin gelegt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Antibiotika einen Einfluss auf die im Anschluss vollzogene Inkubation im Sinne einer Beeinträchtigung der Kollagenase-Aktivität gehabt haben. Im Umkehrschluss hätte jedoch auch eine bakterielle Besiedelung die Kollagenase gegebenenfalls in ihrer Funktion beeinflussen können, sodass die Verwendung von 5 % Penicillin/Streptomycin für diese Arbeit als vertretbar und vorteilhaft gewertet wurde.

Um die aufgezeichneten Verdauzeiten überhaupt mit denen aus bestehenden wissenschaftlichen Publikationen zu vergleichen, musste vor Beginn der Datenerhebung definiert werden, wie der enzymatische Verdau kornealer Proben in dieser Arbeit evaluiert werden sollte. Die Messung des Durchmessers der kornealen Stanzen über mehrere Tage hinweg, wie sie in der aktuellen Datenlage immer wieder auftaucht^{27,33,36}, erwies sich als schwierig, da die kornealen Stanzen, die für diese Arbeit gewonnen wurden, nach Beginn der Inkubation aufquollen, im Durchmesser zunahmen und schließlich in der Kollagenase-Lösung seitlich umkippten, so dass die Bestimmung des Durchmessers anhand einer Fotodokumentation nicht repliziert werden konnte. Eine weitere Schwierigkeit in der Anwendung der enzymatischen Testung bestand darin, festzulegen, zu welchem Zeitpunkt ein "vollständiger Verdau" stattgefunden hatte. Anzunehmen, dieser Zeitpunkt sei erreicht,

wenn sich makroskopisch keine kornealen Bestandteile innerhalb der Kollagenase-Lösung mehr sichten lassen, gestaltete sich problematisch, da sich das korneale Material nicht endgültig und vollständig verdauen ließ. Möglicherweise handelte es sich bei dem unverdauten kornealem Restmaterial um Bestandteile der Kornea, die durch die Kollagenase A im Allgemeinen nicht verdaut werden können. Zu dieser Schwierigkeit in der Definition des "vollständigen Verdaus" konnten allerdings keine Informationen in den entsprechenden bereits publizierten Studien gefunden werden. Um die beschriebene Problematik zu lösen, wurde der Zeitpunkt des "vollständigen Verdaus" für diese Arbeit als der Tag festgelegt, an dem sich die korneale Probe mit einer Pipette makroskopisch suspendieren ließ.

Längere Zeiten bis zum vollständigen Verdau können allgemein gesprochen als Zeichen größerer Resistenz gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Kollagenase A verstanden werden. Betrachtet man die Zeitdauern, die im Mittel für die untersuchten Gruppen dieser Arbeit bis zu ihrem vollständigen Verdau notiert wurden, so zeigten sich die Gruppen $CXL_{norm} + O_2(5,4 \text{ d}, SD = 0,9 \text{ d})$ und $CXL_{hyp}(5,4 \text{ d}, SD = 1,7 \text{ d})$ der Gruppe $CXL_{norm}(3,0 \text{ d}, SD = 0,0 \text{ d})$ überlegen. Die längeren Verdauzeiten deuten darauf hin, dass sich sowohl normobare Bedingungen mit zusätzlichem Sauerstoff ($CXL_{norm} + O_2$) als auch reine hyperbare Bedingungen (CXL_{hyp}) positiver auf die enzymatische Resistenz porziner Hornhäute auswirken als das klassische CXL (CXL_{norm}). Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Interventionsgruppen und der Kontrollgruppe (4,33 d, SD = 1,6 d) darstellten. Für *gecrosslinkte* Hornhäute konnte folglich kein Vorteil hinsichtlich der Dauer bis zum vollständigen Verdau und damit kein Hinweis auf eine verbesserte enzymatische Resistenz *gecrosslinkter* Proben im Vergleich zu nicht-*gecrosslinkten* Hornhäuten festgestellt werden.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Schwierigkeiten, den Zeitpunkt des "vollständigen Verdaus" der kornealen Stanzproben zu messen, wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein Kollagen-*Assay* als Mittel der Wahl zur Quantifizierung des enzymatischen Verdaus etabliert. Mit dem Kollagen-*Assay* wurde am dritten, fünften und siebten Tag der Inkubation jeweils der Kollagengehalt bestimmt, der in die Lösung, in der sich die Hornhautproben während der Inkubation befanden, übergegangen war. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente dieser Arbeit gab es keine veröffentlichten Arbeiten, die eine solche

Quantifizierung zur Bewertung der enzymatischen Resistenz nach CXL vorgenommen hatten. Die Anwendung des Kollagen-*Assays* in dieser Arbeit beruhte auf der Überlegung, dass Hornhäute nach effektiverem CXL eine größere Resistenz gegenüber dem Verdau durch Kollagenase A und damit geringere Mengen Kollagengehalt in der Inkubationslösung aufweisen müssten. Die Ergebnisse des dritten Inkubationstages könnten auf eine solche Überlegenheit der Interventionsgruppen $CXL_{norm} + O_2$, CXL_{hyp} und $CXL_{hyp} + O_2$ gegenüber dem konventionellen CXL-Protokoll (CXL_{norm}) hindeuten. Die Ergebnisse des fünften Inkubationstages sind weniger wegweisend, hier zeigte sich lediglich ein Vorteil der Gruppe CXL_{hyp} gegenüber der Gruppe CXL_{norm} . Die Durchführung des Kollagen-*Assays* am siebten Tag scheint rückblickend in Anbetracht der Tatsache, dass die meisten Hornhautproben aller Gruppen in dieser Arbeit bereits am fünften Tag vollständig verdaut waren, nicht mehr sinnvoll. Es deutet sich am siebten Inkubationstag zwar eine Überlegenheit hinsichtlich der Hornhäute nach $CXL_{hyp} + O_2$ gegenüber denen nach CXL_{norm} an, nicht jedoch gegenüber den Kontrollhornhäuten.

Die Tatsache, dass sich zwischen den *gecrosslinkten* Gruppen und der unbehandelten Kontrollgruppe weder am dritten noch am fünften oder am siebten Inkubationstag signifikante Unterschiede zeigten, begrenzt wesentlich die Aussagekraft des durchgeführten Kollagen-*Assays*. Die Erwartung, dass *gecrosslinkte* Hornhäute eine höhere Resistenz gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Kollagenase A aufweisen als nicht*gecrosslinkte* Hornhäute, konnte mit dem Kollagen-*Assay* in dieser Arbeit folglich nicht bestätigt werden. Denkbar wäre, dass die Qualität des Kollagen-*Assays* durch die in der Lösung befindliche Kollagenase A reduziert wurde und der Kollagen-*Assay* daher methodisch schlicht nicht geeignet ist, um eine Bewertung der enzymatischen Resistenz *gecrosslinkter* Hornhäute vorzunehmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier verwendeten Methoden zur Erfassung der mittleren Dauer bis zum vollständigen Verdau sowie der Bestimmung des in Lösung tretenden Kollagengehalts mittels Kollagen-*Assay* während der Inkubation von Hornhautstanzen mit Kollagenase A nicht optimal zur Bewertung der Effektivität von CXL geeignet sind. Ein angedeuteter Vorteil von hyperbaren Konditionen sowie der Verwendung zusätzlichen Sauerstoffs während des CXL im Vergleich zum konventionellen, normobaren CXL ohne zusätzlichen Sauerstoff darf unter Berücksichtigung der ausbleibenden Überlegenheit der Interventionsgruppen gegenüber der nicht-*gecrosslinkten* Kontrollgruppe nicht als Hinweis für effektivere CXL-Protokolle gewertet werden.

4.5 Epi-off versus Epi-on

Die Epithelabrasio, die das Dresdener Protokoll vorsieht, kann im klinischen Alltag dazu führen, dass die mit CXL therapierten Patient:innen postoperativ okuläre Schmerzen erleiden oder Komplikationen des CXL, wie beispielsweise Hornhaut-Perforationen⁵², davontragen. Um die Anzahl der potenziellen Nebenwirkungen zu reduzieren, kam in den vergangenen Jahren die Bestrebung auf, Protokolle zum transepithelialen "Epi-on" CXL zu etablieren. Effektivität und Sicherheit solcher transepithelialer Therapieversuche werden zum heutigen Zeitpunkt noch diskutiert. Unterschiedliche systematische Übersichtsarbeiten aus dem Jahr 2021, die unabhängig voneinander versuchten, die aktuelle Datenlage diesbezüglich darzustellen, kamen zu verschiedenen Ergebnissen. Während Nath et al. den Standpunkt vertreten, dass die neueren Epi-on-Protokolle dem konventionellen Epi-off-Protokoll nach wie vor in der Fähigkeit, den Progress kornealer Ektasien aufzuhalten, unterlegen seien⁵³, ergeben die Analysen von D'Oria et al., dass transepitheliales CXL in seiner Wirksamkeit durchaus vergleichbar mit dem herkömmlichen Verfahren sein kann³⁴. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf verschiedene Einschlusskriterien bei der Durchführung der beiden Übersichtsarbeiten zurückzuführen sein. Während sich D'Oria et al. beispielsweise auf Studien konzentrierten, die explizit Keratokonus-Forschung betrieben, berücksichtigten Nath et al. auch Studien in ihrer Analyse, die sich mit den Auswirkungen des CXL auf unterschiedliche korneale Ektasien beschäftigten. Eine Limitation in der Interpretation der beiden Übersichtsarbeiten besteht darin, dass es sich bei den eingeschlossenen Studien um einen Zusammenschluss mehrerer differierender CXL-Protokolle handelt, die sowohl mehrere Epi-on- als auch diverse Epi-off-Protokolle beinhalten.

Während die aktuelle Datenlage zur Effektivität des transepithelialen CXL zum jetzigen Zeitpunkt noch uneindeutig ist, kann man allerdings bereits von der Sicherheit der *Epi-on*-
Verfahren ausgehen. Sowohl D'Oria *et al.* als auch Nath *et al.* kommen zu dem Schluss, dass CXL-Protokolle ohne Epithelabrasio (*Epi-on*) zu weniger kornealen Nebenwirkungen führen als die klassischen *Epi-off*-Protokolle^{34,53}.

Um den Vergleich zwischen den *Epi-off-* und den *Epi-on-*Gruppen in dieser Arbeit zu vereinfachen, wurden die entsprechenden Protokolle so weit wie möglich aufeinander abgestimmt. Die Handhabung der Augen, die Bestrahlungsstärke und die Bestrahlungszeit, die Konzentration der Riboflavin-Lösung, alle verwendeten Materialien der Versuche sowie das Protokoll der Zugprüfung waren für die *Epi-off-* und die *Epi-on-*Gruppen identisch. Die einzigen methodischen Unterschiede zwischen der *Epi-off-* und der *Epi-on-*Versuchsreihe lagen damit in der Epithelabrasio und der ausführlicheren Testung der *Epi-off-*Gruppen mit zusätzlichen Druckprüfungen und enzymatischen Testungen.

In den für diese Arbeit erhobenen Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen während des *Epi-off*-beziehungsweise *Epi-on*-CXL festgestellt werden⁴⁶. Ein intaktes korneales Epithel scheint somit kein nennenswertes Hindernis für die Diffusion von Sauerstoff in korneales Stroma darzustellen.

Die Durchführung von transepithelialem CXL konnte in dieser Arbeit zudem auch keine Veränderung hinsichtlich der Zugstabilität im Vergleich zum traditionellen *Epi-off*-CXL erzielen⁴⁶. Die Entfernung beziehungsweise die Erhaltung des kornealen Epithels scheint folglich keinen Einfluss auf die CXL-Effektivität, gemessen an der Zugstabilität behandelter Hornhäute, zu haben. Bei der Betrachtung der Standardkraft, die im Mittel zur Dehnung der kornealen Streifen benötigt wurde, könnte man lediglich eine leichte Tendenz hinsichtlich einer vermeintlichen Überlegenheit in der Zugstabilität der *gecrosslinkten Epi-on*-Hornhäute sowie einen manifesten Unterschied zwischen den *Epi-off-/Epi-on*-Kontrollgruppen bei höheren Dehnungszeitpunkten anmerken. Beides lässt sich allerdings mit dem materiellen Vorteil im Sinne einer zusätzlichen Gewebeschicht durch das intakte Epithel der *Epi-on*-Gruppen hinreichend erklären und ist zudem in den Interventionsgruppen nicht von statistischer Signifikanz.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein intaktes korneales Epithel keinen Einfluss auf die intrastromale Sauerstoffkonzentration sowie die Effektivität des CXL, unabhängig von äußeren Druck- und Sauerstoffverhältnissen während der Behandlung, zu haben scheint⁴⁶.

Zwar gibt es aufgrund der jungen Entwicklung der *Epi-on*-Protokolle derzeit noch keine ausreichenden, vergleichenden Langzeitergebnisse bezüglich der Effektivität von *Epi-off-* und *Epi-on*-CXL, allerdings konnte diese Arbeit keine Nachteile hinsichtlich des *Epi-on*-CXL im Vergleich zum konventionellen *Epi-off*-CXL feststellen⁴⁶. Transepitheliales CXL dürfte daher auch in Zukunft eine wichtige Rolle spielen bei der Etablierung von Protokollen mit vergleichbarer Effektivität bei gleichzeitig verbessertem Nebenwirkungsprofil.

4.6 Limitationen der Arbeit

Zur Durchführung von CXL an den Epi-off-Gruppen dieser Arbeit wurde das klassische Dresdener Protokoll gemäß den Arbeiten von Wollensak et al. aus dem Jahr 2003 verwendet^{17,25}. Das Dresdener Protokoll wurde gewählt, da es nicht nur das erste etablierte CXL-Protokoll für Patient:innen mit Keratokonus war, sondern heutzutage nach wie vor Anwendung im klinischen Alltag findet. Es sieht vor Beginn des CXL zunächst eine Epithelabrasio der Hornhaut der Patient:innen sowie die anschließende Benetzung der Kornea mit 0,1 % Riboflavin-Lösung für 30 Minuten vor. Die Bestrahlung mit UV-A Licht erfolgt fünf Minuten nach der ersten Applikation von Riboflavin bei einer Bestrahlungsstärke von 3 mW/cm² über einen Zeitraum von 30 Minuten. Während der Bestrahlung wird die Riboflavin-Applikation in einem fünf-minütigen Intervall fortgeführt. Während das Dresdener-Protokoll folglich eine Riboflavin-Behandlung von insgesamt 35 Minuten vorsieht, finden im klinischen Alltag auch modifizierte Protokolle mit einer Applikationsdauer des Riboflavins von 60 Minuten Anwendung. Es ist davon auszugehen, dass eine längere Riboflavin-Applikationsdauer mit einer stärkeren Absorption von Riboflavin in das korneale Stroma und einer gesteigerten Verfügbarkeit des Riboflavins innerhalb der Hornhaut einhergehen. Da die Funktionsweise des CXL auf dem Vorhandensein des Photosensibilisators Riboflavin beruht, könnte eine Erhöhung der Applikationsdauer von 35 auf 60 Minuten die Effektivität des CXL durch eine bessere Riboflavin-Verfügbarkeit im Stroma der Kornea verbessern⁴⁶. Ein effektiveres CXL könnte seinerseits bewirken, dass Unterschiede zwischen Gruppen mit verschiedenen CXL-Protokollen betont und damit statistisch messbar signifikant werden, die es in der vorliegenden Arbeit bei einer Riboflavin-Applikationsdauer von 35 Minuten nicht waren.

Bei der Beurteilung der hier vorgenommenen Versuche und ihrer Ergebnisse sollte zudem bedacht werden, dass in dieser Arbeit mit porzinen Augen gearbeitet wurde⁴⁶. Bei einer porzinen Kornea muss man im Vergleich zur humanen von einer dickeren Hornhaut ausgehen. Die mittlere zentrale Hornhautdicke beträgt beim Schwein etwa 800 - 900 µm^{48,54} und liegt beim Menschen bei etwa 550 µm¹. Es ist anzunehmen, dass bei den dickeren porzinen Hornhäuten bei gleicher Riboflavin-Applikation ein relativ betrachtet geringerer Anteil des kornealen Stromas mit Riboflavin angereichert wird, als dies bei den dünneren humanen Hornhäuten der Fall ist⁴⁶. Dies gilt insbesondere, da Studien herausfanden, dass vor allem die anterioren 400 µm der Hornhaut von CXL profitieren^{27,32,46}.

Trotz der Verwendung eines klinisch erprobten Protokolls könnte die Effektivität des in dieser Arbeit vorgenommenen CXL also reduziert worden sein durch den Gebrauch porziner Hornhautproben⁴⁶. Dies könnte die Effektivität des CXL in dieser Arbeit beeinträchtigt und Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen maskiert haben⁴⁶. Diese Problematik könnte sich insbesondere in den Ergebnissen der *Epi-on-*Gruppen widerspiegeln, da die Absorption von Riboflavin in das korneale Stroma hier obendrein durch die zusätzliche Barriere, die das intakte Epithel darstellt, erschwert worden sein könnte. Trotz unterschiedlicher Hornhautdicken eignen sich Schweineaugen im Allgemeinen aufgrund ähnlicher Größenverhältnisse als Modell für das menschliche Auge. Sie sind in der ophthalmologischen Forschung etabliert und finden, wie auch Kaninchenaugen, regelmäßig Anwendung in experimentellen Arbeiten^{48,55-57}. Schweine- und Kaninchenaugen weisen insbesondere den Vorteil der besseren Verfügbarkeit als humane Proben auf. Ergebnisse aus Arbeiten mit tierischen Augen lassen sich zwar nicht direkt auf menschliche Patient:innen übertragen, jedoch bieten sie gute Anhaltspunkte, anhand derer Forschung an humanen Proben fortgesetzt werden kann.

Um den Einfluss von zusätzlichem Sauerstoff unter normobaren und hyperbaren Bedingungen während des CXL zu beurteilen, wurde CXL für diese Arbeit in einer abgedichteten Versuchsbox durchgeführt. Die intrakornealen Sauerstoffmessungen lassen allerdings vermuten, dass die Versuchsbox zu Versuchsbeginn noch nicht vollständig mit Sauerstoff angereichert war⁴⁶. Die Berechnung des Volumens innerhalb der Box unter Berücksichtigung des Anflutens der Box mit einer Sauerstoff-Flussrate von elf Litern pro Minute für zwei Minuten unterstützt diese Annahme, da die Box ein fast drei Mal größeres Volumen aufwies (56 cm x 39 cm x 28 cm = $61152 \text{ cm}^3 = 61,152 \text{ L}$) als das Sauerstoffvolumen, mit dem sie angereichert wurde (22 L O₂). In weiterführenden Versuchen sollten die Sauerstoff-Flussrate sowie die Dauer des Sauerstoff-Flusses in die Versuchsbox vor Beginn des CXL erhöht werden, um eine möglichst vollständige Sauerstoff-Sättigung der Versuchsbox zu erreichen. Mittels Sauerstoffsonde könnte außerdem die tatsächliche Sauerstoffkonzentration innerhalb der Box auf Höhe des Versuchsauges in zukünftigen Versuchsreihen kontrolliert werden. Dies wäre insbesondere deshalb wichtig, da reiner Sauerstoff dichter und damit schwerer als Luft ist, sodass anzunehmen ist, dass er innerhalb der Versuchsbox auf den Boden sinkt. Auf diese Weise konnte in den hier vorliegenden Versuchen womöglich nur ein geringer Anteil des supplementierten Sauerstoffs das Versuchsauge, das sich auf einer Erhöhung von 16 cm befand, erreichen. Das Erzielen höherer Sauerstoffsättigungen innerhalb der Versuchsbox könnte möglicherweise einen Einfluss auf die intrakornealen Sauerstoffkonzentrationen und damit auch auf die Effektivität des CXL nehmen.

Für sämtliche in dieser Arbeit vorgenommenen Prüfungen der Effektivität des durchgeführten CXL gilt außerdem zu berücksichtigen, dass hier ausschließlich Proben verwendet wurden, die einen per Femtosekundenlaser angelegten intrakornealen Tunnel und einen Hornhaut-*Flap* aufwiesen. Es ist anzunehmen, dass Tunnel und Hornhaut-*Flap* eine materielle Schwachstelle sowohl in Bezug auf Zug- und Druckprüfungen sowie auf die enzymatischen Testungen darstellten. Möglicherweise hat das Vorhandensein des Tunnels und des Hornhaut-*Flaps* einen Einfluss auf die hier erhobenen Ergebnisse genommen⁴⁶. Es ist denkbar, dass bestehende Unterschiede zwischen den Gruppen auf diese Weise maskiert wurden und daher nicht detektiert werden konnten.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Da in dieser Arbeit festgestellt werden konnte. dass die intrakorneale Sauerstoffkonzentration während des CXL durch die Verwendung zusätzlichen Sauerstoffs unter normobaren und hyperbaren Konditionen gesteigert werden kann, könnte man in weiterführenden Forschungsarbeiten auf intrakorneale Sauerstoffmessungen und folglich auf das Lasern eines intrakornealen Tunnels verzichten. Weiterführende Versuche an Hornhautproben ohne intrakornealen Tunnel und ohne Hornhaut-Flap wären hilfreich, um den Einfluss des Tunnels und des Hornhaut-Flaps als Störfaktor auf die Ergebnisse dieser Arbeit auszuschließen.

Ebenso könnte auch die Hornhautdicke der Proben eine entscheidende Rolle bei der Messung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen gespielt haben. Die relativ dicken porzinen Hornhautproben könnten das Erfassen signifikanter Unterschiede zwischen unterschiedlichen CXL-Protokollen erheblich erschwert haben⁴⁶. Es könnte sinnvoll sein, die hier vorgestellten experimentellen Versuche an dünneren Proben zu wiederholen. Solche Proben könnten in Form von Hornhäuten von Kaninchenaugen (mit einer zentralen Hornhautdicke von etwa 380 µm⁵⁸) oder humanen post-mortem Spenderhornhäuten bereitgestellt werden⁴⁶. Eine weitere Möglichkeit zur Probengewinnung bestünde darin, mit einem Femtosekundenlaser Hornhautlentikel aus beispielsweise porzinen Hornhäuten zu schneiden und diese als Probenmaterial zu verwenden⁴⁶. Es ist denkbar, dass Unterschiede zwischen standardmäßig gecrosslinkten, mit und ohne zusätzlichen Sauerstoff behandelten sowie unter hyperbaren Bedingungen gecrosslinkten Hornhäuten an dünneren Proben deutlicher erkennbar sind und sich in statistisch signifikanten Unterschieden äußern⁴⁶. Weiterhin könnte es in weiterführenden Forschungsarbeiten hilfreich sein, ein modifiziertes Protokoll mit einer länger andauernden Riboflavin-Applikation und einer optimierten Sättigung der Versuchsbox mit Sauerstoff zu verwenden⁴⁶. Nicht zuletzt wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durch die Größe der Stichprobe limitiert. Man darf erwarten, dass eine größere Stichprobe validere Ergebnisse bereitstellen könnte.

Das hier vorgestellte Thema bedarf weiterführender Forschungsarbeiten, um die Ergebnisse mit größeren Stichproben und modifiziertem Protokoll weiter zu überprüfen und, sofern möglich, mit statistischen Mitteln zu festigen. Mit den hier skizzierten Vorschlägen zur Abänderung des Protokolls ergibt sich ein Folgeprojekt, mit dem sich die in dieser Arbeit zusammengetragenen Ergebnisse sinnvoll weiter erforschen ließen. Es ist denkbar, dass auch bei weiterführender Forschung keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Gruppen nach konventionellem CXL-Protokoll, nach CXL-Protokoll mit zusätzlichem Sauerstoff beziehungsweise nach CXL unter hyperbaren Bedingungen mit und ohne zusätzlichen Sauerstoff auftreten. Dies könnte dann darauf zurückzuführen sein, dass tatsächlich keine statistisch messbaren Unterschiede bestehen. Eine Erklärung hierfür könnte möglicherweise sein, dass durch das standardmäßig verwendete CXL-Protokoll bereits ein Maximum an möglichen Cross-Links innerhalb des kornealen Kollagengerüstes erreicht ist und daher keine Verbesserungen der CXL-Effektivität durch zusätzlichen Sauerstoff beziehungsweise hyperbare Bedingungen mit oder ohne zusätzlichen Sauerstoff erzielt werden können. Sollten sich die in dieser Arbeit gefundenen Tendenzen hinsichtlich einer verbesserten Effektivität von CXL nach Verwendung hyperbarer Sauerstoffkonditionen allerdings anhand statistisch signifikant messbarer Unterschiede in weiterführenden präklinischen und klinischen Forschungsarbeiten bestätigen, so könnte dies zur Anpassung bestehender CXL-Protokolle führen. Falls solche Protokolle das Outcome für Patient:innen mit Keratokonus erheblich verbessern, könnte es in Zukunft sinnvoll sein, therapeutisches CXL beispielsweise mit einer Sauerstoffbrille in einer Druckkammer vorzunehmen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1. Grehn F. Augenheilkunde. In: Berlin, Heidelberg Springer Berlin Heidelberg Imprint: Springer 2019.
- 2. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 2013;120(9):1778-1785.
- 3. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1986;101(3):267-273.
- 4. Kristianslund O, Hagem AM, Thorsrud A, Drolsum L. Prevalence and incidence of keratoconus in Norway: a nationwide register study. *Acta Ophthalmol.* 2021;99(5):e694-e699.
- 5. Godefrooij DA, de Wit GA, Uiterwaal CS, Imhof SM, Wisse RP. Age-specific Incidence and Prevalence of Keratoconus: A Nationwide Registration Study. *Am J Ophthalmol.* 2017;175:169-172.
- 6. Marx-Gross S, Fieß A, Münzel T, et al. Much higher prevalence of keratoconus than announced results of the Gutenberg Health Study (GHS). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2023:1-7.
- 7. Sahebjada S, Al-Mahrouqi HH, Moshegov S, et al. Eye rubbing in the aetiology of keratoconus: a systematic review and meta-analysis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2021;259(8):2057-2067.
- 8. Macsai MS, Varley GA, Krachmer JH. Development of keratoconus after contact lens wear. Patient characteristics. *Arch Ophthalmol.* 1990;108(4):534-538.
- 9. Davidson AE, Hayes S, Hardcastle AJ, Tuft SJ. The pathogenesis of keratoconus. *Eye* (*Lond*). 2014;28(2):189-195.
- Fransen E, Valgaeren H, Janssens K, et al. Resequencing of candidate genes for Keratoconus reveals a role for Ehlers-Danlos Syndrome genes. *Eur J Hum Genet*. 2021;29(12):1745-1755.
- 11. Kristianslund O, Drolsum L. Prevalence of keratoconus in persons with Down syndrome: a review. *BMJ Open Ophthalmol.* 2021;6(1):e000754.
- 12. Hashemi H, Heydarian S, Hooshmand E, et al. The Prevalence and Risk Factors for Keratoconus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cornea*. 2020;39(2):263-270.
- 13. Rabinowitz YS. Keratoconus. Surv Ophthalmol. 1998;42(4):297-319.
- 14. Walter P. Basiswissen Augenheilkunde. In: Berlin, Heidelberg Springer Berlin Heidelberg Imprint: Springer 2017.
- 15. Mohammadpour M, Heidari Z, Hashemi H. Updates on Managements for Keratoconus. *J Curr Ophthalmol.* 2018;30(2):110-124.
- 16. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res.* 1998;66(1):97-103.
- 17. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2003;135(5):620-627.
- 18. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin crosslinking of the cornea. *Cornea*. 2007;26(4):385-389.

- 19. Hersh PS, Stulting RD, Muller D, Durrie DS, Rajpal RK. United States Multicenter Clinical Trial of Corneal Collagen Crosslinking for Keratoconus Treatment. *Ophthalmology*. 2017;124(9):1259-1270.
- 20. Lang SJ, Messmer EM, Geerling G, et al. Prospective, randomized, double-blind trial to investigate the efficacy and safety of corneal cross-linking to halt the progression of keratoconus. *BMC Ophthalmol.* 2015;15:78.
- 21. Kobashi H, Rong SS. Corneal Collagen Cross-Linking for Keratoconus: Systematic Review. *Biomed Res Int.* 2017;2017:8145651.
- 22. Li J, Ji P, Lin X. Efficacy of corneal collagen cross-linking for treatment of keratoconus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127079.
- 23. Godefrooij DA, Gans R, Imhof SM, Wisse RP. Nationwide reduction in the number of corneal transplantations for keratoconus following the implementation of cross-linking. *Acta Ophthalmol.* 2016;94(7):675-678.
- 24. Dunker SL, Armitage WJ, Armitage M, et al. Practice patterns of corneal transplantation in Europe: first report by the European Cornea and Cell Transplantation Registry. *J Cataract Refract Surg.* 2021;47(7):865-869.
- 25. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(9):1780-1785.
- 26. Ashwin PT, McDonnell PJ. Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research. *Br J Ophthalmol.* 2010;94(8):965-970.
- 27. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res.* 2004;29(1):35-40.
- 28. Zhou L, Sawaguchi S, Twining SS, Sugar J, Feder RS, Yue BY. Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(7):1117-1124.
- 29. Sawaguchi S, Yue BY, Sugar J, Gilboy JE. Lysosomal enzyme abnormalities in keratoconus. *Arch Ophthalmol.* 1989;107(10):1507-1510.
- 30. Sawaguchi S, Twining SS, Yue BY, Wilson PM, Sugar J, Chan SK. Alpha-1 proteinase inhibitor levels in keratoconus. *Exp Eye Res.* 1990;50(5):549-554.
- 31. Sawaguchi S, Twining SS, Yue BY, et al. Alpha 2-macroglobulin levels in normal human and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(12):4008-4014.
- 32. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavinultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(9):1786-1790.
- 33. Aldahlawi NH, Hayes S, O'Brart DPS, O'Brart ND, Meek KM. An investigation into corneal enzymatic resistance following epithelium-off and epithelium-on corneal cross-linking protocols. *Exp Eye Res.* 2016;153:141-151.
- 34. D'Oria F, Palazón A, Alio JL. Corneal collagen cross-linking epithelium-on vs. epithelium-off: a systematic review and meta-analysis. *Eye Vis (Lond)*. 2021;8(1):34.
- 35. Wen D, Song B, Li Q, et al. Comparison of Epithelium-Off Versus Transepithelial Corneal Collagen Cross-Linking for Keratoconus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cornea.* 2018;37(8):1018-1024.
- 36. Hayes S, Kamma-Lorger CS, Boote C, et al. The effect of riboflavin/UVA collagen cross-linking therapy on the structure and hydrodynamic behaviour of the ungulate and rabbit corneal stroma. *PLoS One.* 2013;8(1):e52860.

- 37. Richoz O, Hammer A, Tabibian D, Gatzioufas Z, Hafezi F. The Biomechanical Effect of Corneal Collagen Cross-Linking (CXL) With Riboflavin and UV-A is Oxygen Dependent. *Transl Vis Sci Technol.* 2013;2(7):6.
- 38. Seiler TG, Komninou MA, Nambiar MH, Schuerch K, Frueh BE, Büchler P. Oxygen Kinetics During Corneal Cross-linking With and Without Supplementary Oxygen. *Am J Ophthalmol.* 2021;223:368-376.
- 39. Borchert GA, Watson SL, Kandel H. Oxygen in Corneal Collagen Crosslinking to Treat Keratoconus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* 2022;11(5):453-459.
- 40. Kamiya K, Kanayama S, Takahashi M, Shoji N. Visual and Topographic Improvement with Epithelium-On, Oxygen-Supplemented, Customized Corneal Cross-Linking for Progressive Keratoconus. *J Clin Med.* 2020;9(10).
- 41. Mazzotta C, Sgheri A, Bagaglia SA, Rechichi M, Di Maggio A. Customized corneal crosslinking for treatment of progressive keratoconus: Clinical and OCT outcomes using a transepithelial approach with supplemental oxygen. *J Cataract Refract Surg.* 2020;46(12):1582-1587.
- 42. Matthys A, Cassagne M, Galiacy SD, El Hout S, Fournié P, Malecaze F. Transepithelial Corneal Cross-linking With Supplemental Oxygen in Keratoconus: 1-Year Clinical Results. *J Refract Surg.* 2021;37(1):42-48.
- 43. Faramarzi A, Hassanpour K, Rahmani B, Yazdani S, Kheiri B, Sadoughi MM. Systemic supplemental oxygen therapy during accelerated corneal crosslinking for progressive keratoconus: randomized clinical trial. *J Cataract Refract Surg.* 2021;47(6):773-779.
- 44. Aydın E, Aslan MG. The efficiency and safety of oxygen-supplemented accelerated transepithelial corneal cross-linking. *Int Ophthalmol.* 2021;41(9):2993-3005.
- 45. Sun L, Li M, Zhang X, et al. Transepithelial accelerated corneal collagen crosslinking with higher oxygen availability for keratoconus: 1-year results. *Int Ophthalmol.* 2018;38(6):2509-2517.
- 46. Menzel-Severing J, Seiler T G, Streit T, Schmiedel J, Dreyer S, Witt J & Geerling G. Hyperbaric Oxygenation Maintains Elevated Stromal Oxygen Availability During Corneal Collagen Crosslinking with and Without Epithelial Removal. *Curr Eye Res.* 2024;10.1080/02713683.2024.2372787.
- 47. Salmon HA, Chalk D, Stein K, Frost NA. Cost effectiveness of collagen crosslinking for progressive keratoconus in the UK NHS. *Eye (Lond)*. 2015;29(11):1504-1511.
- 48. Sanchez I, Martin R, Ussa F, Fernandez-Bueno I. The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;249(4):475-482.
- 49. Aldahlawi NH, Hayes S, O'Brart DP, Akhbanbetova A, Littlechild SL, Meek KM. Enzymatic Resistance of Corneas Crosslinked Using Riboflavin in Conjunction With Low Energy, High Energy, and Pulsed UVA Irradiation Modes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(4):1547-1552.
- 50. Aldahlawi NH, Hayes S, O'Brart DP, Meek KM. Standard versus accelerated riboflavin-ultraviolet corneal collagen crosslinking: Resistance against enzymatic digestion. *J Cataract Refract Surg.* 2015;41(9):1989-1996.
- 51. Schilde T, Kohlhaas M, Spoerl E, Pillunat LE. [Enzymatic evidence of the depth dependence of stiffening on riboflavin/UVA treated corneas]. *Ophthalmologe*. 2008;105(2):165-169.

- 52. Tillmann A, DanielKampik D, Borrelli M, et al. Acute corneal melt and perforation -A possible complication after riboflavin/UV-A crosslinking (CXL) in keratoconus. *Am J Ophthalmol Case Rep.* 2022;28:101705.
- 53. Nath S, Shen C, Koziarz A, et al. Transepithelial versus Epithelium-off Corneal Collagen Cross-linking for Corneal Ectasia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2021;128(8):1150-1160.
- 54. Heichel J, Wilhelm F, Kunert KS, Hammer T. Topographic Findings of the Porcine Cornea. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol.* 2016;5(4):125-131.
- 55. Zeng Y, Yang J, Huang K, Lee Z, Lee X. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. *J Biomech*. 2001;34(4):533-537.
- 56. Subasinghe SK, Ogbuehi KC, Mitchell L, Dias GJ. Animal model with structural similarity to human corneal collagen fibrillar arrangement. *Anat Sci Int.* 2021;96(2):286-293.
- 57. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta Ophthalmol.* 2009;87(1):48-51.
- 58. Wang X, Wu Q. Normal corneal thickness measurements in pigmented rabbits using spectral-domain anterior segment optical coherence tomography. *Vet Ophthalmol.* 2013;16(2):130-134.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Gerd Geerling dafür bedanken, dass ich mein Promotionsvorhaben an der Klinik für Augenheilkunde am UKD umsetzen durfte.

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Johannes Menzel-Severing, möchte ich für seine exzellente Betreuung meines Promotionsvorhabens sowie für seine unermüdliche Geduld währenddessen danken. Auf sein Engagement, seine ständige Unterstützung und seine hilfreichen Anregungen konnte ich mich jederzeit verlassen.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Johannes Schneppendahl für die freundliche Übernahme der Co-Betreuung meines Promotionsvorhabens und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Neukirchen für den kurzfristigen Beistand als Gutachter dieser Arbeit danken.

Dem gesamten Team aus dem Labor für Experimentelle Ophthalmologie in Düsseldorf bin ich außerordentlich dankbar für ihre Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und die weitergegebene Freude daran. Frau Dr. med. Jule Schmiedel möchte ich für ihre sorgsame Einarbeitung danken. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Joana Witt für ihre zahlreichen Ratschläge, ihre immerwährende Erreichbarkeit und ihren ununterbrochenen Einsatz auf meinem Weg zur Promotion.

Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. med. Sven Dreyer sowie dem gesamten Team der Hyperbaren Sauerstofftherapie am Universitätsklinikum Düsseldorf. Ich bin ihnen sehr dankbar für ihre zeitintensive und tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung der Experimente in der Druckkammer.

Schließlich möchte ich mich bei der Dr. Rolf M. Schwiete Stiftung für die finanzielle Förderung dieses Forschungsprojektes, bei der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Vergabe ihres Promotionsstipendiums an mich während meines Forschungssemesters und bei den *Heine Research Academies* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die finanzielle Unterstützung in Form des *HeRA Travel Grants* bedanken.