

Aus dem
CharitéCentrum für Audiologie / Phoniatrie, Augen- und HNO-Heilkunde
Klinik für Augenheilkunde
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Antonia M. Jousen

Habilitationsschrift

Klinisch-experimentelle Ergebnisse nach „Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty“ unter Verwendung von Trypanblau

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Augenheilkunde

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Tobias Brockmann
geboren in Rostock

Eingereicht: Oktober 2018
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Friedrich E. Kruse
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Stefan Schrader

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Anatomie und Physiologie der Hornhaut	1
1.1.1 Schichten der Hornhaut	2
1.2 Endotheliale Hornhauterkrankungen	5
1.2.1 Fuchs Endotheldystrophie	5
1.2.2 Bullöse Keratopathie	7
1.2.3 Endotheliale Transplantatdekompensation	8
1.3 Operationsmethoden endothelialer Keratopathien	9
1.3.1 Perforierende Keratoplastik (PK)	10
1.3.2 Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty (DSEK)	10
1.3.3 Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK)	11
1.4 Bedeutung von Vitalfarbstoffen	12
1.4.1 Trypanblau	12
2 Ziele der Arbeit	14
3 Eigene Arbeiten	15
3.1 Publikation 1: Primäre Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty bei Fuchs Endotheldystrophie und bullöser Keratopathie: Histopathologie und klinische Ergebnisse	15

3.2 Publikation 2: Prädiktoren klinischer Ergebnisse nach primärer Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty bei Fuchs Endotheldystrophie	24
3.3 Publikation 3: Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty bei Transplantatversagen nach Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty: Klinische Ergebnisse und histopathologische Befunde	33
3.4 Publikation 4: Klinisch-pathologische Mechanismen der Transplantat-Ablösung nach Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty	42
3.5 Publikation 5: Photodynamik von Vitalfarbstoffen	50
3.6 Publikation 6: Photochemische Degradierung von Trypanblau	57
4 Diskussion	74
4.1 Klinische Ergebnisse nach DMEK	74
4.2 Histopathologie der Endothel-Descemet-Membran	78
4.3 Photochemische Eigenschaften von Trypanblau	80
5 Zusammenfassung	83
Literaturverzeichnis	85
Danksagung	94
Erklärung	96

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABL	Anterior Banded Layer
BCVA	Best-korrigierter Visus (engl. Best-Corrected Visual Acuity)
BK	Bullöse Keratopathie
CCT	Zentrale Hornhautdicke (engl. Central Corneal Thickness)
DMEK	Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty
DSEK	Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty
ECD	Endothelzellichte (engl. Endothelial Cell Density)
EDM	Endothel-Descemet-Membran
FED	Fuchs Endotheldystrophie
h	Stunde (engl. Hour)
IOD	Intraokularer Druck
IOL	Intraokularlinse
logMAR	Logarithmus der kleinsten noch auflösbaren Winkelminute (engl. Minimum Angle of Resolution), Einheit der Sehschärfe
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
NMR	Kernspinresonanz (engl. Nuclear Magnetic Resonance)
OCT	Optische Kohärenztomographie
PK	Perforierende Keratoplastik
PNBL	Posterior Non-Banded Layer
rebubbling	Operationsprozedur bei der, im Fall einer Transplantat-Ablösung, Luft in die Augenvorderkammer eingegeben wird
SF6	Schwefelhexafluorid
TB	Trypanblau
TOF	Flugzeitanalyse (engl. Time Of Flight)
UV/Vis	Wellenlängenbereich des ultravioletten und sichtbaren Lichts
VA	Vorderabschnitt des Auges
Visus	Sehschärfe

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Hornhaut

Die Hornhaut (Cornea) bildet die vordere Begrenzung und Barriere des Bulbus oculi und trägt durch ihre Transparenz, Avaskularität und Wölbung maßgeblich zur scharfen Abbildung von Objekten auf der Netzhaut bei. Sie ist in leicht ellipsoider Form zentral in die Sklera eingelassen, der mittlere Durchmesser beträgt horizontal 11,7 mm und vertikal 10,6 mm.^{1, 2} Während die Pupille einen mittleren Durchmesser von 3 bis 5 mm annimmt,³ beträgt der Durchmesser der optischen Zone etwa 3 bis 4 mm.⁴ Von der Gesamtbrechkraft des menschlichen Auges, mit etwa 60 Dioptrien, entfallen circa 43 Dioptrien auf die Brechkraft der Hornhaut.⁵ Zum einen wird diese starke Brechkraft durch den höheren Brechungsindex von 1,37⁶ – im Vergleich zum Brechungsindex der Luft von 1,00 – und durch die hohe Ordnungsstruktur der Kollagenfasern des Hornhautstromas, sowie durch die bradytrophen Eigenschaften des Gewebes erreicht; zum anderen tragen die Hornhauttradien entscheidend zur Lichtbrechung bei. Eine Übersichtsaufnahme des gesunden vorderen Augenabschnitts zeigt **Abbildung 1.1**.

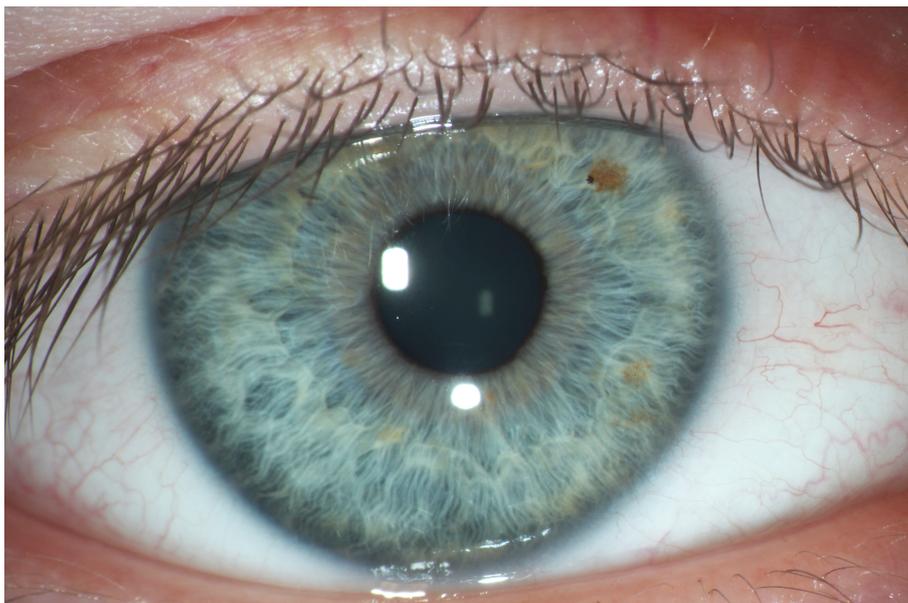


Abb. 1.1 Aufnahme eines gesunden rechten Augenvorderabschnitts.

Der mittlere Hornhautradius beträgt 7,8 mm an der Vorderfläche und 6,5 mm an der Rückfläche.⁷ Hierbei geht die Wölbung der Rückfläche aufgrund des geringeren Unterschieds der Brechungsindices zwischen Cornea und Kammerwassers weniger stark in die gesamte Hornhautbrechkraft ein. Die Hornhautradien sind in dem optischen Schnittbild (VA-OCT) der zentralen Hornhaut in **Abbildung 1.2** erkennbar.

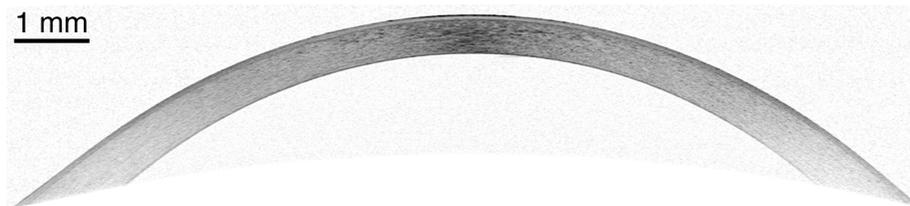


Abb. 1.2 Optische Kohärenztomographie (OCT) der Hornhaut eines gesunden Auges. Die Krümmungen der vorderen und hinteren Hornhautgrenzflächen entsprechen dem vorderen und hinteren Hornhautradius.

Embryonal entstammt das Epithel der Hornhaut dem Ektoderm, alle anderen cornealen Schichten dem Mesoderm.⁸ Die Innervation der Cornea erfolgt aus den sensiblen Ästen des Nervus ophthalmicus, dem ersten Endast des fünften Hirnnerven (Nervus trigeminus).⁹

1.1.1 Schichten der Hornhaut

Lichtmikroskopisch ist die Hornhaut aus fünf Schichten aufgebaut. Sie hat im Zentrum eine mittlere Dicke von 0,52 mm, die zur Peripherie hin auf 0,67 mm ansteigt.² **Abbildung 1.3** zeigt die histologischen Schichten der Cornea.

Die äußere Begrenzung der Hornhaut stellt das 40 – 60 μm dicke, mehrschichtige (5 – 7 Zellschichten), nicht-verhornende Plattenepithel dar.¹⁰ Dessen circa 1 μm dicke Basalmembran ist fest mit der Bowman-Membran, der äußeren Grenzmembran (Lamina limitans anterior bzw. Lamina fibroreticularis) verbunden.¹¹

Die Bowman-Membran ist eine circa 8 – 14 μm dicke, homogene und zellfreie Schicht, die vorwiegend aus retikulär angeordneten Typ I Kollagenfibrillen und Proteoglykan-reicher Matrix besteht.¹²

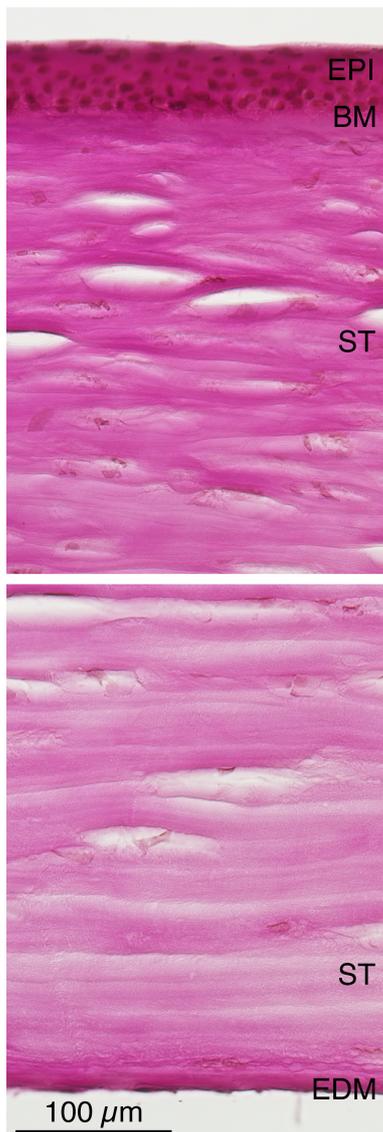


Abb. 1.3 Lichtmikroskopische Aufnahme von Teilen einer humanen Hornhaut in Hämatoxylin-Eosin Färbung. Der Zusammenschnitt zeigt oben die epitheliale und unten die endotheliale Seite. Von außen (oben) nach innen (unten) zeigt sich der fünfschichtig Aufbau aus Epithel (EPI), Bowman-Membran (BM), Stroma (ST), Descemet-Membran und Endothel (hier als Endothel-Descemet-Membran (EDM) bezeichnet). Die Schichtdicke des Hornhautstromas ist in der zusammengeschnittenen Abbildung nicht vollständig abgebildet.

Das Hornhautstroma mit einer Schichtdicke von 400 – 500 μm stellt mit 90% den größten Anteil der gesamten Hornhaut dar. Die zueinander rechtwinklig angeordneten und parallel aufeinanderliegenden Lagen der 5 – 6 μm dicken Kollagenfasern bestehen aus Typ I (90%) und Typ III (10%) Kollagenfibrillen, die innerhalb der einzelnen Lamellen sehr regelmäßig angeordnet sind.^{13, 14} In das Hornhautstroma sind dicht angeordnete Nervenfasereindigungen eingelassen. Der zelluläre Anteil innerhalb des Hornhautstromas ist mit etwa 2% gering und besteht hauptsächlich aus dem Zellverband der Keratozyten, die den Fibrozyten anderer Bindegewebe ähneln.

Dem Stroma liegt nach innen die Descemet-Membran als hintere Grenzmembran (Lamina limitans posterior) an. Die Dicke der Descemet-Membran nimmt mit dem Alter zu, sie beträgt im frühen Erwachsenenalter 5 – 10 μm .¹⁵ Die Descemet-Membran gliedert sich wiederum in einen ‚Anterior Banded Layer‘ (ABL, ca. 3 μm) und einen ‚Posterior Non-Banded Layer‘ (PNBL). Der PNBL besitzt eine altersabhängige Schichtdickenzunahme von circa 3 μm in der Jugend auf über 10 μm im Alter.¹⁶ Die Matrix der Descemet-Membran bestehend hauptsächlich aus Typ IV und Typ VIII Kollagenen, sowie Laminin, ein kollagenähnliches Glykoprotein, welches von den Endothelzellen sezerniert wird.¹⁵

Das etwa 5 μm dicke einschichtige Hornhautendothel ist die innerste Auskleidung der Hornhaut und liegt der Descemet-Membran auf. Es besteht aus hexagonalen Endothelzellen mit einem Durchmesser von etwa 20 μm .¹⁶ Die Endothelzellen bilden mit ihren dichten zellulären Verbindungen (Zonulae occludentes) eine Barriere für das Kammerwasser und besitzen die Aufgabe kontinuierlich aktiv Wasser aus der Hornhaut heraus zu transportieren, sie fungieren damit als sogenannte „Endothelpumpen“. Während in den ersten Lebensjahren die Endothelzellichte etwa 4.000 – 5.700 Zellen/ mm^2 beträgt,¹⁷ nimmt diese mit dem Lebensalter auch unter physiologischen Bedingungen stetig ab und beträgt im Erwachsenenalter etwa 2.000 – 2.500 Zellen/ mm^2 .¹⁸ Die humanen Hornhautendothelzellen können sich nicht regenerieren, allerdings kommt es bei einem Endothelschaden und -verlust zu einer lokalen Umverteilung und Adaptation bestehender Zellen.

1.2 Endotheliale Hornhauterkrankungen

Das Hornhautendothel ist für die Integrität der Hornhaut von zentraler Bedeutung. Durch die Pumpleistung der Endothelzellen wird der bradytrophe Hydratationszustand, insbesondere des Hornhautstromas, aufrechterhalten und damit die Transparenz der Hornhaut gewahrt. Fällt die Endothelzelldichte unterhalb des kritischen Bereichs von 800 Zellen/mm² oder nimmt die zelluläre Pumpfunktion ab, kommt es zum Ödem und damit zur Eintrübung der Hornhaut.^{19, 20} Der Wassereinstrom entsteht hierbei maßgeblich durch die osmotische Wirkung von Proteoglykanen zwischen den Kollagen-Lamellen des Stromas, die eine hohe Wasserbindungskapazität besitzen.

Es gibt verschiedene Ursachen für den Verlust der Endothelfunktion. Ein massiver Endothelzellverlust kann z.B. durch ein okuläres Trauma, einen Glaukomanfall oder nach intraokulären Eingriffen (iatrogen) entstehen; und dadurch zu einer bullösen Keratopathie führen.²¹ Chronisch degenerative Hornhaut-Endothelerkrankungen, wie die Fuchs Endotheldystrophie,²² die hintere polymorphe Endotheldystrophie²³ oder das iridocorneale Endothelsyndrom (ICE-Syndrom)²⁴ führen zu einem progressiven Verlust der Endothelzelldichte, einhergehend mit der Abnahme der Pumpleistung und morphologischen Veränderungen innerhalb der Descemet-Membran.

Eine Endotheldekompensation kann jedoch auch nach erfolgter Hornhauttransplantation auftreten.²⁵ Hierbei kann der Endothelzellverlust langsam, aufgrund einer stetigen Abnahme der Endothelzelldichte, oder plötzlich im Rahmen einer immunologischen Transplantatreaktion erfolgen.

1.2.1 Fuchs Endotheldystrophie

Die Fuchs Endotheldystrophie (FED) ist die häufigste endotheliale Hornhauterkrankung, deren Inzidenz mit zunehmendem Alter ansteigt. Typischerweise liegt der Erkrankungsbeginn in der 6. Lebensdekade; dementsprechend wird in der Patientengruppe über 50 Jahren eine Prävalenz zwischen 3,7% und 9,2% angenommen.^{26, 27} Die klassischen Symptome sind schleichende

Sehverschlechterung, zunehmende Blendempfindlichkeit, sowie das Wahrnehmen von Lichtringen (Halos) und Strahlenkränzen um Lichtquellen. Hierbei sind die Beschwerden am Morgen stärker und verbessern sich im Tagesverlauf. Die Diagnosestellung erfolgt klinisch an der Spaltlampe. Es zeigt sich bereits frühzeitig der typische gehämmerte Endothelbeschlag (guttae, Stadium 1, **Abbildung 1.4**). Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zum zunehmenden Stromaödem (Stadium 2), zu Endothelfalten und epithelialen Bullae (Stadium 3), sowie im Spätstadium zur subepithelialen Fibrose, stromalen Narben und Gefäßeinsprossungen in die Hornhaut (Stadium 4).

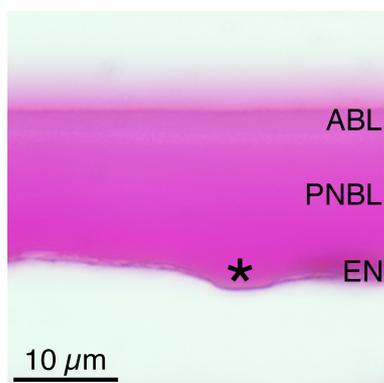


Abb. 1.4 Lichtmikroskopische Aufnahme einer Endothel-Descemet-Membran bei Fuchs Endotheldystrophie in Hämatoxylin-Eosin Färbung. In den Schichten lassen sich der Anterior Banded Layer (ABL), der Posterior Non-Banded Layer (PNBL) und das Endothel (EN) unterscheiden. Endothelseitig zeigen sich die typischen warzenartige Verdickungen (*, guttae).

Während die FED sporadisch auftreten kann, existieren auch Vererbungsmuster. In diesem Zusammenhang konnten zwei autosomal-dominante Mutationen (L450W und Q455K)^{28, 29} in dem Gen der $\alpha 2$ Kette des Typ VIII Kollagens (COL8A2) gefunden werden. Das Typ VIII Kollagen befindet sich hauptsächlich in dem Anterior Banded Layer der Descemet-Membran. Weiterhin wurden Loss-of-Function-Mutationen im Bereich der Transkriptionsfaktoren TCF4 (reguliert die Expression des E2-2 Proteins)³⁰ und TCF8 (reguliert die Expression des ZEB1 Proteins)³¹ gefunden. Bezüglich der Endothelzellen zeigten sich verschiedene assoziierte Mutationen im SLC4A11 Gen, das den Natrium-Borat-Cotransporter NaBC1 kodiert und damit zur Endothelzellpumpe beiträgt.^{32, 33} Ebenso führt eine Missense-Mutation im LOXHD1-Gen zu einer Überexpression und damit zur Störung der Endothelfunktion durch Akkumulation des kodierten Membranproteins.

Während die zugrundeliegenden Mutationen im Wesentlichen die Konsistenz der Descemet-Membran und die Funktion der Endothelzellen betreffen, sind im weiteren Verlauf der Erkrankung alle Hornhautschichten, durch primär oder sekundär bedingte morphologischen Veränderungen, von der FED betroffen.

1.2.2 Bullöse Keratopathie

Namensgebend für die bullöse Keratopathie (BK) sind die typischen Epithelbläschen (bullae), die auf eine Endotheldysfunktion schließen lassen. Meist liegt hierbei ein massiver Endothelzellverlust, häufig nach einem intraokularen Eingriff (iatrogen) oder Trauma, zu Grunde. Ab einer Endothelzelldichte unter 800 Zellen/mm² kann die corneale Endothelinsuffizienz einsetzen,^{19, 20} bei der nicht mehr ausreichend Wasser aus dem Hornhautstroma herausgepumpt werden kann und es somit zur Entstehung eines Hornhautödems kommt. Die klassischen Symptome der BK sind eine ausbleibende Visusbesserung nach intraokulärer Chirurgie,³⁴ z.B. nach Katarakt-Operation,³⁵ verbunden mit Blendempfindlichkeit und Schmerzen. Die Inzidenz der BK nach Katarakt-Operationen wird mit 1 – 2% angegeben.³⁶ Hierbei tragen insbesondere Patienten, die bereits präoperativ eine Endothelzelldichte unter 1.000 Zellen/mm² aufweisen ein erhöhtes Risiko für eine BK. Patienten mit einer Fuchs Endotheldystrophie sind dabei besonders gefährdet, da sie bereits eine eingeschränkte Endothelzelldichte und –funktion aufweisen. **Abbildung 1.5** zeigt die Endothel-Descemet-Membran einer Hornhaut mit bullöser Keratopathie.

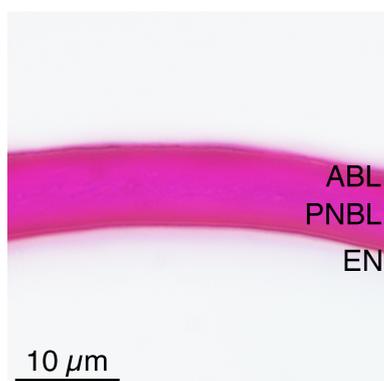


Abb. 1.5 Lichtmikroskopische Aufnahme einer Endothel-Descemet-Membran mit bullöser Keratopathie in Hämatoxylin-Eosin Färbung. In den Schichten lassen sich der Anterior Banded Layer (ABL), der Posterior Non-Banded Layer (PNBL) und das Endothel (EN) unterscheiden.

Klinisch zeigt sich die Endotheldekompensation an der Spaltlampe durch Descemetfalten, Hornhautstromaödem und aufgequollene Epithelzellen. Kommt es durch Aufreißen der Epithelbläschen zu Oberflächendefekten besteht die Gefahr einer bakteriellen Infektion, die zum Hornhautulkus und im schlechtesten Fall zur Hornhaut-Perforation führen kann.

1.2.3 Endotheliale Transplantatdekompensation

Das Transplantatversagen nach Keratoplastik kann Folge einer immunvermittelten Graft-versus-Host Reaktion im Rahmen einer Abstoßung oder eines nicht-immunologisch bedingten Endothelzellverlustes sein.^{37, 38} Während das Transplantatversagen bei einer Abstoßung rasch erfolgt und klinisch mit plötzlichem Visusverlust, Augenrötung, Schmerzen sowie starker Blendempfindlichkeit verbunden ist, verläuft die endotheliale Transplantatdekompensation langsam und führt zur allmählichen Visusverschlechterung mit zunehmender Blendempfindlichkeit. Schmerzen treten hierbei erst spät durch Epithelbläschen (bullae) aufgrund des persistierenden Hornhautödems auf. Das Auftreten eines Transplantatversagens ist abhängig von der Ausgangssituation, intra- und perioperativen Komplikationen, sowie bestehenden okulären Komorbiditäten.³⁹⁻⁴² Die kumulative 5-Jahresinzidenz des Transplantatversagens wird nach perforierender Keratoplastik mit 8 – 33%, nach Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty (DSEK) mit 7 – 21% und nach Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK) mit 5 – 7% angegeben.⁴³⁻⁴⁷ **Abbildung 1.6** zeigt ein dekomensiertes DSEK Transplantat.

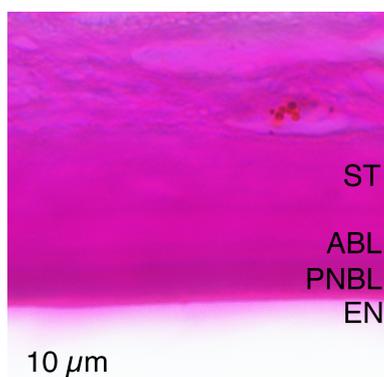


Abb. 1.6 Lichtmikroskopische Aufnahme eines Hornhaut-Lenticles, bestehend aus Stroma mit Endothel-Descemet-Membran, bei Transplantatdekompensation nach DSEK in Hämatoxylin-Eosin Färbung. Im histologischen Schnitt lassen sich das Stroma (ST), der Anterior Banded Layer (ABL), der Posterior Non-Banded Layer (PNBL) und das Endothel (EN) darstellen.

1.3 Operationsmethoden endothelialer Keratopathien

Die Idee des Hornhautersatzes zur Behandlung von Hornhautnarben entstand bereits im 18. Jahrhundert. Erste Tierversuche der Hornhauttransplantation erfolgten im 19. Jahrhundert (1813) von Karl Himly in Göttingen.⁴⁸ Im 20. Jahrhundert (1905) gelang es Eduard Zirm in Olmütz/Tschechien⁴⁹ die erste erfolgreiche autologe Keratoplastik bei einem Patienten nach Kalkverätzung durchzuführen. Er legte damit den Grundstein der Hornhauttransplantation am Menschen. Die weitere Entwicklung der Operationsmikroskope und -instrumente, sowie das bessere immunologische Verständnis führten in der Folgezeit zur Etablierung der allogenen Hornhauttransplantation von Totspendern als sicheres und reproduzierbares Operationsverfahren. Hierbei gilt Walther Löhlein, der ab 1934 in Berlin wirkte, als Wegbereiter. Zunehmend stellten sich der Zustand des Hornhautendothels und das Abstoßungsrisiko als die entscheidenden Kriterien für den langfristigen Behandlungserfolg heraus. Infolgedessen konzentrierte sich die weitere Verbesserung der Keratoplastik, am Anfang des 21. Jahrhunderts, auf Operationstechniken des Hornhautendothels. Ein wesentlicher Schritt war hierbei die selektive Entfernung des erkrankten Hornhautendothels durch das kreisförmige Abziehen des Endothel-Descemet-Membran (Descemetorhexis).⁵⁰ Hierdurch kann anschließend mittels lamelläre Keratoplastik das Endothel durch gesundes Gewebe eines Todspenders ersetzt werden. Dies kann, wie 2005 von Francis Price erstmals beschrieben, durch eine Hornhautlamelle, bestehend aus einem dünnen Stromaanteil und der Endothel-Descemet-Membran, im Rahmen einer sogenannten „Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty“ (DSEK) erfolgen.⁵¹ Als Weiterentwicklung dieser Methode gilt die gezielte Übertragung der Endothel-Descemet-Membran im Rahmen einer sogenannten „Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty“ (DMEK), wie 2006 von Gerrit Melles beschrieben.^{52, 53}

1.3.1 Perforierende Keratoplastik (PK)

Bei der durchgreifenden (perforierenden) Keratoplastik werden alle fünf Hornhautschichten durch ein Transplantat ersetzt.⁵⁴ Hierbei wird unter dem Mikroskop mittels eines speziellen kreisförmigen Schneidinstrumentes (Trepan) zunächst eine runde Scheibe aus der erkrankten Hornhaut des Empfängers entfernt (Trepation). Anschließend wird in den Defekt eine zuvor präparierte und gleichermaßen ausgeschnittene gesunde Hornhautscheibe eines Spenders mit feinen, nicht-resorbierbaren Fäden eingenäht. Der postoperative Heilungsverlauf ist langwierig. Es dauert in der Regel mehr als ein Jahr bis die Hornhautfäden entfernt werden können. Häufig verbleibt eine Fehlsichtigkeit, die bei etwa 20% der Patienten aufgrund eines hohen oder irregulären Astigmatismus nur durch formstabile Kontaktlinsen korrigiert werden kann.⁵⁵ Der best-korrigierte Visus zwei Jahre nach PK bei Augen mit FED wird im Mittel mit 0,2 logMAR (Dezimalvisus ~ 0,6) angegeben.^{56, 57} Der wesentliche Vorteil der PK besteht darin, dass Narben und Pathologien aller Hornhautschichten behandelt werden können.

1.3.2 Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty (DSEK)

Die DSEK ist ein lamelläres Transplantationsverfahren der Hornhaut.⁵⁸ Bei der DSEK wird unter dem Mikroskop zunächst die erkrankte Endothel-Descemet-Membran des Empfängers mit Trypanblau angefärbt und entlang einer zuvor auf dem Hornhautepithel gesetzten kreisrunden Markierung von innen entfernt. Das Spender-Hornhautgewebe wird nicht vollständig trepaniert, nur die inneren Schichten bestehend aus Endothel-Descemet-Membran und den hinteren Stromaanteilen werden als eine kreisrunde, dünne Scheibe, dem sogenannten ‚Lenticle‘, präoperativ von der Spenderhornhaut präpariert. Hierbei kann die Präparation des hinteren Stromas auch Laser-assistiert erfolgen.^{59, 60} Dieser ‚Lenticle‘ wird mit einer Kanüle in die Vorderkammer des Auges eingegeben und dann mittels einer Luftblase von innen an das freigelegte Hornhautstroma (Stroma-zu-Stroma) fixiert. Die Luftblase

verbleibt in der Vorderkammer und der Patient muss die ersten postoperativen Tage in Rückenlagerung verbleiben um die Anhaftung des Spender-Lenticles an das Empfängerstroma zu unterstützen. Die postoperative Visusbesserung erfolgt relativ schnell, sodass der best-korrigierte Visus nach 6 Monaten im Mittel 0,29 logMAR (Dezimalvisus \sim 0,5) erreicht.⁶¹ Die refraktive Änderung der Hornhaut ist deutlich geringer als bei der perforierenden Keratoplastik.⁶²

1.3.3 Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK)

Die DMEK ist ein lamelläres Transplantationsverfahren der Hornhaut, bei der selektiv nur die Descemet-Membran mit dem Endothel ersetzt wird.⁶³ Bei der DMEK wird unter dem Mikroskop zunächst die Descemet-Membran des Empfängers mit dem erkrankten Endothel durch Trypanblau angefärbt und entlang einer zuvor auf dem Hornhautepithel gesetzten kreisrunden Markierung von innen entfernt. Vom Spender-Hornhautgewebe wird gezielt die Endothel-Descemet-Membran mittels Pinzetten unter dem Mikroskop abpräpariert und anschließend trepaniert, um einen kreisrunden ‚Flap‘ (Transplantat) zu erhalten. Dieser dünne ‚Flap‘ rollt sich durch die endothel-seitigen Elastine mit dem Endothel nach innen zu einer Rolle ein.⁶⁴ Die Rolle des ‚Flaps‘ wird mit einer Kanüle in die Vorderkammer des Auges eingegeben und dann mit einer Luftblase von innen an das freigelegte Hornhautstroma (Stroma-zu-Descemet-Membran) fixiert. Die Luftblase verbleibt postoperativ in der Vorderkammer und der Patient muss die ersten Tage nach der Operation in Rückenlagerung verbringen um die Anhaftung der Spenderhornhaut an das Empfängerstroma zu unterstützen. Die postoperative Aufklärung der ödematösen Hornhaut erfolgt relativ schnell, sodass der best-korrigierte Visus nach 6 Monaten im Mittel bereits bei 0,16 logMAR (Dezimalvisus \sim 0,7) liegt.⁶¹ Die refraktive Änderung der Hornhaut ist gering.^{65, 66}

1.4 Bedeutung von Vitalfarbstoffen

Die Verwendung von Vitalfarbstoffen ist in der Augenheilkunde ein fester Bestandteil bei der Durchführung von intraokulären Eingriffen. In diesem Zusammenhang werden Vitalfarbstoffe für die intraoperative Kontrastierung von filigranen und meist transparenten Grenzmembranen verwendet. Diese werden für den Operateur besser visualisiert und können damit sicherer und vollständig entfernt werden. Insbesondere bei der Eröffnung der vorderen Linsenkapsel (Kapsulorhexis)^{67, 68} während einer Katarakt-Operation, bei der Entfernung der Descemet-Membran vom anliegenden Hornhautstroma (Descemetorhexis)⁵⁰ während einer hinteren lamellären Keratoplastik, sowie dem Entfernen der inneren Grenzmembran (ILM) oder epiretinaler Membranen von der Netzhaut (ILM-Peeling bzw. Membrane-Peeling)⁶⁹⁻⁷³ während einer Glaskörper-Operation werden Vitalfarbstoffe regelmäßig genutzt. In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl möglicher Farbstoffkandidaten für die intraokuläre Chirurgie publiziert und evaluiert.⁷⁴⁻⁷⁹ Aufgrund der Gewebespezifischen Kontrastierungseigenschaften und der – im Vergleich zu anderen Vitalfarbstoffen – geringeren in-vivo und in-vitro beobachteten Toxizität ist Trypanblau der heute am häufigsten verwendete Vitalfarbstoff.^{78, 79} In absteigender Häufigkeit folgen Brilliantblau G⁷⁴ und Indocyaningrün.⁷⁵ Vitalfarbstoffe, welche deutlich seltener zum Einsatz kommen sind u.a. Methylenblau, Patentblau,⁷⁶ Infracyaningrün und Toluidinblau.⁷⁷⁻⁷⁹

1.4.1 Trypanblau

Trypanblau ist ein wasserlöslicher, anionischer Diazofarbstoff, welcher initial von Paul Ehrlich 1904 zur Behandlung der Schlafkrankheit (Afrikanische Trypanosomiasis) vorgestellt wurde.⁸⁰ In die Augenheilkunde wurde Trypanblau erst 1967 zur Visualisierung und Diagnostik von Hornhaut- und Bindehauterosionen eingeführt. Seither hat sich das Anwendungsspektrum von Trypanblau deutlich erweitert und ist damit aktuell der meist verbreitetste Vitalfarbstoff in der Augenheilkunde. Trypanblau ein wesentliches Adjuvans

während Operationen des vorderen und hinteren Augenabschnitts und kommt bei der Eröffnung der Linsenkapsel (Kapsulorhexis),⁶⁸ dem Entfernung der Endothel-Descemet-Membran (Descemetorhexis)^{50, 81} und dem Abziehen von vitreoretinalen Membranen (Membran-Peeling bzw. ILM-Peeling)^{70, 82} zur Anwendung. Aufgrund des breiten Anwendungsspektrums von Trypanblau wurde die Toxizität in verschiedenen in-vitro, in-vivo und ex-vivo Studien untersucht. Bislang gibt es allerdings noch keinen klaren Konsens über die Einstufung der Toxizität.^{79, 83-85}

2 Ziele der Arbeit

Die Ziele der in dieser Habilitationsschrift vorgelegten wissenschaftlichen Arbeiten umfassen:

1. Vergleichende Analyse klinischer Daten und histomorphologischer Befunde von Patientenaugen mit Fuchs Endotheldystrophie und bullöser Keratopathie nach primärer DMEK.
2. Analyse von Prädiktionsfaktoren für den postoperativen Visus (BCVA), die zentrale Hornhautdicke (CCT) und die Endothelzelldicke (ECD) nach primärer DMEK an Patientenaugen mit Fuchs Endotheldystrophie.
3. Untersuchung der klinischen Daten und histopathologischen Befunde nach DMEK an Patientenaugen mit Transplantatversagen nach vorausgegangener DSEK.
4. Untersuchung der klinischen Daten und histopathologischen Befunde im Hinblick auf klinisch-pathologische Mechanismen der Transplantat-Ablösung nach DMEK.
5. Quantitative Analyse photodynamischer Eigenschaften der Vitalfarbstoffe Trypanblau, Brillianblau G und Indocyaningrün unter standardisierten in-vitro Experimenten.
6. Quantitative und qualitative Untersuchungen der photochemischen Eigenschaften von Trypanblau in standardisierten in-vitro Experimenten zur Analyse involvierter Abbaumechanismen.

3 Eigene Arbeiten

3.1 Publikation 1: Primäre Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty bei Fuchs Endotheldystrophie und bullöser Keratopathie: Histopathologie und klinische Ergebnisse

[86] Brockmann T, Brockmann C, Maier AB, Schroeter J, Bertelmann E, Torun N. 2018. Primary descemet's membrane endothelial keratoplasty for fuchs endothelial dystrophy versus bullous keratopathy: Histopathology and clinical results. *Curr Eye Res.* 43(10):1221-1227.

Link zu Publikation 1: <https://doi.org/10.1080/02713683.2018.1490773>

In dieser prospektiven Beobachtungsstudie⁸⁶ wurde der klinische Verlauf und das postoperative Ergebnis nach primärer DMEK bei FED und BK untersucht. Weiteren wurden die klinischen Daten den histomorphologischen Befunden pathologisch veränderter und intraoperativ entfernter Endothel-Descemet-Membranen (EDM) gegenübergestellt. Hierzu wurden 119 konsekutive Patientenaugen mit FED oder BK, die zwischen März 2012 und März 2013 eine DMEK als cornealen Ersteingriff erhielten, eingeschlossen. Bei 101 Augen lag als zugrundeliegende Erkrankung eine FED und bei 18 Augen eine BK vor. Im postoperativen Verlauf wurden der best-korrigierte Visus, die zentrale Hornhautdicke, die Endothelzelldicke und die Häufigkeit einer Transplantat-Ablösung analysiert. Nach 12 Monaten zeigte sich im Gesamtkollektiv eine mittlere Sehschärfe von 0,14 logMAR (Dezimalvisus ~ 0,7) und in Augen ohne Visus-beeinträchtigende okuläre Komorbiditäten eine mittlere Sehschärfe von 0,10 logMAR (Dezimalvisus = 0,8). Dementsprechend betrug der Visus von Patientenaugen ohne Visus-beeinträchtigende Nebenerkrankungen bei FED 0,10 logMAR (Dezimalvisus = 0,8) und bei BK 0,15 logMAR (Dezimalvisus = 0,7). Hierbei zeigte sich zwischen den zwei verschiedenen Indikationen (FED vs. BK) kein signifikanter Unterschied. Ebenfalls zeigten sich zwischen der FED und der BK keine Unterschiede hinsichtlich der mittleren zentralen Hornhautdicke (520 vs. 539 μm ; $p = 0,181$) und der

mittleren Endothelzellendichte (1.743 vs. 1.457 Zellen/mm²; p = 0,112). Die Transplantat-Ablöserate betrug insgesamt 40% (48/119), beziehungsweise 41% bei FED und 39% bei BK (p = 0,554). Berücksichtigt man nur pseudophake Augen, betrug die Transplantat-Ablöserate 43% bei FED und 35% bei BK. Unterschiede der Transplantat-Ablösungen zeigten sich insbesondere in der Rate des wiederholten Auftretens von Ablösungen, diese zeigte sich vermehrt bei der FED (p = 0,024). In Hinblick auf die histomorphologischen Befunde der EDM-Komplexe könnte dies im Zusammenhang mit einem deutlich sichtbaren Verlust an Matrixproteinen (z.B. Fibronectin) bei der FED, im Gegensatz zur BK, stehen. Diese Matrixproteine sind innerhalb der Descemet-Membran für die Verbindung des Anterior-Banded Layer (ABL) zum Posterior Non-Banded Layer (PNBL) notwendig. Ist diese Verbindung aufgelöst, kommt es zu einer Spaltung innerhalb der Descemet-Membran (zwischen ABL und PNBL), wodurch es während der DMEK zu einer inkompletten Membranentfernung kommen kann, was wiederum eine Transplantat-Ablösung begünstigt.

Unsere Daten konnten zeigen, dass die primäre DMEK bei FED und BK vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des Visus, der zentralen Hornhautdicke und der Endothelzellendichte erzielen kann. Der postoperative Verlauf kann jedoch zwischen den zwei Operationsindikationen hinsichtlich der wiederholten Transplantat-Ablösung variieren, was in der unterschiedlichen mikrostrukturellen Beschaffenheiten der Descemet-Membranen begründet sein kann.

Auf den Ergebnissen zur FED von Publikation 1 baut das Studiendesign von der darauf folgenden Publikation 2 auf. Hierin werden klinische und morphologische Parameter auf ihre Vorhersagekraft postoperativer Ergebnisse nach DMEK analysiert.

3.2 Publikation 2: Prädiktoren klinischer Ergebnisse nach primärer Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty bei Fuchs Endotheldystrophie

[87] Brockmann T, Pilger D, Brockmann C, Maier AB, Bertelmann E, Torun N. 2018. Predictive factors for clinical outcomes after primary descemet's membrane endothelial keratoplasty for fuchs' endothelial dystrophy. *Curr Eye Res.* [Epub ahead of print]

Link zu Publikation 2: <https://doi.org/10.1080/02713683.2018.1538459>

In dieser prospektiven Beobachtungsstudie⁸⁷ wurden prädiktive Faktoren für den best-korrigierten Visus, die zentrale Hornhautdicke und die Endothelzell-dichte nach primärer DMEK untersucht. Hierzu wurden präoperative klinische Parameter, histomorphologische Befunde erkrankter und intraoperativ entfernter Endothel-Descemet-Membranen (EDM), sowie klinische Verlaufsdaten des zuerst operierten Auges von insgesamt 108 Patientenaugen mit Fuchs Endotheldystrophie analysiert. Als Endpunkte wurden der best-korrigierte Visus, die zentrale Hornhautdicke und die Endothelzell-dichte 12 Monate nach DMEK definiert. Dementsprechend lag 12 Monate postoperativ der mittlere Visus bei 0,11 logMAR (Dezimalvisus \sim 0,8), die Hornhautdicke bei 529 μm und die Endothelzell-dichte bei 1.675 Zellen/ mm^2 . Als bedeutsamen Prädiktor für den postoperativen Visus und die zentrale Hornhautdicke wurde die präoperative Hornhautdicke identifiziert ($r = 0,299$; $p = 0,014$ und $r = 0,507$; $p < 0,001$). Insbesondere Augen mit einer präoperativen zentralen Hornhautdicke unter 625 μm zeigten 12 Monate postoperativ einen signifikant besseren mittleren Visus bei 0,05 logMAR (Dezimalvisus = 0,9), als Augen mit einer präoperativen zentralen Hornhautdicke größer gleich 625 μm , bei denen der mittlere Visus 0,13 logMAR (Dezimalvisus \sim 0,7) betrug ($p = 0,002$). Wird in diesem Zusammenhang außerdem noch die Visusentwicklung des zuerst operierten Auges als prognostischer Parameter herangezogen ist es möglich Patientenaugen zu identifizieren, die postoperativ eine frühe Visuserholung erreichen. Hatte das erste Auge bereits 6 Monate nach DMEK einen Visus

von 0,1 logMAR oder besser (Dezimalvisus $\geq 0,8$), so zeigte auch das Partnerauge eine frühe Visusbesserung. Zur Identifikation von Augen mit einer persistierenden Hornhautschwellung zeigte sich die präoperative Hornhautdicke $\geq 625 \mu\text{m}$ als sensitiver Parameter. Hinsichtlich der histomorphologischen Befunde an den entfernten EDM-Komplexen wurde eine Korrelation zwischen der Dicke des Anterior Banded Layer (ABL) und der präoperativen Hornhautdicke beobachtet ($r = 0,601$; $p = 0,023$). In diesem Zusammenhang zeigte sich auch ein positiver Zusammenhang zwischen ABL-Dicke und der Häufigkeit von Transplantat-Ablösungen ($r = 0,652$; $p = 0,041$). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine grenzwertige Ausgangs-Endothelzelldichte des Transplantats von ≤ 2.100 Zellen/ mm^2 häufiger mit einem maßgeblichen Endothelzellverlust auf unter 1.000 Zellen/ mm^2 assoziiert war (1,8% vs. 15,8%; $p = 0,020$).

Unsere Ergebnisse konnten damit einfach verfügbare klinische Parameter wie die präoperative zentrale Hornhautdicke, der postoperative Visusverlauf des ersten Auges und die Ausgangs-Endothelzelldichte des Transplantats identifizieren, welche als effektive Vorhersageparameter für den klinischen Verlauf nach primärer DMEK bei Fuchs Endotheldystrophie genutzt werden können.

Im Kontext der Ergebnisse aus Publikation 2 liegt eine besonders große präoperative zentrale Hornhautdicke, sowie eine spezielle Ausgangssituation in Auge mit endothelialer Transplantatdekomensation vor. Daher wurden in der darauf folgenden Publikation 3 die klinischen Ergebnisse nach DMEK, und die histomorphologischen Befunde dekomensierter Hornhaut-Transplantate untersucht.

3.3 Publikation 3: Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty bei Transplantatversagen nach Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty: Klinische Ergebnisse und histopathologische Befunde

[88] Brockmann T, Brockmann C, Maier AK, Gundlach E, Schroeter J, Bertelmann E, Jousseaume AM, Torun N. 2015. Descemet membrane endothelial keratoplasty for graft failure after descemet stripping endothelial keratoplasty: Clinical results and histopathologic findings. *JAMA Ophthalmol.* 133(7):813-819.

Link zu Publikation 3: <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.0906>

Das Transplantatversagen nach Keratoplastik hat eine allgemeine Bedeutung im postoperativen Verlauf. Während die immunologische Transplantat-Abstoßung als Ursache des Transplantatversagens mit der Einführung der hinteren lamellären Keratoplastik im Vergleich zur perforierenden Keratoplastik signifikant reduziert werden konnte,^{57, 89} ist das Transplantatversagen aufgrund einer Endotheldekompensation nach wie vor ein manifestes Problem. In diesen Fällen ist meist eine erneute hintere lamelläre Keratoplastik oder sogar eine penetrierende Keratoplastik notwendig.

In dieser prospektiven Beobachtungsstudie⁸⁸ wurden die funktionellen und anatomischen Ergebnisse nach sekundärer DMEK bei endotheliale Transplantatversagen mit den Ergebnissen nach primärer DMEK bei Fuchs Endotheldystrophie verglichen. Hierbei erfolgte zusätzlich eine immunhistochemische Aufarbeitung der intraoperativ entfernten DSEK-Lamellen (Lenticle) zur Beurteilung der Stroma-zu-Stroma Grenzfläche. Von 210 konsekutiv durchgeführten DMEK Operationen zwischen März 2012 und Februar 2013 erfolgte diese in acht Fällen als sekundäre DMEK aufgrund eines endothelialen Transplantatversagens nach DSEK. Die Ergebnisse dieser Studiengruppe wurden 12 Monate postoperativ verfolgt und zu 30 Augen mit Fuchs Endotheldystrophie eines Referenzkollektivs sowie einer matched-pairs Gruppe nach primärer DMEK hinsichtlich des best-korrigierter

Visus und der zentralen Hornhautdicke verglichen. Im postoperativen Verlauf konnte nach 12 Monaten in der Studiengruppe mit Transplantatversagen nach DSEK im Mittel eine Visusbesserung von initial 1,13 logMAR (Dezimalvisus ~ 0,08) bei einer zentrale Hornhautdicke von 704 μm auf 0,38 logMAR (Dezimalvisus ~ 0,4) bei einer zentralen Hornhautdicke von 524 μm erreicht werden. Im Vergleich dazu lag der Visus, 12 Monate nach primärer DMEK, in der matched-pairs Gruppe sowie im Referenzkollektiv bei 0,15 logMAR (Dezimalvisus = 0,7) bei einer zentralen Hornhautdicke von 516 μm und zeigte damit signifikant bessere Visusergebnisse als die Studiengruppe der sekundären DMEK nach DSEK ($p = 0,018$) bei vergleichbarer zentraler Hornhautdicke ($p = 0,57$). Die immunhistochemische Aufarbeitung der dekompensierten DSEK-Lamellen offenbarte die Akkumulation von Matrixproteinen und fibrotischem Stützgewebe (u.a. Fibronectin und Zytokeratin) entlang der Stroma-zu-Stroma Grenzfläche.

Unsere Daten konnten gute Ergebnisse für die sekundäre DMEK bei Transplantatversagen nach DSEK aufzeigen, womit die DMEK als Therapie der Wahl für o.g. Fälle angesehen werden kann. Die Visusergebnisse nach sekundärer DMEK bei Transplantatversagen waren jedoch den Ergebnissen nach primären DMEK unterlegen. Als Ursache kann hierfür die vermehrte corneale Fibrose innerhalb der Strom-zu-Stroma Grenzfläche angesehen werden. Schlussfolgernd sollte bei einer Transplantatdekompensation relativ frühzeitig eine sekundäre DMEK erfolgen um dem fibrotischen Umbau entgegenzuwirken.

Eine intakte Stroma-zu-Transplantat Grenzfläche ist bei der DMEK nicht nur für die optimalen optischen Eigenschaften, wie in Publikation 3 gezeigt, notwendig; sondern auch für die dauerhafte Adhärenz der transplantierten Descemet-Membran am Empfängerstroma. Vor diesem Hintergrund wurden in der darauf folgenden Publikation 4 Mechanismen der Transplantat-Ablösung nach DMEK analysiert.

3.4 Publikation 4: Klinisch-pathologische Mechanismen der Transplantat-Ablösung nach Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty

[90] Brockmann T, Brockmann C, Maier AK, Schroeter J, Pleyer U, Bertelmann E, Jousen AM, Torun N. 2014. Clinicopathology of graft detachment after descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Acta Ophthalmol.* 92(7):e556-561.

Link zu Publikation 4: <https://doi.org/10.1111/aos.12419>

Die Transplantat-Ablösung ist der häufigste Grund für eine erneute Intervention nach DMEK. Meist wird dabei zur Re-Adaptation der transplantierten Descemet-Membran erneut Luft in die Vorderkammer eingegeben.

Aus diesem Anlass wurden in einer prospektiven Beobachtungsstudie⁹⁰ die zugrundeliegenden Pathomechanismen der Transplantaablösung nach primärer DMEK bei Fuchs Endotheldystrophie untersucht. Hierbei wurden die intraoperativ entfernten und pathologisch veränderten Endothel-Descemet-Membranen (EDM) von 30 Patientenaugen histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet. Entsprechend des postoperativen Verlaufs wurden die Augen nach dem Transplantat-Status gruppiert und diesbezüglich die erhobenen klinischen und morphologischen Parameter zwischen den Gruppen (mit vs. ohne Transplantat-Ablösung) verglichen. Im Gesamtkollektiv zeigte sich eine postoperative Ablöserate von 40% (12/30). Zwischen den Untersuchungsgruppen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich des postoperativ erreichten best-korrigierten Visus, jedoch war die Visuserholung in der Gruppe mit Transplantat-Ablösung etwas verzögert. Es zeigte sich kein Einfluss des Geschlechts, des Alters, der präoperativen zentralen Hornhautdicke und des präoperativen Visus auf die Rate der Transplantat-Ablösungen. Hingegen zeigten sich in Augen mit Transplantat-Ablösung häufiger ein unvollständiges Lösen des Anterior Banded Layers (ABL) sowie Risse des ABL innerhalb der Descemet-Membran. Desweiteren zeigte sich der ABL in diesen Augen verdickt: die mittlere Dicke des ABL in Augen mit Transplantat-Ablösung betrug 3,5 μm , im Vergleich zu 2,5 μm in

Augen ohne Transplantat-Ablösung ($p = 0,035$). Insgesamt stellten sich die EDM von Augen mit Transplantat-Ablösung aufgelockert dar und zeigten in immunhistologischen Färbungen, insbesondere zwischen dem ABL und dem Posterior Non-Banded Layer (PNBL), einen Verlust der Matrixproteine Fibronectin und Zytokeratin.

Zusammenfassend konnten unsere Ergebnisse aufzeigen, dass eine unvollständige Entfernung der EDM, mit Verbleib von ABL-Fragmenten am Empfängerstroma ein Risiko für eine Transplantat-Ablösung nach DMEK darstellt. Hierbei kann als Ursache für die Aufspaltung und Zerreißung des ABL der Verlust von stabilisierenden Matrixproteinen innerhalb der Descemet-Membran angesehen werden.

In Publikation 4 konnte zwar gezeigt werden, dass der postoperativ erreichte Visus nicht durch eine Transplantat-Ablösung beeinträchtigt wird; allerdings konnten Baydoun et al. zeigen, dass das Transplantatendothel durch eine Ablösung dauerhaft in Mitleidenschaft gezogen wird.⁹¹

Unabhängig davon wird nach der DMEK insbesondere in der ersten postoperativen Woche ein starker Endothelzellverlust beobachtet.⁹² Hierbei können die Ursachen im Operationstrauma und einer Zytotoxizität des verwendeten Trypanblaus gesehen werden. In diesem Zusammenhang erfolgten Untersuchungen zur Beurteilung der Toxizität von Trypanblau in den folgenden Publikationen 5 und 6.

3.5 Publikation 5: Photodynamik von Vitalfarbstoffen

[93] Brockmann T, Steger C, Dawczynski J. 2012. Photodynamic properties of vital dyes for vitreoretinal surgery. *Ophthalmologica*. 228(4):234-238.

Link zu Publikation 5: <https://doi.org/10.1159/000341605>

Vitalfarbstoffe werden in der Augenchirurgie zur Anfärbung von sehr dünnen und feinen Membranen sowie transparenten Geweben verwendet. Für diesen Zweck werden im Rahmen der DMEK die Descemet Membranen des Spenders und des Empfängers vor der Entfernung mit Trypanblau angefärbt.⁶⁸ Neben Trypanblau kommen in der Augenheilkunde auch die Vitalfarbstoffe Indocyaningrün und Brillianblau G zur Anwendung; letztere jedoch aktuell hauptsächlich bei Operationen im hinteren Augenabschnitt.⁹⁴ Innerhalb der Augenheilkunde wird die Anwendungssicherheit dieser Adjuvantien divers diskutiert; unter anderem ist hierbei auch die Phototoxizität der verschiedenen Farbstoffe von wesentlicher Relevanz.⁹⁵

In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit⁹³ mittels in-vitro Experimente die photodynamischen Eigenschaften von Trypanblau, Indocyaningrün, und Brillianblau G während einer Simulation intraoperativer Beleuchtungsbedingungen quantitativ untersucht. Die Bestrahlung der unterschiedlichen Vitalfarbstoffe erfolgte mit kurzwelligem Licht einer Wellenlänge von 366 nm und einer effektiven Energie von $12,6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Nach der Bestrahlung zwischen 0 und 48 Stunden wurden die Farbstofflösungen mittels UV/Vis Spektroskopie in dem Wellenlängenbereich 220 – 750 nm vermessen und die Daten analysiert. Hierbei zeigte sich eine exponentielle Photolyse von Indocyaningrün, während Brilliantblau G und Trypanblau unter den gegebenen Bedingungen eine stabile Konzentration aufwiesen.

Für Indocyaningrün zeigte sich alle 20 Minuten eine Konzentrationsreduktion um 5%. Bezogen auf übliche Operationszeiten und unter Berücksichtigung der bekannten Zerfallsprodukte⁹⁵ konnten unsere Ergebnisse damit eine klinisch relevante Stoffmenge neu-induzierter toxischer Metabolite aufzeigen.

Die Ergebnisse aus Publikation 5 konnten hierbei jedoch keine Hinweise auf eine Degradierung des Typanblaus, als Ursache für die bekannten mutagenen und teratogenen Eigenschaften dieses Vitalfarbstoffs liefern.^{96, 97} Aus diesem Anlass wurden in der folgenden Publikation 6 weitergehende photochemische Untersuchungen an Trypanblau durchgeführt.

3.6 Publikation 6: Photochemische Degradierung von Trypanblau

[98] Brockmann T, Blanchard V, Heretsch P, Brockmann C, Bertelmann E. 2018. Photochemical degradation of trypan blue. PLOS ONE. 13(4).

Link zu Publikation 6: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195849>

Trypanblau ist als adjuvanter Vitalfarbstoff zur Verbesserung der intraoperativen Handhabung bei Operationen im vorderen Augenabschnitt von vorrangiger Bedeutung. Für diesen Zweck wird Trypanblau während der DMEK sowohl an der Empfänger- als auch an der Spender-Endothel-Descemet-Membran angewendet.⁵³ Hierbei ist die Beurteilung der Biokompatibilität von Trypanblau von besonderer Bedeutung, da das humane Hornhautendothel nicht regenerativ ist und somit durch eine mögliche Toxizität des Vitalfarbstoffs in Mitleidenschaft gezogen werden kann. Bisherige in-vitro, in-vivo und ex-vivo Studien haben für Trypanblau zwei wesentliche Erkenntnisse für den intraokulären Einsatz erbracht: Zum einen unterscheidet sich das Toxizitätsprofil bei der Verwendung im vorderen und hinteren Augenabschnitt;^{75, 99, 100} zum anderen wurde eine lichtabhängige Toxizität beobachtet.¹⁰¹ Dies ließ die Annahme aufkommen, dass hierbei eine Wechselwirkung mit Lutein/Zeaxanthin besteht, welches hauptsächlich im hinteren Augenabschnitt vorkommt.

In dieser Arbeit⁹⁸ erfolgten in-vitro Experimente zur eingehenden qualitativen und quantitativen Beurteilung der photochemischen Eigenschaften von Trypanblau. Zudem wurde die Wechselwirkung zwischen Trypanblau und Lutein/Zeaxanthin untersucht. Dafür wurden Farbstofflösungen von Trypanblau, sowie Lösungsmischungen aus Trypanblau und Lutein/Zeaxanthin mit Blaulicht bestrahlt und anschließend mittels Lichtmikroskopie, UV/Vis Spektroskopie, Massenspektrometrie (MALDI-TOF) und Kernspinresonanz-Spektrometrie vermessen und analysiert. Die Abbaukinetik wurde auf Grundlage der Absorbanzänderungen bestimmt, während Zwischen- und Abbauprodukte mittels der Differenzen aus den Fragmentionen Peaks identifiziert und durch die Zuordnung entsprechender Kernspin-

resonanz Peaks bestätigt wurden. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass es zu einem Lutein/Zeaxanthin-getriggerten photochemischen Abbau von Trypanblau kommt. Hierbei unterschieden sich die Abbauewege des Trypanblaus in Abhängigkeit der Anwesenheit von Lutein/Zeaxanthin von denen der selbstinduzierten Degradierung. Während die selbstinduzierte Photodegradierung des Trypanblau unter der Bildung von Dimethylsulfat und der angenommenen Bildung von Phenol erfolgte, zeigten sich beim Abbau von Trypanblau in Wechselwirkung mit Lutein/Zeaxanthin Hinweise auf die Bildung von Methylhydroxylamin und Sulfonylarin.

Unsere Daten liefern Belege für den photochemischen Abbau von Trypanblau, der durch Lutein/Zeaxanthin getriggert werden kann, und hierbei zytotoxische Abbauprodukte erzeugt. Damit tragen unsere Ergebnisse zum eingehenden Verständnis der Abbaumechanismen des Trypanblaus bei und können somit frühere klinische und experimentelle Beobachtungen zellulärer Toxizität nach Anwendung von Trypanblau besser erklären.

4 Diskussion

Endotheliale Keratopathien können mittels der „Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty“ (DMEK) sicher und effektiv behandelt werden.¹⁰² Verglichen mit dem traditionellen Verfahren – der perforierenden Keratoplastik – bestehen die wesentlichen Vorteile der DMEK in einer früheren Visusbesserung, dem Ausbleiben größerer Refraktionsänderungen und einem geringeren Risiko für immunologische Abstoßungsreaktionen.^{57, 89, 103}

Der langfristige Operationserfolg wird jedoch maßgeblich vom Erhalt der Hornhauttransparenz bestimmt. In diesem Zusammenhang sind die Adhärenz der transplantierten Endothel-Descemet-Membran am Empfängerstroma,⁹¹ der Erhalt der Endothelzellen und das Ausbleiben fibrotischer Umbauprozesse von entscheidender Bedeutung.^{88, 104-106} In den zugrundeliegenden Arbeiten dieser Habilitationsschrift wurden in einem klinisch-experimentellen Ansatz die Ergebnisse nach DMEK unter Verwendung von Trypanblau untersucht. Hierfür wurden klinische Daten, histopathologische Befunde und stoffspezifische Eigenschaften des Trypanblaus analysiert. Die herangezogenen Arbeiten werden im Folgenden eingehend dargestellt und diskutiert:

4.1 Klinische Ergebnisse nach DMEK

Die klinischen Daten, insbesondere der best-korrigierte Visus (BCVA), die zentrale Hornhautdicke (CCT), die Endothelzelldichte (ECD), sowie das Auftreten von Transplantat-Ablösungen, sind entscheidende Parameter zur Beurteilung des Erfolges einer DMEK.

Seit ihrer Erstbeschreibung⁵³ durch Gerrit Melles im Jahr 2006 wird die DMEK zur Behandlung verschiedenster endothelialer Keratopathien angewandt. Die wichtigsten Indikationen stellen dabei die Fuchs Endotheldystrophie (FED), die bullöse Keratopathie (BK) und die Endotheldekompensation nach vorausgegangener Keratoplastik dar.¹⁰⁷ In den vorliegenden Arbeiten (Publikation 1 und 3)^{86, 88} wurden die klinischen Ergebnisse dieser Indikationen untersucht.

Klinische Ergebnisse nach primärer DMEK in Augen mit FED und BK wurden in Originalarbeit 1 an einem Kollektiv von 119 Augen miteinander verglichen.⁸⁶ Nach 12 Monaten betrug der mittlere BCVA im Gesamtkollektiv 0,14 logMAR (Dezimalvisus \sim 0,7); und 0,10 logMAR (Dezimalvisus = 0,8) in Augen ohne Visus-limitierende Komorbiditäten. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des BCVA, der CCT und der ECD zwischen den beiden Indikationen, 12 Monaten nach DMEK (entsprechend, $p = 0,186$; $p = 0,181$ und $p = 0,112$). Der Visusanstieg in Augen mit Fuchs' Endotheldystrophie erfolgte allerdings etwas früher, hier zeigten sich 1 Monat postoperativ signifikante Unterschiede ($p = 0,046$), die sich in weiteren postoperativen Verlauf nivellierten. Daten zum direkten Vergleich klinischer Ergebnisse nach DMEK bei FED vs. BK sind aktuell limitiert. Unsere Ergebnisse fügen sich jedoch in die bestehender Literatur ein.^{47, 107} In der Arbeit von Javadi et al., zu Ergebnissen nach DSEK, wurde ein Unterschied des Visusanstiegs bis zu 6 Monate postoperativ beobachtet.¹⁰⁸

Der Anteil von Augen mit Transplantat-Ablösung und der Notwendigkeit eines Folgeeingriffs, bei dem Luft in die Vorderkammer eingegeben wird ('rebubbling'),¹⁰⁹ unterschied sich zwischen den beiden Indikationen in unserem Kollektiv nicht (FED = 40,6% vs. 38,9%; $p = 0,554$); jedoch zeigte sich in der Gruppe mit FED signifikant häufiger die Notwendigkeit eines wiederholten 'rebubbings' bei erneuten Transplantat-Ablösungen ($p = 0,024$). Hierauf wird in 4.2 weiter eingegangen.

Klinische Ergebnisse nach DMEK in Augen mit FED und Transplantatversagen nach lamelläre Keratoplastik (DSEK) wurden in Publikation 3 an einem Kollektiv von 38 Augen miteinander verglichen.⁸⁸ Der BCVA erreichte 12 Monate nach primärer DMEK bei FED mit 0,15 logMAR (Dezimalvisus = 0,7) einen besseren Visus verglichen zu 0,38 logMAR (Dezimalvisus \sim 0,4) nach sekundärer DMEK bei Transplantatversagen; hierbei war der Unterschied des BCVA 1, 3, 6 und 12 Monate postoperativ signifikant (entsprechend, $p = 0,016$; $p = 0,017$; $p = 0,014$ und $p = 0,018$). Im Gegensatz dazu zeigten sich

keine Unterschiede hinsichtlich der CCT zwischen den zugrundeliegenden Pathologien.

Unsere Ergebnisse konnten in vergleichbarer Art in der späteren Veröffentlichung von Sorkin et al. bestätigt werden.¹¹⁰ Ebenfalls berichteten Baydoun et al. in ihrer Arbeit über sekundäre DMEK bei Transplantatversagen nach DMEK von einem reduzierten BCVA im Vergleich zur primären DMEK.¹¹¹ Weller et al. fanden in ihrer Studie über sekundäre DMEK bei Transplantatversagen nach DSEK in einem Nachkontrollzeitraum von 3 Monaten hingegen keine Unterschiede hinsichtlich des BCVA und der CCT.¹¹²

Einflussfaktoren auf die klinischen Ergebnisse nach primärer DMEK wurden in Publikation 2 untersucht.⁸⁷ Es erfolgte eine Analyse prädiktiver Faktoren in einem Kollektiv von 108 Augen mit Fuchs Endotheldystrophie. Hierbei wurden als klinische Endpunkte der BCVA, die CCT und die ECD, 12 Monate nach DMEK angenommen. Dementsprechend betrug der BCVA 0,11 logMAR (Dezimalvisus ~ 0,8), die CCT 529 μm und die ECD 1.675 Zellen/ mm^2 , 12 Monate nach primärer DMEK bei FED. Als bedeutsamen Prädiktor für den postoperativen Visus und die zentrale Hornhautdicke wurde die präoperative Hornhautdicke identifiziert (entsprechend, $r = 0,299$; $p = 0,014$ und $r = 0,507$; $p < 0,001$). Augen mit einer präoperativen CCT $> 625 \mu\text{m}$ wiesen auch 12 Monate postoperativ mit 537 μm eine signifikant größere CCT auf, als Augen mit einer präoperativen CCT $< 625 \mu\text{m}$ (499 μm , $p < 0,001$). Außerdem zeigten Augen mit einer präoperativen zentralen Hornhautdicke $< 625 \mu\text{m}$ einen signifikant besseren BCVA mit 0,05 logMAR (Dezimalvisus = 0,9) als Augen mit einer präoperativen zentralen Hornhautdicke $\geq 625 \mu\text{m}$ mit 0,13 logMAR (Dezimalvisus ~ 0,7) ($p = 0,002$). Ergänzend dazu zeigte sich als prognostischer Parameter für die Visuserwartung der erreichte BCVA 6 Monate nach DMEK an dem zuerst operierten Auge. In diesem Zusammenhang zeigten Patienten an dem zweiten operierten Auge nach DMEK eine signifikant frühere Visusbesserung, wenn das zuerst operierte Auge 6 Monate nach DMEK einen BCVA von 0,1 logMAR oder besser (Dezimalvisus $> 0,8$) erreichte. Hinsichtlich der zu erwartenden Endothelzelldicke zeigte sich die

Ausgangs-Endothelzellichte des Transplantats als wesentlicher Vorhersageparameter. Transplantate mit einer Ausgangs-Endothelzellichte ≤ 2.100 Zellen/mm² waren 12 Monate nach DMEK signifikant häufiger von einem starken Endothelzellverlust auf < 1.000 Zellen/mm² betroffen ($p = 0,020$). Während sich unsere klinischen Ergebnisse nach DMEK in die bestehende Literatur einfügen,^{47, 107} sind bisherige Daten zu prädiktiven Faktoren nach DMEK sehr begrenzt. Siggel et al. konnten vergleichbare postoperative Visusverläufe zwischen dem ersten und zweiten Auge nach DMEK eines Patienten beobachten.¹¹³ Diesen Zusammenhang konnten wir auch in unseren Daten wiederfinden. Desweiteren beschrieben Schaub et al. die corneale Densitometrie, bei der die Rückstreuung des Lichtes von der Hornhaut während einer Scheimpfluguntersuchung gemessen wird, als prognostisches Mittel für den postoperativen BCVA.¹¹⁴ Während in unserer Studie keine corneale Densitometrie erfolgte, korrelieren diese Messwerte mit cornealen Umbauprozessen¹¹⁵ und könnten damit auch im Zusammenhang mit fibrotischen Veränderungen z.B. aufgrund des persistierenden Hornhautödems, und somit der präoperativen Hornhautdicke gesehen werden.

Die dauerhafte Adhärenz der transplantierten Endothel-Descemet-Membran am Empfängerstroma ist für den Operationserfolg, gemessen an der Regression des Hornhautödems und dem Visusanstieg, von zentraler Bedeutung. Vice versa ist das Erkennen und die Behandlung von Transplantat-Ablösung nach DMEK in der postoperativen Nachsorge von besonderer Relevanz. Die Rate der Transplantat-Ablösungen in Augen mit Fuchs Endotheldystrophie war in den vorliegenden Studien stabil, sie betrug entsprechend: 40,6% (Publikation 1),⁸⁶ 38,0% (Publikation 2)⁸⁷ und 40,0% (Publikation 3 und 4).^{88, 90} In Publikation 4 wurden unterschiedliche Einflussfaktoren auf die Rate der Transplantat-Ablösungen in Augen mit Fuchs' Endotheldystrophie untersucht.⁹⁰ Nach einer Transplantat-Ablösung erfolgte der Visusanstieg etwas langsamer. Hier zeigte sich im ersten postoperativen Monat ein signifikanter Unterschied ($p = 0,015$), welcher sich im weiteren postoperativen Verlauf nivellierte. Sechs Monate nach DMEK zeigte sich

zwischen Augen mit und ohne Transplantat-Ablösung kein Unterschied des BCVA (entsprechend; 0,19 logMAR vs. 0,21 logMAR, $p = 0,611$; Dezimalvisus $\sim 0,6$) und der CCT (entsprechend; 503 μm vs. 512 logMAR, $p = 0,550$). Hinsichtlich der Analyse klinischer Parameter auf ihre prognostische Bedeutung für das Auftreten einer Transplantat-Ablösung zeigte sich kein Einfluss des Geschlechts, des Alters, der präoperativen zentralen Hornhautdicke oder des präoperativen Visus.

Aufgrund der Tatsache, dass die Transplantat-Ablösung nach DMEK die häufigste Komplikation darstellt, wurde dieses Thema auch von anderen Arbeitsgruppen adressiert. Hierbei wurden im Wesentlichen intra- und perioperative Gegebenheiten aus Ursache einer Ablösung identifiziert. Somit zeigte sich eine große Descemetorhexis,¹¹⁶ eine einfache intraoperative Entfaltung mit zentraler Positionierung des Transplantats (möglichst von jüngeren Spendern),¹¹⁷⁻¹¹⁹ sowie ein postoperativer intraokularer Augendruck im physiologischen Bereich^{120, 121} als vorteilhaft für die Senkung des Risikos einer Transplantat-Ablösung. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte DMEK mit Katarakt-Operation die Ablösungsrate erhöht,¹²² während eine Schwefelhexafluorid (SF_6) Gastamponade die Ablösungsrate reduziert.^{123, 124}

4.2 Histopathologie der Endothel-Descemet-Membran

Die pathologisch veränderten Endothel-Descemet-Membranen (EDM) werden während der DMEK von der Empfängerhornhaut entfernt. Anhand dieser EDM können histopathologische Veränderungen analysiert und mit den klinischen Daten korreliert werden. Hierbei ist insbesondere die Beschaffenheit der einzelnen Schichten der Descemet-Membran und des Endothels von Interesse. Desweiteren kann mittels Immunohistochemie auch das Vorhandensein und die Verteilung von Matrixproteinen untersucht werden. Dementsprechend wurden in den vorliegenden Studien (Publikationen 1 bis 4)^{86-88, 90} histologische Befunde der EDM zu den klinischen Ergebnissen, wie unter 4.1 ausgeführt, korreliert.

In Publikation 1 wurden histomorphologische Befunde der EDM bei FED und BK analysiert.⁸⁶ Hierbei zeigte sich an den EDM-Komplexen bei BK eine signifikante Reduktion der Endothelzellichte, während die Schichtdicken der EDM, des ABL und des PNBL keine Unterschiede zeigten. Die immunhistochemische Aufarbeitung der EDM offenbarte den Verlust von Matrixproteinen (u.a. Fibronectin) bei der FED und eine vermehrte Anfärbung von Zytokeratin bei der BK. Matrixproteine sind innerhalb der Descemet Membran für den Zusammenhalt des Anterior Banded Layers (ABL) zum Posterior Non-Banded Layer (PNBL) notwendig. Ist diese Verbindung gestört, kann es zu einer Spaltung innerhalb der Descemet Membran (zwischen ABL und PNBL) kommen und damit eine unvollständige Entfernung der EDM während der DMEK begünstigt werden.⁹⁰ Die vermehrte Expression von Zytokeratin an den EDM bei der BK liefert Hinweise auf eine potentielle Endotheliale-Mesenchymale-Transition, meist aufgrund chronischer Entzündungsprozesse.¹²⁵⁻¹²⁷

In Publikation 2 wurden histomorphologische Befunde der EDM bei FED zu prä- und postoperativen klinischen Parametern, insbesondere dem BCVA, der CCT, der ECD und dem Auftreten von Transplantat-Ablösungen, korreliert.⁸⁷ Hierbei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der ABL-Dicke und der präoperativen zentralen Hornhautdicke ($r = 0,601$; $p = 0,023$), sowie zwischen der ABL-Dicke und der Häufigkeit von Transplantat-Ablösungen ($r = 0,652$; $p = 0,041$). Hiermit konnten wir frühere Annahmen, dass morphologische Veränderungen der EDM Einfluss auf die optimale Transplantat-Adhärenz bzw. das Risiko einer Transplantat-Ablösung haben, bestätigen.^{90, 128}

In Publikation 3 erfolgten immunhistochemische Untersuchungen an dekompensierten Hornhautlamellen nach DSEK.⁸⁸ Hierbei zeigte sich eine Anreicherung von Matrixproteinen (u.a. Fibronectin und Zytokeratin) entlang der Stroma-zu-Stroma Grenzfläche und innerhalb des Hornhautstromas als Zeichen fibrotischer Umbauprozesse.^{129, 130} Im Kontext der klinischen Daten,

bei denen sich eine signifikante Visusreduktion in der Gruppe mit Transplantat-Dekompensation nach DSEK gegenüber der Vergleichsgruppe mit FED zeigte, ($p = 0,018$) kann die Fibrose innerhalb des Strom-zu-Stroma Interfaces als ursächlich für die Visusreduktion angenommen werden. Unsere Schlussfolgerung war daher, dass bei Transplantatdekompositionen eine sekundäre DMEK frühzeitig erfolgen sollte um dem fibrotischen Umbau vorwegzukommen.

In Publikation 4 wurden klinisch-pathologische Mechanismen der Transplantat-Ablösung nach DMEK analysiert.⁹⁰ Hierbei zeigten sich an Descemet-Membranen von Augen mit späterer Transplantat-Ablösung häufiger Risse des ABL, welche auf ein unvollständiges Entfernen des ABL vom Empfängerstroma schließen lassen. In den EDM-Komplexen dieser Augen war der ABL verdickt und erschien lichtmikroskopisch aufgelockert. In immunhistologischen Färbungen zeigte sich ein Verlust der Matrixproteine Fibronectin und Zytokeratin, insbesondere zwischen dem ABL und dem Posterior Non-Banded Layer. Daraus konnten wir schlussfolgern, dass eine inkomplette Entfernung der EDM mit dem Verbleib von ABL-Fragmenten am Empfängerstroma ein Hindernis für die optimale Transplantat-Adhärenz bei der DMEK darstellt. Diese Annahmen konnten später von Müller et al. in histologischen postmortem Untersuchungen bestätigt werden.¹²⁸

4.3 Photochemische Eigenschaften von Trypanblau

Die Verwendung von Trypanblau als Adjuvans zur Darstellung der Spender und Empfänger Descemet-Membran ist seit der Erstbeschreibung durch Gerrit Melles ein essentieller Bestandteil der DMEK.⁵³ In allen vorliegenden klinischen Studien (Publikationen 1 – 4)^{86-88, 90} erfolgte die Präparation des zu transplatierenden DMEK-flaps von der Spenderhornhaut und die Entfernung der EDM vom Empfängerstroma nach der Kontrastierung mit Trypanblau. Aufgrund der Verwendung des Trypanblaus in zwei Prozeduren während der DMEK, insbesondere auch wegen der Anfärbung des EDM-Transplants,

dessen Endothelzellen möglichst lange erhalten bleiben soll, ist die Einschätzung der Toxizität des Trypanblaus von besonderer Bedeutung. In der Literatur wird der größte Endothelzellverlust dabei innerhalb der ersten Woche postoperativ beschrieben.^{92, 131} Als Ursachen hierfür können sowohl das operative Trauma als auch eine Toxizität des Trypanblaus angenommen werden.^{117, 132, 133} Aus diesem Anlass wurden in den vorliegenden in-vitro Studien (Publikation 5 und 6)^{93, 98} die photochemischen Eigenschaften des Trypanblaus quantitativ und qualitativ analysiert.

In Publikation 5 wurde Trypanblau im Vergleich zu Indocyaningrün und Brilliantblau G mit Licht einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Anschließend wurde die Konzentration der Substanzen spektroskopisch ermittelt.⁹³ Hierbei zeigte sich bei Trypanblau und Brilliantblau G unter den gegebenen Bedingungen der kurzwelligen Bestrahlung eine stabile Farbstoffkonzentration, während sich bei Indocyaningrün eine Photolyse zeigte. Aufgrund der bereits bekannten Phototoxizität des Indocyaningrün^{95, 134, 135} konnten unsere Ergebnisse dazu beitragen die Quantität dieses photodynamischen Abbaus besser zu beurteilen. Als Konsequenz aus den allgemeinen Erkenntnissen über Indocyaningrün ist die Verwendung dieses Vitalfarbstoffes in der Ophthalmochirurgie seither zurückgegangen. Hingegen konnte sich Trypanblau und Brilliantblau G weiter durchsetzen. Dennoch sind auch bei Trypanblau mutagene und teratogene Eigenschaften bekannt.^{96, 97}

In Originalarbeit 6 erfolgten, aufbauend auf den Erkenntnissen von Publikation 5, weitergehende Analysen zu den photochemischen Eigenschaften von Trypanblau.⁹⁸ Der Grundgedanke dieser Untersuchungen lag in der Erkenntnis, dass sich das Toxizitätsprofil von Trypanblau zwischen der Anwendung im vorderen und hinteren Augenabschnitt unterscheidet.^{75, 79, 83, 84, 99, 100, 136} In früheren in-vivo und in-vitro Versuchen konnte hierbei eine lichtabhängige Toxizität beobachtet werden.¹⁰¹ In der vorliegenden Studie wurde in in-vitro Experimenten daher unter anderem die Wechselwirkung von Trypanblau mit Lutein/Zeaxanthin analysiert. Trypanblau-Lösungen und Lösungsmischungen

aus Trypanblau und Lutein/Zeaxanthin wurden mit Blaulicht bestrahlt und mittels Lichtmikroskopie, UV/Vis Spektroskopie, Massenspektrometrie und Kernspinresonanz-Spektrometrie untersucht. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass es zu einem Lutein/Zeaxanthin-getriggerten photochemischen Abbau von Trypanblau kommt. Hierbei unterschieden sich die Abbauwege mit und ohne Anwesenheit von Lutein/Zeaxanthin. Während die selbstinduzierte Photodegradierung des Trypanblaus unter der Bildung von Dimethylsulfat und der angenommenen Bildung von Phenol erfolgt, zeigten sich beim Abbau von Trypanblau in Wechselwirkung mit Lutein/Zeaxanthin Hinweise auf die Bildung von Methylhydroxylamin und Sulfonylarin.

Sowohl für Dimethylsulfat, als auch für Methylhydroxylamin ist eine Zytotoxizität bekannt.¹³⁷⁻¹³⁹ Sulfonylarin ist ein hoch-reaktiver Metabolit von dem eine zelluläre Toxizität angenommen wird.¹⁴⁰ Unsere Ergebnisse konnten damit zu einem besseren Verständnis der Degradierungsmechanismen von Trypanblau beitragen und bisherige Beobachtungen zur Toxizität besser erklären.

Als Alternative zu Trypanblau wurde von Siebelmann et al. und Hayashi et al. die Anwendung von Brilliantblau G während der DMEK klinisch untersucht.^{141, 142} Die Autoren beobachteten hierbei vergleichbare Kontrastierungseigenschaften, jedoch keinen Vorteil hinsichtlich des initialen postoperativen Endothelzellverlustes. Eine bessere Alternative zum Trypanblau steht daher aktuell noch nicht zur Verfügung.

5 Zusammenfassung

Die DMEK, als Verfahren der posterioren lamellären Keratoplastik, hat sich seit der Erstbeschreibung 2006 für die Behandlung endothelialer Keratopathien fest etabliert. Die wichtigsten Indikationen stellen hierbei die FED, die BK und die Transplantatdekompensation nach Keratoplastik dar.

Im Vergleich der klinischen Ergebnisse nach DMEK konnten wir für diese wichtigsten Indikationen Unterschiede im postoperativen Verlauf herausarbeiten. Hierbei zeigten sich vergleichbare Visusergebnisse zwischen FED und BK, während der Visus bei Transplantatdekompensation nach DSEK, auch 12 Monate postoperativ, reduziert war. In diesem Zusammenhang konnten wir mittels Immunhistochemie fibrotische Veränderungen im Stroma-Interface dekompensierter Hornhäuten nach Keratoplastik, die als Ursache des reduzierten Visus angesehen werden können, nachweisen.

Desweiteren zeigten sich beim Vergleich zwischen FED und BK unterschiedliche Muster im Auftreten postoperativer Transplantat-Ablösungen. Bei der FED kam es häufiger zu wiederholten Ablösungen. Diesbezüglich konnten wir immunhistochemisch eine Rarefizierung von Matrixproteinen innerhalb der Descemet-Membran bei der FED beobachten. In weitergehenden Untersuchungen zu den Pathomechanismen der Transplantat-Ablösungen nach DMEK konnten wir zeigen, dass der Verlust von Matrixproteinen mit einer Auflockerung der Verbindung zwischen den Schichten der Descemet-Membran (ABL und PNBL) assoziiert war und in Fällen mit Transplantat-Ablösung häufiger Risse innerhalb der Descemet-Membran beobachtet wurden. Somit können Reste der Descemet-Membran als Hindernis für die adäquate Transplantat-Adhärenz und damit als eine Ursache für Transplantat-Ablösungen angesehen werden.

Insgesamt konnten wir sehr gute funktionelle Ergebnisse nach DMEK aufzeigen, sodass eine vollständige Visuserholung in Augen ohne okuläre Begleiterkrankungen möglich ist. Zur Beuteilung prognostischer Faktoren der klinischen Ergebnisse analysierten wir Daten nach primärer DMEK bei FED. Als wesentlichen Prädiktor für den Visus, 12 Monate nach DMEK, konnten wir

die präoperative zentrale Hornhautdicke identifizieren. Auge mit einer präoperativen Hornhautdicke $< 625 \mu\text{m}$ zeigten dabei bessere Visusergebnisse, als Augen mit einer präoperativen Hornhautdicke $\geq 625 \mu\text{m}$. Außerdem konnte ein früherer Visusanstieg in Augen beobachtet werden, deren zuvor operiertes Partnerauge bereits 6 Monate nach DMEK eine Sehschärfe von $\geq 0,8$ Dezimalvisus erreichte.

Hinsichtlich der Prognose der zu erwartenden postoperativen Endothelzell-dichte zeigte sich die Ausgangs-Endothelzell-dichte des Transplantats als prognostisch relevant. Dementsprechend zeigte sich häufiger ein Endothelzellverlust auf eine Endothelzell-dichte < 1.000 Zellen/ mm^2 in Fällen, in denen die Ausgangs-Endothelzell-dichte ≤ 2.100 Zellen/ mm^2 betrug.

Im Hinblick auf den initialen Endothelzellverlust nach DMEK untersuchten wir die photochemischen Eigenschaften von Trypanblau. Hierbei zeigte sich zwar nur eine geringe Photodynamik des Trypanblau in Abwesenheit von Antioxidantien, jedoch geben unsere Daten Hinweise auf die Bildung zytotoxischer Metabolite insbesondere in Wechselwirkung mit Antioxidantien. Vor diesem Hintergrund können neben dem Operationstrauma am Transplantat die photochemische Degradierung des Trypanblaus als weitere Ursache für den initialen Endothelzellverlust während der ersten postoperativen Woche angesehen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die DMEK ein sicheres und effizientes Verfahren der posterioren lamellären Keratoplastik für verschiedene endotheliale Keratopathien darstellt. Unsere Arbeiten können in diesem Zusammenhang dazu beitragen unterschiedliche klinische Verläufe nach DMEK zu erklären und diese zum Teil auch vorherzusagen.

Aus unserer Sicht bestehen die zukünftigen Herausforderungen zur Verbesserung der langfristigen Ergebnisse nach DMEK darin fibrotische Umbauprozesse zu unterbinden und den Endothelzellverlust am Transplantat zu verringern. Neben der Optimierung des Operationsverfahrens ist hierbei die Verbesserung pharmakologischer Therapiemöglichkeiten notwendig und sollte somit auch künftig im Fokus der wissenschaftlichen Arbeit stehen.

Literaturverzeichnis

1. Bergmanson JP, Martinez JG. Size does matter: what is the corneo-limbal diameter? *Clin Exp Optom* 2017;100(5):522-8.
2. Naumann GOH, Apple DJ. *Pathology of the Eye*: Springer, 1986; 998.
3. Donnelly WJ, Roorda A. Optimal pupil size in the human eye for axial resolution. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2003;20(11):2010-5.
4. Tabernero J, Klyce SD, Sarver EJ, Artal P. Functional optical zone of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(3):1053-60.
5. Navarro R. *The Optical Design of the Human Eye: a Critical Review*. *J Optom* 2009; v. 2.
6. Meek KM, Dennis S, Khan S. Changes in the refractive index of the stroma and its extrafibrillar matrix when the cornea swells. *Biophys J* 2003;85(4):2205-12.
7. Dubbelman M, Sicam VA, Van der Heijde GL. The shape of the anterior and posterior surface of the aging human cornea. *Vision Res* 2006;46(6-7):993-1001.
8. Graw J. Eye development. *Curr Top Dev Biol* 2010;90:343-86.
9. Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res* 2010;90(4):478-92.
10. Du C, Wang J, Cui L, et al. Vertical and horizontal corneal epithelial thickness profiles determined by ultrahigh resolution optical coherence tomography. *Cornea* 2012;31(9):1036-43.
11. Ehlers N, Heegaard S, Hjortdal J, et al. Morphological evaluation of normal human corneal epithelium. *Acta Ophthalmol* 2010;88(8):858-61.
12. Treuting P, Dintzis S, Montine KS. *Comparative Anatomy and Histology. A Mouse, Rat, and Human Atlas*. 2nd ed: Academic Press, 2017.
13. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res* 2015;49:1-16.
14. Chen S, Mienaltowski MJ, Birk DE. Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. *Exp Eye Res* 2015;133:69-80.
15. Pavelka M, Roth J. *Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology*, 3rd ed: Springer, 2015; 402.
16. Hejtmancik, Fieldin J, Nickerson JM. *Molecular Biology of Eye Disease*. In: Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD, eds. *Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development*, 1st ed: Academic Press, 2015.
17. Ko MK, Kim JG, Chi JG. Cell density of the corneal endothelium in human fetus by flat preparation. *Cornea* 2000;19(1):80-3.
18. Galgauskas S, Norvydaitė D, Krasauskaitė D, et al. Age-related changes in corneal thickness and endothelial characteristics. *Clin Interv Aging* 2013;8:1445-50.
19. Lundberg B, Jonsson M, Behndig A. Postoperative corneal swelling correlates strongly to corneal endothelial cell loss after phacoemulsification cataract surgery. *Am J Ophthalmol* 2005;139(6):1035-41.

20. Olsen T, Eriksen JS. Corneal thickness and endothelial damage after intraocular lens implantation. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1980;58(5):773-86.
21. Rao GN, Aquavella JV, Goldberg SH, Berk SL. Pseudophakic bullous keratopathy. Relationship to preoperative corneal endothelial status. *Ophthalmology* 1984;91(10):1135-40.
22. Zhang J, Patel DV. The pathophysiology of Fuchs' endothelial dystrophy--a review of molecular and cellular insights. *Exp Eye Res* 2015;130:97-105.
23. Liakos GM, Casey TA. Posterior polymorphous keratopathy. *Br J Ophthalmol* 1978;62(1):39-45.
24. Levy SG, McCartney AC, Baghai MH, et al. Pathology of the iridocorneal-endothelial syndrome. The ICE-cell. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(13):2592-601.
25. Bertelmann E, Pleyer U, Rieck P. Risk factors for endothelial cell loss post-keratoplasty. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84(6):766-70.
26. Kitagawa K, Kojima M, Sasaki H, et al. Prevalence of primary cornea guttata and morphology of corneal endothelium in aging Japanese and Singaporean subjects. *Ophthalmic Res* 2002;34(3):135-8.
27. Zoega GM, Fujisawa A, Sasaki H, et al. Prevalence and risk factors for cornea guttata in the Reykjavik Eye Study. *Ophthalmology* 2006;113(4):565-9.
28. Biswas S, Munier FL, Yardley J, et al. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet* 2001;10(21):2415-23.
29. Gottsch JD, Zhang C, Sundin OH, et al. Fuchs corneal dystrophy: aberrant collagen distribution in an L450W mutant of the COL8A2 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(12):4504-11.
30. Baratz KH, Tosakulwong N, Ryu E, et al. E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *N Engl J Med* 2010;363(11):1016-24.
31. Riazuddin SA, Zaghoul NA, Al-Saif A, et al. Missense mutations in TCF8 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy and interact with FCD4 on chromosome 9p. *Am J Hum Genet* 2010;86(1):45-53.
32. Riazuddin SA, Vithana EN, Seet LF, et al. Missense mutations in the sodium borate cotransporter SLC4A11 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Hum Mutat* 2010;31(11):1261-8.
33. Alka K, Casey JR. Molecular phenotype of SLC4A11 missense mutants: Setting the stage for personalized medicine in corneal dystrophies. *Hum Mutat* 2018;39(5):676-90.
34. Kim KN, Lee SB, Lee YH, et al. Changes in corneal endothelial cell density and the cumulative risk of corneal decompensation after Ahmed glaucoma valve implantation. *Br J Ophthalmol* 2016;100(7):933-8.
35. Doors M, Berendschot TT, Touwslager W, et al. Phacopower modulation and the risk for postoperative corneal decompensation: a randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol* 2013;131(11):1443-50.
36. Pricopie S, Istrate S, Voinea L, et al. Pseudophakic bullous keratopathy. *Rom J Ophthalmol* 2017;61(2):90-4.

37. Akanda ZZ, Naeem A, Russell E, et al. Graft rejection rate and graft failure rate of penetrating keratoplasty (PKP) vs lamellar procedures: a systematic review. *PLoS One* 2015;10(3):e0119934.
38. Amouzegar A, Chauhan SK, Dana R. Alloimmunity and Tolerance in Corneal Transplantation. *J Immunol* 2016;196(10):3983-91.
39. Wakefield MJ, Armitage WJ, Jones MN, et al. The impact of donor age and endothelial cell density on graft survival following penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 2016;100(7):986-9.
40. Fasolo A, Capuzzo C, Fornea M, et al. Risk factors for graft failure after penetrating keratoplasty: 5-year follow-up from the corneal transplant epidemiological study. *Cornea* 2011;30(12):1328-35.
41. Pasari A, Price MO, Feng MT, Price FW. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty for Failed Penetrating Keratoplasty: Visual Outcomes and Graft Survival. *Cornea* 2018.
42. Stulting RD, Lass JH, Terry MA, et al. Factors Associated with Graft Rejection in the Cornea Preservation Time Study. *Am J Ophthalmol* 2018.
43. Pedersen IB, Ivarsen A, Hjortdal J. Graft rejection and failure following endothelial keratoplasty (DSAEK) and penetrating keratoplasty for secondary endothelial failure. *Acta Ophthalmol* 2015;93(2):172-7.
44. Price DA, Kelley M, Price FW, Price MO. Five-Year Graft Survival of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (EK) versus Descemet Stripping EK and the Effect of Donor Sex Matching. *Ophthalmology* 2018;125(10):1508-14.
45. Price MO, Fairchild KM, Price DA, Price FW. Descemet's stripping endothelial keratoplasty five-year graft survival and endothelial cell loss. *Ophthalmology* 2011;118(4):725-9.
46. Ang M, Soh Y, Htoon HM, et al. Five-Year Graft Survival Comparing Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty and Penetrating Keratoplasty. *Ophthalmology* 2016;123(8):1646-52.
47. Schlögl A, Tourtas T, Kruse FE, Weller JM. Long-term Clinical Outcome After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2016;169:218-26.
48. Göschel G. Die Geschichte der Hornhauttransplantation: Natur & Text, 1992; 120.
49. Zirm E. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik. *Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie* 1906;64(3):580-93.
50. Melles GR, Wijdh RH, Nieuwendaal CP. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea* 2004;23(3):286-8.
51. Price FW, Price MO. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 50 eyes: a refractive neutral corneal transplant. *J Refract Surg* 2005;21(4):339-45.
52. Melles GR, Ong TS, Ververs B, van der Wees J. Preliminary clinical results of Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2008;145(2):222-7.
53. Melles GR, Ong TS, Ververs B, van der Wees J. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea* 2006;25(8):987-90.

54. Hjortdal J. Corneal Transplantation, 1st ed: Springer, 2017; 236.
55. Böhringer D, Schindler A, Reinhard T. [Satisfaction with penetrating keratoplasty. Results of a questionnaire census]. *Ophthalmologe* 2006;103(8):677-81.
56. Nanavaty MA, Shortt AJ. Endothelial keratoplasty versus penetrating keratoplasty for Fuchs endothelial dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* 2011(7):CD008420.
57. Nanavaty MA, Wang X, Shortt AJ. Endothelial keratoplasty versus penetrating keratoplasty for Fuchs endothelial dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;2:CD008420.
58. Maier P, Reinhard T, Cursiefen C. Descemet stripping endothelial keratoplasty--rapid recovery of visual acuity. *Dtsch Arztebl Int* 2013;110(21):365-71.
59. Heinzlmann S, Maier P, Böhringer D, et al. Visual outcome and histological findings following femtosecond laser-assisted versus microkeratome-assisted DSAEK. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013;251(8):1979-85.
60. Cleary C, Liu Y, Tang M, et al. Excimer laser smoothing of endothelial keratoplasty grafts. *Cornea* 2012;31(4):431-6.
61. Singh A, Zarei-Ghanavati M, Avadhanam V, Liu C. Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Outcomes of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Versus Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty/Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2017;36(11):1437-43.
62. Hwang RY, Gauthier DJ, Wallace D, Afshari NA. Refractive changes after descemet stripping endothelial keratoplasty: a simplified mathematical model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(2):1043-54.
63. Cursiefen C, Kruse FE. [DMEK: Descemet membrane endothelial keratoplasty]. *Ophthalmologe* 2010;107(4):370-6.
64. Mohammed I, Ross AR, Britton JO, et al. Elastin Content and Distribution in Endothelial Keratoplasty Tissue Determines Direction of Scrolling. *Am J Ophthalmol* 2018;194:16-25.
65. van Dijk K, Ham L, Tse WH, et al. Near complete visual recovery and refractive stability in modern corneal transplantation: Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cont Lens Anterior Eye* 2013;36(1):13-21.
66. Ham L, Dapena I, Moutsouris K, et al. Refractive change and stability after Descemet membrane endothelial keratoplasty. Effect of corneal dehydration-induced hyperopic shift on intraocular lens power calculation. *J Cataract Refract Surg* 2011;37(8):1455-64.
67. Horiguchi M, Miyake K, Ohta I, Ito Y. Staining of the lens capsule for circular continuous capsulorrhexis in eyes with white cataract. *Arch Ophthalmol* 1998;116(4):535-7.
68. Melles GR, de Waard PW, Pameyer JH, Houdijn Beekhuis W. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorrhexis in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 1999;25(1):7-9.

69. Burk SE, Da Mata AP, Snyder ME, et al. Indocyanine green-assisted peeling of the retinal internal limiting membrane. *Ophthalmology* 2000;107(11):2010-4.
70. Li K, Wong D, Hiscott P, et al. Trypan blue staining of internal limiting membrane and epiretinal membrane during vitrectomy: visual results and histopathological findings. *Br J Ophthalmol* 2003;87(2):216-9.
71. Enaida H, Hisatomi T, Hata Y, et al. Brilliant blue G selectively stains the internal limiting membrane/brilliant blue G-assisted membrane peeling. *Retina* 2006;26(6):631-6.
72. Brockmann T, Steger C, Weger M, et al. Risk assessment of idiopathic macular holes undergoing vitrectomy with dye-assisted internal limiting membrane peeling. *Retina* 2013;33(6):1132-6.
73. Brockmann T, Steger C, Westermann M, et al. Ultrastructure of the membrana limitans interna after dye-assisted membrane peeling. *Ophthalmologica* 2011;226(4):228-33.
74. Remy M, Thaler S, Schumann RG, et al. An in vivo evaluation of Brilliant Blue G in animals and humans. *Br J Ophthalmol* 2008;92(8):1142-7.
75. Farah ME, Maia M, Rodrigues EB. Dyes in ocular surgery: principles for use in chromovitrectomy. *Am J Ophthalmol* 2009;148(3):332-40.
76. Mennel S, Meyer CH, Tietjen A, et al. Patent blue: a novel vital dye in vitreoretinal surgery. *Ophthalmologica* 2006;220(3):190-3.
77. Lüke C, Lüke M, Dietlein TS, et al. Retinal tolerance to dyes. *Br J Ophthalmol* 2005;89(9):1188-91.
78. Rodrigues EB, Penha FM, de Paula Fiod Costa E, et al. Ability of new vital dyes to stain intraocular membranes and tissues in ocular surgery. *Am J Ophthalmol* 2010;149(2):265-77.
79. Morales MC, Freire V, Asumendi A, et al. Comparative effects of six intraocular vital dyes on retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(11):6018-29.
80. Ehrlich P. Chemotherapeutische Trypanosomen-Studien. *Berliner klin Wochenschr* 1907(13):320-32.
81. Sinha R, Vajpayee RB, Sharma N, et al. Trypan blue assisted descemetorhexis for inadvertently retained Descemet's membranes after penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 2003;87(5):654-5.
82. Feron EJ, Veckeneer M, Parys-Van Ginderdeuren R, et al. Trypan blue staining of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 2002;120(2):141-4.
83. Maia M, Penha F, Rodrigues EB, et al. Effects of subretinal injection of patent blue and trypan blue in rabbits. *Curr Eye Res* 2007;32(4):309-17.
84. Penha FM, Maia M, Eid Farah M, et al. Effects of subretinal injections of indocyanine green, trypan blue, and glucose in rabbit eyes. *Ophthalmology* 2007;114(5):899-908.
85. Kodjikian L, Richter T, Halberstadt M, et al. Toxic effects of indocyanine green, infracyanine green, and trypan blue on the human retinal pigmented epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;43(9):917-25.
86. Brockmann T, Brockmann C, Maier AB, et al. Primary Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty for Fuchs Endothelial Dystrophy

- versus Bullous Keratopathy: Histopathology and Clinical Results. *Curr Eye Res* 2018;43(10):1221-7.
87. Brockmann T, Pilger D, Brockmann C, et al. Predictive Factors for Clinical Outcomes after Primary Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty for Fuchs' Endothelial Dystrophy. *Curr Eye Res* 2018.
 88. Brockmann T, Brockmann C, Maier AK, et al. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty for Graft Failure After Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty: Clinical Results and Histopathologic Findings. *JAMA Ophthalmol* 2015;133(7):813-9.
 89. Anshu A, Price MO, Price FW. Risk of corneal transplant rejection significantly reduced with Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmology* 2012;119(3):536-40.
 90. Brockmann T, Brockmann C, Maier AK, et al. Clinicopathology of graft detachment after Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Acta Ophthalmol* 2014;92(7):e556-61.
 91. Baydoun L, Ham L, Borderie V, et al. Endothelial Survival After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Effect of Surgical Indication and Graft Adherence Status. *JAMA Ophthalmol* 2015;133(11):1277-85.
 92. Miron A, Bruinsma M, Ham L, et al. In Vivo Endothelial Cell Density Decline in the Early Postoperative Phase After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2018;37(6):673-7.
 93. Brockmann T, Steger C, Dawczynski J. Photodynamic properties of vital dyes for vitreoretinal surgery. *Ophthalmologica* 2012;228(4):234-8.
 94. Costa EP, Rodrigues E, Farah M, et al. Vital dyes and light sources for chromovitrectomy: comparative assessment of osmolarity, pH, and spectrophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(1):385-91.
 95. Engel E, Schraml R, Maisch T, et al. Light-induced decomposition of indocyanine green. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(5):1777-83.
 96. Chung KT. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutat Res* 1983;114(3):269-81.
 97. Ema M, Kanoh S. [Studies on the pharmacological bases of fetal toxicity of drugs. (II). Effect of trypan blue on the pregnant rats and their offspring]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 1982;79(5):369-81.
 98. Brockmann T, Blanchard V, Heretsch P, et al. Photochemical degradation of trypan blue. *PLOS ONE* 2018;13(4).
 99. Jacobs DS, Cox TA, Wagoner MD, et al. Capsule staining as an adjunct to cataract surgery: a report from the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2006;113(4):707-13.
 100. Lüke M, Grisanti S, Lüke J, Collaboration IC. The retinal biocompatibility of dyes in the ex vivo model of the isolated superfused vertebrate retina. *Ophthalmologica* 2013;230 Suppl 2:21-6.
 101. Giansanti F, Schiavone N, Papucci L, et al. Safety testing of blue vital dyes using cell culture models. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014;30(5):406-12.
 102. Deng SX, Lee WB, Hammersmith KM, et al. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Safety and Outcomes: A Report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2017.

103. Maier AK, Gundlach E, Gonnermann J, et al. Fellow Eye Comparison of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty and Penetrating Keratoplasty. *Cornea* 2013;32(10):1344-8.
104. Weller JM, Schlötzer-Schrehardt U, Tourtas T, Kruse FE. Influence of Ultrastructural Corneal Graft Abnormalities on the Outcome of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2016;169:58-67.
105. Quilendrino R, Rodriguez-Calvo de Mora M, Baydoun L, et al. Prevention and Management of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Complications. *Cornea* 2017;36(9):1089-95.
106. Lee HJ, Munir WM. Eventual Endothelial Failure After Initial Corneal Clearing After a Detached Endothelial Graft in Fuchs Dystrophy. *Cornea* 2017;36(2):241-3.
107. Peraza-Nieves J, Baydoun L, Dapena I, et al. Two-Year Clinical Outcome of 500 Consecutive Cases Undergoing Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2017;36(6):655-60.
108. Javadi MA, Feizi S, Jafari R, et al. Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty in Fuchs' Endothelial Dystrophy versus Pseudophakic Bullous Keratopathy. *J Ophthalmic Vis Res* 2016;11(4):372-8.
109. Dirisamer M, van Dijk K, Dapena I, et al. Prevention and management of graft detachment in descemet membrane endothelial keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 2012;130(3):280-91.
110. Sorkin N, Showail M, Einan-Lifshitz A, et al. Outcomes of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty in Eyes With a Previous Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty Graft. *Cornea* 2018;37(6):678-81.
111. Baydoun L, van Dijk K, Dapena I, et al. Repeat descemet membrane endothelial keratoplasty after complicated primary descemet membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmology* 2015;122(1):8-16.
112. Weller JM, Tourtas T, Kruse FE, et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty as treatment for graft failure after descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2015;159(6):1050-7.e2.
113. Siggel R, Adler W, Stanzel TP, et al. Bilateral Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Analysis of Clinical Outcome in First and Fellow Eye. *Cornea* 2016;35(6):772-7.
114. Schaub F, Gerber F, Adler W, et al. Corneal densitometry as predictive diagnostic tool for visual acuity results following Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2018.
115. Otri AM, Fares U, Al-Aqaba MA, Dua HS. Corneal densitometry as an indicator of corneal health. *Ophthalmology* 2012;119(3):501-8.
116. Tourtas T, Schlomberg J, Wessel JM, et al. Graft Adhesion in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Dependent on Size of Removal of Host's Descemet Membrane. *JAMA Ophthalmol* 2014;132(2):155-61.
117. Maier AK, Gundlach E, Schroeter J, et al. Influence of the difficulty of graft unfolding and attachment on the outcome in Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253(6):895-900.

118. Röck T, Bramkamp M, Bartz-Schmidt KU, et al. Causes that influence the detachment rate after Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253(12):2217-22.
119. Rodriguez-Calvo de Mora M, Groeneveld-van Beek EA, Frank LE, et al. Association Between Graft Storage Time and Donor Age With Endothelial Cell Density and Graft Adherence After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *JAMA Ophthalmol* 2016;134(1):91-4.
120. Pilger D, Wilkemeyer I, Schroeter J, et al. Rebubbling in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Influence of Pressure and Duration of the Intracameral Air Tamponade. *Am J Ophthalmol* 2017;178:122-8.
121. Heinzelmann S, Bohringer D, Haverkamp C, et al. Influence of Postoperative Intraocular Pressure on Graft Detachment After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2018;37(11):1347-50.
122. Leon P, Parekh M, Nahum Y, et al. Factors Associated With Early Graft Detachment in Primary Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2018;187:117-24.
123. Schaub F, Enders P, Snijders K, et al. One-year outcome after Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK) comparing sulfur hexafluoride (SF6) 20% versus 100% air for anterior chamber tamponade. *Br J Ophthalmol* 2017;101(7):902-8.
124. Siebelmann S, Lopez Ramos S, Scholz P, et al. Graft Detachment Pattern After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Comparing Air Versus 20% SF6 Tamponade. *Cornea* 2018;37(7):834-9.
125. Hillenaar T, Mooy CM, Verjans GM, Remeijer L. Zipper cell endotheliopathy: a new subset of idiopathic corneal edema. *Ophthalmology* 2010;117(12):2255-62.
126. Hidayat AA, Cockerham GC. Epithelial metaplasia of the corneal endothelium in Fuchs endothelial dystrophy. *Cornea* 2006;25(8):956-9.
127. Jirsova K, Merjava S, Martincova R, et al. Immunohistochemical characterization of cytokeratins in the abnormal corneal endothelium of posterior polymorphous corneal dystrophy patients. *Exp Eye Res* 2007;84(4):680-6.
128. Müller TM, Verdijk RM, Lavy I, et al. Histopathologic Features of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Graft Remnants, Folds, and Detachments. *Ophthalmology* 2016;123(12):2489-97.
129. Karamichos D, Guo XQ, Hutcheon AE, Zieske JD. Human corneal fibrosis: an in vitro model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(3):1382-8.
130. Bargagna-Mohan P, Paranthan RR, Hamza A, et al. Corneal antifibrotic switch identified in genetic and pharmacological deficiency of vimentin. *J Biol Chem* 2012;287(2):989-1006.
131. Patel SV. Graft survival and endothelial outcomes in the new era of endothelial keratoplasty. *Exp Eye Res* 2012;95(1):40-7.
132. Weber IP, Rana M, Thomas PBM, et al. Effect of vital dyes on human corneal endothelium and elasticity of Descemet's membrane. *PLoS One* 2017;12(9):e0184375.
133. Ari S, Caca I, Unlu K, et al. Effects of trypan blue on corneal endothelium and anterior lens capsule in albino wistar rats: An investigator-masked,

- controlled, two-period, experimental study. *Curr Ther Res Clin Exp* 2006;67(6):366-77.
134. Balaiya S, Brar VS, Murthy RK, Chalam KV. Comparative in vitro safety analysis of dyes for chromovitrectomy: indocyanine green, brilliant blue green, bromophenol blue, and infracyanine green. *Retina* 2011;31(6):1128-36.
135. Gandorfer A, Haritoglou C, Kampik A. Toxicity of indocyanine green in vitreoretinal surgery. *Dev Ophthalmol* 2008;42:69-81.
136. Bacsal KM, Chee SP. Trypan blue-associated retinal toxicity post complicated cataract surgery. *Eye (Lond)* 2006;20(11):1310-1.
137. Mathison BH, Frame SR, Bogdanffy MS. DNA methylation, cell proliferation, and histopathology in rats following repeated inhalation exposure to dimethyl sulfate. *Inhal Toxicol* 2004;16(9):581-92.
138. DeSesso JM, Jacobson CF, Scialli AR, Goeringer GC. Hydroxylamine moiety of developmental toxicants is associated with early cell death: a structure-activity analysis. *Teratology* 2000;62(5):346-55.
139. Gross P. Biologic activity of hydroxylamine: a review. *Crit Rev Toxicol* 1985;14(1):87-99.
140. Mittag T. Role of oxygen radicals in ocular inflammation and cellular damage. *Exp Eye Res* 1984;39(6):759-69.
141. Siebelmann S, Matthaer M, Hörster R, et al. Lutein and Brilliant Blue-Based Dye for Donor Preparation and Transplantation in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2017;36(4):440-4.
142. Hayashi T, Yuda K, Oyakawa I, Kato N. Use of Brilliant Blue G in Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty. *Biomed Res Int* 2017;2017:9720389.

Danksagung

Ich danke zunächst Frau Prof. Dr. med. Antonia M. Jousen für die Bereitstellung des wissenschaftlichen Umfeldes an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Ihr besonderes Engagement für Wissenschaft und Forschung hat mich inspiriert und motiviert. Ich danke ihr, dass sie meinem wissenschaftlichen und klinischen Werdegang stets aufgeschlossen gegenüber stand und diesen unterstützt.

Mein spezieller Dank gilt Herrn PD Dr. med. Necip Torun für die Überlassung des Themas. Durch seine operative Hingabe und fürsorgliche Patientenbetreuung konnte an der Augenklinik die DMEK Operation etabliert und in den folgenden Jahren ein großes Kollektiv von Patienten mit Hornhauttransplantation aufgebaut werden, welches die wesentliche Grundlage dieser Arbeit war.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Eckart Bertelmann für die fortwährende wissenschaftliche, klinische und chirurgische Förderung und Begleitung. Seine jederzeit hilfreiche und fachlich kompetente Unterstützung hat mich kontinuierlich motiviert und hat damit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. Uwe Pleyer danke ich für die wissenschaftliche und klinische Begleitung. Viele konstruktive und beleuchtende Diskussionen mit ihm haben immer wieder Impulse gesetzt und neue Sichtweisen eröffnet.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich für die Gewährung des Stipendiums im Rahmen des BIH Charité Clinician Scientist Programms bedanken. Durch das strukturierte Gesamtkonzept von Frau Prof. Dr. med. Duska Dragun und der Koordination von Frau Dr. Nathalie Huber wurde mir Raum für wissenschaftliches Arbeiten gelassen. Hierbei ist zu erwähnen, dass mir dabei Herr Prof. Dr. med. Eckart Bertelmann und Herr Prof. Dr. med.

Uwe Pleyer als klinische und wissenschaftliche Mentoren stets zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. med. Daniel J. Salchow, Herrn Dr. med. Bert Müller, Frau Dr. med. Sibylle Winterhalter und Frau PD Dr. med. Tina Dietrich-Ntoukas danke ich, dass sie mich durch ihre langjährige klinische Erfahrung und hohe Kompetenz in der klinischen Ausbildung gefördert haben.

Für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Frau PD Dr. med. Anna-Karina Maier-Wenzel, Herrn PD Dr. med. Matthias Klamann, Herrn PD Dr. med. Johannes Gonnermann, Herrn PD Dr. med. Richard Bergholz, Herrn Dr. med. Christoph von Sonneithner, Herrn Dr. med. Daniel Pilger und Frau Dr. med. Anne Rübsam. Ihre angenehm, konstruktive Mitwirkung als klinische Wegbegleiter und Mitautoren hat die wissenschaftliche und klinische Arbeit erleichtert und verbessert.

Den Mitarbeitern der Experimentellen Ophthalmologie um Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß, sowie Herrn Dr. rer. nat. Norbert Kociok und PD Dr. rer. nat. Stefan Mergler danke ich für ihre Aufgeschlossenheit und die Bereitung des idealen Arbeitsumfeldes.

Für die hervorragende Aufarbeitung der histologischen Proben möchte ich mich bei Frau Karin Oberländer bedanken. Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern der Fotoabteilung um Herrn Dirk Scharf, den Mitarbeitern der Pflege um Frau Claudia Gluch, sowie den ärztlichen Kollegen der Augenklinik für die Patientenuntersuchungen und -betreuung.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die bereits frühzeitig das wissenschaftliche Interesse in mir geweckt und mich stets auf meinem Weg unterstützt haben. Meiner Frau Claudia und unserer Tochter Laura, denen diese Arbeit gewidmet ist, danke ich besonders für ihre rücksichtsvolle und liebevolle Art, die mir Kraft und Rückhalt gibt.

Erklärung

gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, Datum

Dr. med. Tobias Brockmann