

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier

**Neue Ansätze zur Therapie bakteriell bedingter Keratitiden -
Photodynamische Inaktivierung mit Chlorin e6 und Begasung
mit Stickstoffmonoxid *in vivo***

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2017

vorgelegt von Mona Deichelbohrer
geboren am 22.02.1992 in Viernheim, Bundesrepublik Deutschland

Tag der Promotion:

Betreuer: Prof. Dr. med. T. Tschernig

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

Berichterstattende:

„Man soll auf alles achten, denn man kann alles deuten.“

- Hermann Hesse -

Meiner Mutter. Für alles.

Inhaltsverzeichnis

1. <u>Zusammenfassung</u>	1
1.1. Hintergrund und Ziele	1
1.2. Material und Methoden	1
1.3. Ergebnisse	2
1.4. Schlussfolgerung und Ausblick	2
2. <u>Summary</u>	4
2.1. Background and objectives	4
2.2. Material and methods	4
2.3. Results	5
2.4. Conclusion and prospects	5
3. <u>Einleitung</u>	6
3.1. Klinischer Hintergrund	6
3.2. <i>Staphylokokkus aureus</i>	7
3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
3.4. Photodynamische Inaktivierung	9
3.5. Therapie mit gasförmigem Stickstoffmonoxid	10
3.6. Experimentelle Keratitis	11
3.7. Hypothesen	12
4. <u>Material und Methoden</u>	13
4.1. Versuchstiere	13
4.2. Optimierung der Infektion	13
4.3. Mikrobiologische Aufbereitung der Bakteriensuspension	14
4.4. Narkotisierung, Schmerztherapie und Allgemeinzustand der Tiere	14
4.5. Infektionsvorgang	16
4.6. Photodynamische Inaktivierung mit Chlorin e6	16
4.7. Therapie mit gasförmigem Stickstoffmonoxid	19
4.8. Histologische Aufarbeitung der Präparate	23
4.9. Auswertung	25

4.9.1. Mikrobiologische Auswertung.....	25
4.9.2. Klinische Untersuchung, Gewichtskontrolle.....	25
4.9.3. Histologische Auswertung.....	26
4.10. Euthanasie der Tiere, Augenentnahme.....	31
4.11. Statistische Auswertung.....	31
5. <u>Ergebnisse</u>	32
5.1. Ergebnisse der PDI mit Chlorin e6.....	32
5.1.1. Referenzwerte nicht infizierter, nicht therapierter Augen.....	32
5.1.2. PDI-therapierte Augen.....	33
5.1.2.1. Infiltrierter Hornhautanteil.....	33
5.1.2.2. Zentrale und maximale Hornhautdicke.....	34
5.1.2.3. Hypopyonausprägung.....	35
5.1.3. Infizierte, scheintherapierte Augen.....	36
5.1.3.1. Infiltrierter Hornhautanteil.....	36
5.1.3.2. Zentrale und maximale Hornhautdicke.....	37
5.1.3.3. Hypopyonausprägung.....	38
5.1.4. Infizierte, nicht therapierte Augen.....	39
5.1.4.1. Infiltrierter Hornhautanteil.....	39
5.1.4.2. Zentrale und maximale Hornhautdicke.....	40
5.1.4.3. Hypopyonausprägung.....	41
5.1.5. Vergleich der Gruppen.....	42
5.1.5.1. Infiltrierter Hornhautanteil.....	42
5.1.5.2. Zentrale Hornhautdicke.....	44
5.1.5.3. Maximale Hornhautdicke.....	46
5.1.5.4. Hypopyonausprägung.....	48
5.2. Ergebnisse der Therapie mit gNO.....	49
5.2.1. Referenzwerte nicht infizierter, nicht therapierter Augen.....	49
5.2.2. gNO-therapierte Augen.....	50
5.2.2.1. Maximale Hornhautdicke.....	50
5.2.2.2. Hypopyonausprägung.....	51
5.2.3. Infizierte, nicht therapierte Augen.....	52
5.2.3.1. Maximale Hornhautdicke.....	52
5.2.3.2. Hypopyonausprägung.....	53

5.2.4. Vergleich der Gruppen.....	54
5.2.4.1. Maximale Hornhautdicke.....	54
5.2.4.2. Hypopyonausprägung.....	55
6. <u>Diskussion</u>	56
6.1. Diskussion der Methodik.....	56
6.1.1. Modell der PDI mit Chlorin e6.....	56
6.1.2. Modell der Therapie mit gNO.....	57
6.1.3. Histologische Aspekte.....	58
6.2. Diskussion der Ergebnisse.....	60
6.2.1. Diskussion der Ergebnisse der PDI mit Chlorin e6.....	60
6.2.2. Diskussion der Ergebnisse der Therapie mit gNO.....	62
6.2.3. Vergleich der Gruppen.....	62
6.3. Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick.....	64
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	65
8. <u>Publikationen</u>	71
9. <u>Danksagung</u>	72

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ca.	circa
CFU	Colony forming units
CXL	Crosslinking
d.h.	das heißt
g	Gramm
h	Stunde
HE	Hämatoxylin Eosin
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PACK	Photoactivated chromophore for infectious keratitis
PDI	Photodynamische Inaktivierung
min	Minuten
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylokokkus aureus</i>
nm	Nanonmeter
NO	Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid
gNO	gaseous Nitric Oxide, gasförmiges Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)

SA	<i>Staphylokokkus aureus</i>
s.c.	subkutan
SD	standard deviation (Standardabweichung)
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
UVA	Ultraviolettstrahlung im Wellenbereich 315-380 nm
v.a.	vor allem
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Zusammenfassung

1.1. Hintergrund und Ziele

Die bakterielle Keratitis zählt weltweit zu einer der häufigsten Erblindungsursachen. Niedriger Hygienestatus und hohes Infektionsrisiko in Entwicklungsländern und der vermehrte Kontaktlinsengebrauch und die damit verbundenen Komplikationen in Industrienationen sind die Hauptgründe für ihr Auftreten. *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* zählen zu den häufigsten Erregern. Der Verlauf einer bakteriellen Keratitis kann von einer leichten Trübung der Hornhaut über Hypopyonbildung bis zur Einschmelzung der Kornea reichen. Sich ausbreitende Antibiotikaresistenzen sorgen für eine zunehmend ineffektivere Therapie oder gar zu Therapieversagen.

Die Photodynamische Inaktivierung findet als Therapie bereits in verschiedenen Bereichen der Medizin Anwendung wie beispielsweise in der Tumorthherapie oder in der Ophthalmologie. Ein durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregter Fotosensitizer führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mit bakterizider Wirkung.

In der Lungenforschung konnte der antibakterielle Effekt von gasförmigem Stickstoffmonoxid hinsichtlich der Therapie von *Pseudomonas aeruginosa* assoziierten Pneumien *in vivo* nachgewiesen werden. Aufgrund der Möglichkeit der Oberflächentherapie könnte dieses Konzept eine weitere neue Möglichkeit der Behandlung bakterieller Keratitiden darstellen.

Ziel dieser Studie war es, erstens die Verringerung der Entzündungsreaktion bei bakterieller Keratitis durch Photodynamische Inaktivierung mit Chlorin e6 und zweitens den anti-inflammatorischen Effekt von gasförmigem Stickstoffmonoxid auf entzündetes Hornhautgewebe nachzuweisen.

1.2. Material und Methoden

Mäuse des Typs C57BL/6 wurden narkotisiert, manuell eine Keratitis mit *Pseudomonas aeruginosa* induziert und 24 Stunden post infectionem in tiefer Anästhesie therapiert. Drei Tage post infectionem wurden die Tiere getötet, die Augen entnommen und histologisch aufgearbeitet.

Eine Versuchsreihe diente zum Nachweis eines entzündungshemmenden Effekts durch die Photodynamische Inaktivierung mit Chlorin e6. Es wurden die Gruppen „nicht infiziert/nicht therapiert“, „infiziert/therapiert“, „infiziert/scheintherapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“ miteinander verglichen. Die Therapie bestand aus einer sechsminütigen Lichttherapie in einer Rotlichtkammer mit Licht der Wellenlänge 670 nm des zuvor mit einer Chlorin e6-haltigen Salbe inkubierten Auges. Für die Scheintherapie wurde eine Salbe ohne Chlorin e6 verwendet. In einer anderen Versuchsreihe wurde der antiinflammatorische Einfluss von gasförmigem Stickstoffmonoxid begutachtet. Es erfolgte eine 30-minütige Begasung der Augen mit Stickstoffmonoxid (200 ppm). Verglichen wurden die Gruppen „nicht infiziert/nicht therapiert“, „infiziert/therapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“.

Die histologischen Präparate wurden anhand der maximalen Hornhautdicke und dem Schweregrad des Hypopyons ausgewertet. Die statistische Testung erfolgte im Sinne einer Inferenzstatistik nach Mann-Whitney-U. Sekundäre Vergleiche wurden rein explorativ durchgeführt, weshalb auf multiples Testen verzichtet wurde. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichung berechnet, das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

1.3. Ergebnisse

In der Versuchsreihe der Photodynamischen Inaktivierung lagen die Werte der maximalen Hornhautdicke infizierter, therapierter Augen im Mittel mit 220 μm (SD = 29 μm) signifikant unter denen infizierter, nicht therapierter Augen mit einem Mittelwert von 290 μm (SD = 33 μm). Auch der Schweregrad des Hypopyons war bei infizierten, therapierten Tieren statistisch bedeutend weniger stark als bei infizierten, nicht therapierten Augen.

Die Therapie mit gasförmigem Stickstoffmonoxid ergab im Vergleich der Gruppen „infiziert/therapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“ hinsichtlich beider Versuchsparameter keine statistisch relevanten Unterschiede.

1.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse der Photodynamischen Inaktivierung mit Chlorin e6 dienen als erster Hinweis dafür, dass diese Therapieform wirken könnte. Sie müssen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet angesehen werden. Das Potential dieser

Therapieform sollte unbedingt ausgeschöpft und in fortlaufenden Studien weiterentwickelt und optimiert werden, um sie möglicherweise in Zukunft in den klinischen Alltag integrieren zu können.

Ein Therapieerfolg war anhand der Therapie mit gasförmigem Stickstoffmonoxid in dieser ersten *in vivo* Studie nicht festzustellen. Dennoch sollte der Ansatz nicht voreilig ad acta gelegt, sondern weiter evaluiert werden.

2. Summary

2.1. Background and objectives

Bacterial keratitis is one of the most common causes of blindness worldwide. The high incidence is due not only to poor standards of hygiene and a greater risk of infection in developing countries but also to the widespread use of contact lenses with related complications in industrial nations. The two main bacterial strains responsible for causing bacterial keratitis are *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The disease can progress from slight corneal opacity to hypopya, through to a corneal meltdown. Due to increasing bacterial resistance to antibiotics, the treatment of bacterial keratitis has become less effective, even resulting in some cases in complete therapy failure. Scientific research into the development of new therapy approaches has thus become essential. Photodynamic inactivation - already in clinical use in tumor therapy and in several ophthalmological therapies - also appears to be promising in the treatment of microbial keratitis. It functions on the principle that the accumulation of a specific photosensitizer in the relevant tissue induces the generation of reactive oxygen species when exposed to light of a specific wavelength. These reactive oxygen species show an antimicrobial effect.

Research on cystic fibrosis has established an antimicrobial effect of gaseous nitric oxide in infections with *Pseudomonas aeruginosa*. As surface treatment is possible in keratitis, this therapy concept appeared to be a feasible approach.

The aim was to prove both the reduction of inflammatory reaction in bacterial keratitis by photodynamic inactivation with chlorine e6 and the anti-inflammatory effect of gaseous nitric oxide on inflamed corneal tissue.

2.2. Material and methods

For the experiments C57BL/6-mice were narcotized, a *Pseudomonas aeruginosa* keratitis was induced manually and 24 hours post-infection the animals were treated in deep anesthesia. Three days post-infection the animals were sacrificed, the eyes enucleated and prepared for histology. For photodynamic inactivation infected eyes were exposed to red light of a wavelength of 670 nm for six minutes after incubation with a chlorin e6-containing ointment.

The four groups ‘uninfected/untreated’, ‘infected/treated’, ‘infected/sham-treated’ and ‘infected/untreated’ were compared. Sham-treated animals underwent the same procedure with a non-chlorin e6-containing ointment.

In treatment with gaseous nitric oxide the cornea was gassed with nitric oxide (200 ppm) for 30 minutes. The groups ‘uninfected/untreated’, ‘infected/treated’ and ‘infected/untreated’ were compared.

Histological sections were evaluated in terms of the maximal corneal thickness and the severity of hypopyon. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney-U-test. Mean values and standard deviation of the mean were calculated, the two-sided level of significance was defined to $p < 0.05$.

2.3. Results

In the photodynamic inactivation series the infected, treated eyes showed values of 220 μm (SD = 29 μm) compared to 290 μm (SD = 33 μm) in the ‘infected/untreated’ group. This represents a statistically significant reduction in inflammation in infected, treated eyes in comparison to infected, untreated eyes. The severity of hypopyon was significantly lower in infected, treated than in infected, untreated eyes.

The gaseous nitric oxide series displayed no significant differences between the ‘infected/treated’ and ‘infected/untreated’ groups.

2.4. Conclusion and prospects

Unfortunately the results of this first *in vivo* study with gaseous nitric oxide provided no indication of any therapeutic success. Nevertheless, this approach should not be prematurely dismissed. Further evaluation appears advisable.

However, the success of photodynamic inactivation with chlorin e6 is substantiated by the two parameters measured and the results presented here can serve as a basis for further investigations with a view to further development and optimization of this approach.

3. Einleitung

3.1. Klinischer Hintergrund

Die vorliegende Arbeit basiert auf Ergebnissen klinisch-experimenteller Studien im Rahmen einer interdisziplinären Zusammenarbeit der Fachbereiche Augenheilkunde, dem Institut für Anatomie und Zellbiologie sowie dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes.

235 Millionen Menschen litten 2010 weltweit an einer Sehbehinderung, 39 Millionen davon waren blind [WHO 2014]. Laut WHO galten 2002 die Katarakt (47,9%), das Glaukom (12,3%), die altersbedingte Makuladegeneration (8,7%), die Hornhauttrübung (5,1%) und die Diabetische Retinopathie (4,8%) als globale Hauptursachen für Erblindung. Als eine der häufigsten Auslöser von Hornhauttrübungen muss die Keratitis somit als eine große Gefahrenquelle für den Verlust des Augenlichts angesehen werden. Hornhautentzündungen können infektiösen und nicht-infektiösen Ursprungs sein. Zu letzterem zählt beispielsweise die Keratitis superficialis punctata bei Sicca-Syndrom. Bakterien, Akanthamoeben, Viren und Pilze sind Verursacher der mikrobiellen Keratitis.

Der Großteil infektiöser Keratitiden sind bakterieller Genese, wobei *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* unter den grampositiven Bakterien deutlich dominieren [Rautaraya et al., 2014]. Im gramnegativen Bereich zählt *Pseudomonas aeruginosa* [Rautaraya et al., 2014] zum vorherrschenden Pathogen.

In Industrienationen stellt die Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* bei Kontaktlinsenträgern [Rasoulinejad et al., 2014] einerseits wegen mangelnder Hygiene und andererseits aufgrund von Pathogenresistenzen gegen diverse Reinigungsmittel eine große Herausforderung an die medizinische Versorgung dar.

Über Mikroläsionen des Hornhautepithels gelangen die Bakterien in die Kornea, immunreaktiv kommt es zur Leukozyteninfiltration mit typischer Entzündungsreaktion. Je nach Läsionstiefe und Immunlage des Patienten folgen Hornhautepithel- oder Stromatrübung, bei tiefer Infiltration ein Anschwellen der Hornhaut durch Verlust der endothelialen Pumpfunktion. Regelmäßig bildet sich ein Hypopyon. Gefürchtetste Komplikation stellt das Ulcus serpens mit Hornhauteinschmelzung und resultierender Descemetotozele oder gar einer totalen

Hornhautperforation binnen weniger Stunden dar, vor allem ausgelöst durch *Streptococcus pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* [Grehn, 2008].

Bislang ist die lokale Antibiotikaapplikation mit Fluorochinolon-Präparaten oder einer Kombination aus Gentamicin und Cefuroxim zur Abdeckung grampositiver und –negativer Erreger klinischer Therapiestandard [Szentmáry et al., 2012]. In einer europaweiten Studie wurde das Bakterienspektrum oberflächlicher Augeninfektionen untersucht und nach den EUCAST-Kriterien (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) auf Antibiotikasensibilität getestet [Sanfilippo et al., 2016]. Ergebnis waren breitgefächerte Resistenzbildungen, die sowohl von getesteten Substanzen und Bakterienspezies, als auch von der geographischen Lage abhängen [Sanfilippo et al., 2016]. Die Antibiotikatherapie wird folglich immer mehr an Effektivität verlieren. Ultima ratio bei Einschmelzungsgefahr ist derzeit die Keratoplastik à chaud, Heilungsdefekte können durch das Aufnähen von Amnionmembran überdeckt und dadurch die Epithelialisierung beschleunigt werden. Bei bleibenden Folgeschäden wie Hornhautnarben findet die Keratoplastik nach Abheilung und Erregerelimination Anwendung. Bei eingetretener Endophthalmitis ist die Prognose jedoch meistens infaust [Grehn, 2008].

3.2. *Staphylokokkus aureus*

Staphylokokkus aureus (SA) ist ein grampositives, haufenbildendes Bakterium und gehört bei ca. der Hälfte der Bevölkerung zur normalen Hautflora. Bei Hautläsionen oder geschwächtem Immunstatus begünstigen Virulenzfaktoren wie Kapsel, Koagulase, Protein A, Clumping Factor, Hämolysin und Leukozidin das Auslösen von Infektionen. Klinische Bilder reichen von Hautmanifestationen mit Abszessbildung über Impetigo contagiosa bis hin zu Endokarditis und Osteomyelitis. Toxic Shock Syndrome und Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, hervorgerufen durch das gleichnamige Toxin bzw. Exfoliatin, sowie die Sepsis mit Multiorganversagen stehen für lebensbedrohliche Komplikationen der Staphylokokkeninfektion [Hahn et al., 2009]. Nosokomiale Infektionen durch Methicillin-resistenten *Staphylokokkus aureus* (MRSA) werden stets präsenster. Die Antibiotikatherapie gestaltet sich durch immer weiter verbreitete Resistenzen zunehmend schwieriger. Eine häufige das Auge betreffende Infektion mit SA ist die Keratitis. Rund die Hälfte dieser Infektionen werden durch einen MRSA verursacht [Chuang et al., 2012]. Bezogen auf das gesamte Erregerspektrum macht *Staphylokokkus aureus* ca. 15% aller bakteriellen Keratitiden aus

[Rasoulinejad et al., 2014] [Aldebasi et al., 2014]. Viele Studien an Mensch und Tier dienen derzeit der Testung von Antibiotikaresistenzen. Laut *in vitro* Studien ist Vancomycin das Antibiotikum erster Wahl gegen den Befall mit MRSA [Chang et al., 2015], auch Tigecyclin erwies sich als effektiv [Romanowski et al., 2016]. Ein weiterer Ansatz ist die Zugabe von anti-entzündlich wirkendem Resolvin E1 zur lokalen Antibiotikatherapie, was sich im Mausmodell als wirksam erwies [Lee et al., 2015]. In Zukunft wird das Ausweichen auf andere Therapieansätze dennoch unerlässlich sein.

3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (PA) ist ein gramnegatives, bewegliches Stäbchenbakterium, mit dem der Mensch aufgrund seines ubiquitären Vorkommens vor allem im feuchten Milieu ständig konfrontiert wird. Als Infektion im ambulanten Bereich sind die schwimmbadassoziierte Otitis externa („swimmers ear“) und die Kontaktlinsenkeratitis zu erwähnen. Nosokomiale Infektionen wie die beatmungsassoziierte *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonie, Wundinfektionen, Katheter assoziierte Harnwegsinfektionen und im schlimmsten Fall Bakteriämie sind vor allem bei Patienten mit herabgesetzter Immunabwehr sehr gefürchtet [Hahn et al., 2009]. Das Immunsystem reagiert bei Infektion unter anderem mit massiver Invasion neutrophiler Granulozyten. Bakterielle Proteasen sind in der Lage, die Immunzellen zu spalten, zudem steigern Pili und Flagellen die Adhärenz an der Wirtszelle und begünstigen somit die Ausbreitung und Vermehrung im Gewebe. Ein weiterer Virulenzfaktor ist der Effluxpumpenmechanismus, welcher maßgeblich an der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen beteiligt ist [Hahn et al., 2009]. Die Wirkung einiger Reinigungslösungen für weiche Kontaktlinsen weist in Bezug auf einige Erreger Mängel auf [Siddiqui et al., 2015]. Da der „Nasskeim“ PA unter anderem zum häufigsten Auslöser Kontaktlinsen assoziierter, ulzerierender Keratitiden zählt [Aldebasi et al., 2014], ist auch in dieser Hinsicht an eine Resistenzbildung zu denken.

In einer *in vivo* Studie infizierte man Kaninchenaugen mit Erregerisolaten aus Patientenhornhäuten, welche zu ¼ PA-Infektionen aufwiesen [Aldebasi et al., 2014]. Antibiotikatestungen zeigten eine Sensitivität der hier eingesetzten PA-Stämme gegenüber Gentamicin und Cefuroxim [Aldebasi et al., 2014], andere Studien verweisen wegen Resistenzen auf Tigecyclin und Vancomycin [Romanowski et al., 2016]. Doch auch das

vermehrte Auftreten von Resistenzen gegen Reserveantibiotika ist unvermeidbar. Somit ist es Aufgabe der Forschung, Alternativen für die Antibiotikatherapie zu schaffen.

3.4. Photodynamische Inaktivierung

Das Prinzip der Photodynamischen Inaktivierung (PDI) wurde bereits vor mehr als 100 Jahren entdeckt [St Denis et al., 2011]. Seine Wirkung beruht auf der photochemischen Reaktion eines Fotosensitizers mit Licht in Verbindung mit Sauerstoff. Der Fotosensitizer wird in das entsprechende Gewebe injiziert oder oberflächlich auf dieses aufgetragen. Durch Licht einer für ihn spezifischen Wellenlänge wird er angeregt und wandelt Sauerstoff zu Reaktiven Sauerstoffspezies, sogenannten ROS (reactive oxygen species) um. Diese ROS besitzen eine zytotoxische Wirkung [Dunnill et al., 2015]. Erste klinische Anwendungen erlangte die PDI in den 1970er und 1980er Jahren im Bereich der Tumorthherapie [Mitton et al., 2008], [St Denis et al., 2011]. Auch in der Augenheilkunde ist dieses Prinzip bereits klinisch etabliert, z.B. in Form des Crosslinkings (CXL) zur Therapie des Keratokonus und der Keratektasie. Durch Auftragen von Riboflavin auf die Hornhaut und Bestrahlung mit UVA-Licht werden beim Crosslinking ROS freigesetzt, welche die Quervernetzung des Kollagens der Stromalamellen stimulieren. Des Weiteren zeigte die PDI antivirale und bakterizide Wirkung [Wainwright, 1998], was in Zeiten der rasanten Verbreitung von Antibiotikaresistenzen für große Aufmerksamkeit sorgt. Vor allem in den Bereichen Dermatologie, Tumorthherapie und auch der Ophthalmologie wird an der PDI als Therapie gegen Infektionen geforscht [Dai et al., 2009]. *In vitro* gilt die bakterizide Wirkung von der Kombination aus Riboflavin und UVA-Licht seit Jahren als bewiesen [Schrier et al., 2009]. Die apoptotische Wirkung der Photodynamischen Inaktivierung mit Riboflavin und UVA-Licht auf humane korneale Keratozyten wurde *in vitro* ausgeschlossen [Stachon et al., 2015]. Dieser Ansatz wurde *in vivo* mehrfach weiterverfolgt [Skaat et al., 2014]. Eine Metaanalyse scheint diesbezüglich erfolgversprechend, fordert jedoch weitere systematische Studien [Papaioannou et al., 2016]. Auch im Rattenmodell hat sich der positive Effekt der PACK-CXL (Photoactivated chromophore for infectious keratitis-Cross-Linking) bereits bestätigt [Tal et al., 2015]. *In vitro* wurde dieser Ansatz durch Kopplung des Riboflavins an Antikörper bzw. Phosphat erweitert, um die Effektivität der Photodynamischen Inaktivierung antibiotikaresistenter Staphylokokken zu erhöhen [Song et al., 2015].

Die PDI wirkt nicht bakterienspezifisch und es gibt keinen Anhalt für Resistenzbildungen, was große Vorteile gegenüber Antibiotika darstellt [Dai et al., 2009]. Ausschlaggebend für die

Wirkung der PDI gegen ein spezifisches Bakterium ist jedoch die Auswahl des jeweiligen Fotosensitizers. Beispiele für Fotosensitizer sind Riboflavin, Methylenblau oder Chlorin e6. In einer *in vitro* Studie über die Therapie der kutanen Leishmaniose stellte sich das Potential von Chlorin e6 in Verbindung mit Licht heraus [Pinto et al., 2016]. Des Weiteren ist Chlorin e6 besonders wirksam im Einsatz gegen *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* [Park et al., 2010]. Ein weiterer Faktor für die Wirksamkeit der PDI ist die Diffusionsfähigkeit des Fotosensitizers im betreffenden Gewebe, welche für Chlorin e6 bereits an Schweinehornhäuten getestet wurde [Winkler et al., 2016].

3.5. Therapie mit gasförmigem Stickstoffmonoxid

Als dem menschlichem Organismus inertes Molekül spielt Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen wie Vasodilatation, Angiogenese und Wundheilung [Ghaffari et al., 2006], [Miller et al., 2013]. Bei Infektionen wird vermehrt gasförmiges Stickstoffmonoxid (gNO) synthetisiert, welches über das Cytokinsystem modulierend in den Abwehrmechanismus gegen Pathogene eingreift [Fang, 1997]. Ein zusätzlicher antimikrobieller Effekt wird dem Molekül über die Zerstörung von Membranlipiden zugeschrieben [Miller et al., 2013]. Die Hautforschung hat bereits vor einigen Jahren damit begonnen, sich die körpereigene bakterizide Wirkung von Stickstoffmonoxid in der Behandlung staphylokokkenassoziierter Wundinfektionen zu Nutze zu machen. *In vivo* Studien an Kaninchen zeigten einen Rückgang der Bakterienzahl bei Begasung staphylokokkeninfizierter Hautwunden mit NO [Ghaffari et al., 2007]. Ein *in vitro* Versuch an humanen Fibroblasten und Keratinozyten gab Grund zur Annahme, dass gNO im Rahmen der Wundheilung weder negative Einwirkungen auf die Apoptose körpereigener Zellen, noch auf die Angiogenese hat [Ghaffari et al., 2007]. Die Forschung an Cystischer Fibrose bewies in einem *in vivo* Modell an Ratten auch eine antimikrobielle Wirkung von gNO: die Inhalation von gNO bei *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonie setzte die Bakterienzahl signifikant herab [Miller et al., 2013]. Da auch die Hornhaut einer Oberflächentherapie gut zugänglich ist, erscheint die Therapie der bakteriellen Keratitis mit gNO vielversprechend.

3.6. Experimentelle Keratitis

In der Literatur sind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Modelle zur Keratitis und deren Therapie zu finden. *In vitro* Studien werden an entnommenen humanen Hornhäuten oder an simulierten Hornhäuten aus humanen Fibroblasten, Extrazellulärmatrix und Matrigel [Rajaiya et al., 2015] durchgeführt.

Experimentelle Studien der *in vivo* Forschung werden meist an Kaninchen, Ratten und Mäusen vorgenommen. Das Kaninchen bietet durch große Bulbi gute Grundvoraussetzungen für Augenforschungszwecke und wird deshalb meist als Versuchstier herangezogen, was die klinische sowie die mikrobiologische Untersuchung der Hornhaut erleichtert. Die vorliegende wissenschaftliche Studie wurde an Mäusen durchgeführt.

Das erfolgreiche Herbeiführen einer Infektion der Hornhaut erfordert die Abstimmung des infizierten Mausstammes mit dem inokulierten Bakterienstamm. Unterschiedliche Favorisierung von T-Zelltypen des Immunsystems von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen führt dazu, dass C57BL/6-Tiere eine deutlich höhere Anfälligkeit gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen [Hazlett et al., 2000]. Zudem sind Alter und Geschlecht der Tiere sowie die jeweiligen Virulenzfaktoren des eingesetzten Bakterienstamms zu berücksichtigen. *Staphylococcus aureus* ruft bei alten BALB/c-Tieren eine vielfach stärkere Keratitis hervor als bei jungen Tieren desselben Stamms. Alte C57BL/6-Tiere weisen nur eine moderate, junge C57BL/6 keinerlei Zeichen einer Hornhautentzündung auf [Girgis et al., 2004], d.h. alte Tiere sind anfälliger als junge.

Neben der Eruiierung optimaler Grundvoraussetzungen ist der Infektionsmechanismus ein weiterer Faktor für das standardisierte Auslösen von Keratitiden. Man unterscheidet drei Vorgehensweisen: die intrastromale Injektion einer festgelegten Menge Bakteriensuspension beispielsweise durch „Microneedle Injection“ [Ren et al., 2010], [Matthaei et al., 2012], das manuelle Einritzen („Scratching“) des Hornhautepithels durch eine Nadel mit anschließendem Auflegen einer mit dem Erreger kontaminierten Kontaktlinse oder Pipettieren der Bakteriensuspension auf die zugeführten Mikroläsionen. Schweregrad sowie Verlässlichkeit der Infektionsauslösung durch oben genannte Verfahren sind in absteigender Reihenfolge angegeben [Ren et al., 2010]. Die Bakterienlast der Suspension sowie das injizierte bzw. applizierte Volumen muss auf die Versuchstierart angepasst und standardisiert sein [Ren et al., 2010]. Die Auswertung erfolgt meist nach drei Gesichtspunkten: klinisch durch Spaltlampenuntersuchung, histologisch anhand Schnittanalysen meist in Hämatoxylin-Eosin bzw. immunhistochemischen Färbungen und mikrobiologisch an CFU-Daten. Eine klinische

Untersuchung wird bevorzugt an den Tagen 1,3,5,7,9 post infectionem durchgeführt. Die histologische und mikrobiologische Auswertung erfolgt entsprechend am Tage der Euthanasie [Girgis et al., 2003].

3.7. Hypothesen

Der vermehrte Gebrauch weicher Kontaktlinsen, Stoffwechselerkrankungen sowie durch Immunsuppressiva hervorgerufene Abwehrschwäche machen die bakterielle Keratitis auch in Industrienationen zu einem Thema aktueller Brisanz. Die Aggressivität der Erkrankung und die Resistenzentwicklung mit Folge einer immer eingeschränkteren medikamentösen Abdeckung durch Antibiotika verlangen nach der Entwicklung neuer Therapien.

Durch Chlorin e6 und Rotlicht provozierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wirken antimikrobiell. Die Photodynamische Inaktivierung erscheint somit auch als Therapie der infektiösen Keratitis vielversprechend. Diesen Ansatz heißt es zu verfolgen und weiterzuentwickeln, um ihn möglicherweise in den klinischen Alltag integrieren zu können.

Die Ergebnisse zur Behandlung bakterieller Infektionen mit gNO aus der Pulmologie und Dermatologie sind ebenfalls von großem Wert. Eine Übertragung auf das Auge ist denkbar.

Die vorliegende Arbeit dient der Beteiligung an der Forschung für neue Therapieansätze bakterieller Keratitiden mit folgenden Hypothesen:

- 1) Photodynamische Inaktivierung mit Chlorin e6 verringert die Entzündungsreaktion
- 2) Die Begasung mit Stickstoffmonoxid hat einen anti-inflammatorischen Effekt

Ziel dieser Studie war die Verifizierung oben genannter Sachverhalte im Mausmodell. Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der histologischen Ergebnisauswertung.

4. Material und Methoden

4.1. Versuchstiere

Die experimentellen Versuche wurden an C57BL/6-Mäusen vorgenommen. Für die gNO-Versuche lag das Alter der Tiere zwischen 9-12 Wochen. Die Mäuse der PDI-Experimente waren zwischen 3-20 Monaten alt. Die Versuchstiere wurden von Janvier (Janvier Labs, Saint-Berthevin Cedex, France) käuflich erworben.

Für diverse Vorversuche zur Optimierung der Infektionsparameter wurden BALB/c-Mäuse von Charles River (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) und C75BL/6-Tiere des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes beiderlei Geschlechts und verschiedener Altersklassen bezogen.

Der Antrag für die tierexperimentellen Versuche wurde vom Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Tierversuchsnummern: 58/2013 und 20/2015).

Die Tiere wurden in IVC-Käfigen (individually ventilated cages, Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland) mit freiem Zugang zu Futter (Altromin, Lage, Deutschland) und Trinkwasser gehalten.

Drei Tage vor Versuchsdurchführung wurden die Tiere in den S2-Tierstall des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Universität des Saarlandes gebracht, wo unter der Leitung von Prof. Dr. M. Bischoff die Infektions- und Therapiedurchführung stattfand. Zuvor wurden die Tiere im Tierstall des Instituts für Klinische und Experimentelle Chirurgie der Universitätsklinik Homburg/Saar untergebracht.

4.2. Optimierung der Infektion

Die Etablierung und Standardisierung einer reproduzierbaren Infektion der Hornhaut verlangte eine Reihe von Vorversuchen. Hierbei wurden Mausstamm, -alter und -geschlecht, Bakterienstamm, Bakteriensuspension und Invasivität des Infektionsverfahrens variiert und einander angepasst. Eine zuerst angestrebte Infektion durch *Staphylokokkus aureus* war sowohl bei C57BL/6 als auch bei BALB/c Mäusen nicht oder nur in unzureichendem Maße möglich, weshalb bei weiteren Versuchen auf *Pseudomonas aeruginosa* als auslösendes Agens

gewechselt wurde. Aus Bakteriensuspensionen zielführend mit Optischer Dichte (OD) von 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 kristallisierte sich eine OD von 10 als heraus. Die Penetration der Hornhaut durch das Bakterium wurde durch Einritzen und Auftragen der Bakteriensuspension erreicht. Eine Verstärkung der Penetration durch Unterbrechung des Tränenfilms mit Acetylcystein zeigte keine relevante Veränderung.

4.3. Mikrobiologische Aufbereitung der Bakteriensuspension

Für das Inokulum wurden multiresistente *Pseudomonas aeruginosa* (Stamm PA54, Isolate aus humanen Infektionen, gesammelt 2009 im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland. Ermittlung des Resistenzprofils von PA54 anhand des automatisierten VITEK 2 Systems (bioMérieux GmbH, Nürtingen, Deutschland)) 24 Stunden auf Blutagarplatten (Trypticase Soy Agar II, 5% Schafblut; BD GmbH, Heidelberg, Deutschland) kultiviert (37°C). Diese wurden anschließend für eine Nachtkultur (37°C) in 10 ml 2%iger Luria Bertani Broth (LB) (Difco LB Broth, BD Saint Egrève, Frankreich) suspendiert. Anschließend wurden 100 µl der Nachtkultur in 10 ml 2%iger LB verdünnt und weitere drei Stunden kultiviert (37°C). Für die Infektion wurde die Bakteriensuspension schließlich mithilfe eines Photometers auf eine Optische Dichte von 10 bei einer Wellenlänge von 600 nm ausgeglichen.

4.4. Narkotisierung, Schmerztherapie und Allgemeinzustand der Tiere

Eine Narkotisierung der Tiere erfolgte für die Infektion, Therapie und vor Tötung mit anschließender Entnahme der Augen. Zu Beginn wurde eine intraperitoneal (i.p.) verabreichte Narkose mit Ketamin (Ursotamin, 50 mg/kg KG, Serumwerk Bernburg, Deutschland) und Xylazin (10 mg/kg KG, BAYER, Leverkusen, Deutschland) verwendet. Im Verlauf fand ein Wechsel zu einer vollantagonisierbaren Narkose (Tab.1) statt. Diese war schonender für die Tiere und gewährte größere Flexibilität in der Anwendung bezüglich des Therapiezeitpunktes und der Therapiehäufigkeit. Die Narkose (Fentanyl, Midazolam, Medetomidin) wurde i.p. in einer Dosierung von 0,1 ml/10 g injiziert. Eine chirurgische Toleranz trat nach ca. 15 Minuten ein und hielt für eine Dauer von 1 ¼ Stunden an. Bei Bedarf konnte 1/3 der Ausgangsdosis

nachappliziert werden. Das Antidot (Naloxon, Flumazenil, Atipamezol) wurde subkutan gespritzt, um ein zu schnelles Anfluten mit schockartigem Erwachen zu verhindern.

Während jeder Narkose wurde das jeweils nicht zu infizierende bzw. gesunde Auge durch eine Salbenapplikation (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, BAYER, Leverkusen, Deutschland) vor Austrocknung geschützt.

Des Weiteren erhielt jedes Tier täglich ein i.p. verabreichtes Schmerzmittel (Rimadyl®; Zoetis Schweiz GmbH, Zürich, Schweiz).

Vor der Infektion sowie im Versuchsverlauf bis zur Euthanasie wurden die Tiere täglich gewogen und klinisch inspiziert. Das Gewicht diente als Detektionsparameter für eine Verschlechterung des Allgemeinzustands und eventuell resultierender vorzeitiger Tötung des Tieres, um unnötiges Leiden zu verhindern.

Tabelle 1: Wirkstoffe und Dosierung der vollantagonisierbaren Narkose für Mäuse.

Dosierung	Wirkstoffe
<i>Narkose</i>	
0,05 mg/kg	Fentanyl-hameln, 50 µg/ml, hameln pharma plus GmbH, Hameln, Deutschland
5 mg/kg	Midazolam-hameln, 5 mg/ml hameln pharma plus GmbH, Hameln, Deutschland
0,5 mg/kg	Medetomidinhydrochlorid 1 mg/ml, Orion Pharma, Ravensburg, Deutschland
<i>Antidot</i>	
1,2 mg/kg	Naloxon Inresa 0,4 mg, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg Deutschland
0,5 mg/kg	Flumazenil Inresa 0,5 mg, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
2,5 mg/kg	Atipamezolhydrochlorid 5 mg/ml, Orion Pharma, Espoo, Finnland

4.5. Infektionsvorgang

Die Infektion erfolgte durch manuelles Einritzen des Hornhautepithels unter lichtmikroskopischer Sicht mit einer 27 Gauge Injektionsnadel. Drei ca. 2 mm lange „Scratches“ wurden parallel im Zentrum der Kornea platziert, um eine Eintrittspforte zu schaffen. Anschließend wurden 5 µl der Bakteriensuspension aufgetragen [Modifizierung nach Girgis et al., 2004]. Durch die Narkose waren die Augen geöffnet, sodass der aufpipettierte Tropfen bis zum Erwachen der Tiere auf der Hornhaut sistierte. 20 Minuten nach Inokulation wurden die Tiere durch Antagonisierung des Narkotikums erweckt. Erwünscht war das Erreichen einer deutlichen Opazität der Kornea 24 Stunden post infectionem, um eventuell eintretende Therapieerfolge klar von nicht therapierten Tieren abgrenzen zu können.

4.6. Photodynamische Inaktivierung mit Chlorin e6

Den narkotisierten Mäusen wurde eine Chlorin e6-haltige Salbe auf Basis eines halbsynthetischen Polymers namens Hydroxypropylmethylcellulose (APOCARE Pharma GmbH, Bielefeld, Deutschland) auf die jeweils infizierte Kornea aufgetragen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Einwirkzeit des Fotosensitizers in einer Dunkelkammer, um eine ausreichende Penetration des Gewebes zu ermöglichen. Nach Entfernen von Überständen durch einen Watteträger wurde die Maus in einer beidseits offenen Plastikröhre fixiert und seitlings in der Lichtkammer gelagert (Abb. 1). Die Verweilzeit in der Rotlichtkammer betrug sechs Minuten bei einer Wellenlänge von 670 nm. Dies entspricht einer Energiedosis von 24 J/cm². Die genannten Schritte wurden sofern möglich in absoluter Dunkelheit, zumindest jedoch in abgedunkelten Räumen durchgeführt, um eine vorzeitige Aktivierung des Fotosensitizers weitestgehend auszuschließen.

Die Erhebung von Gewicht und Inspektion der Augen mithilfe einer Spaltlampe (siehe 4.9.2.) erfolgte jeweils vor der Infektion, sowie 24 Stunden und 48 Stunden post infectionem. Eine grafische Übersicht zum zeitlichen Ablauf der PDI ist Abb. 2 zu entnehmen.

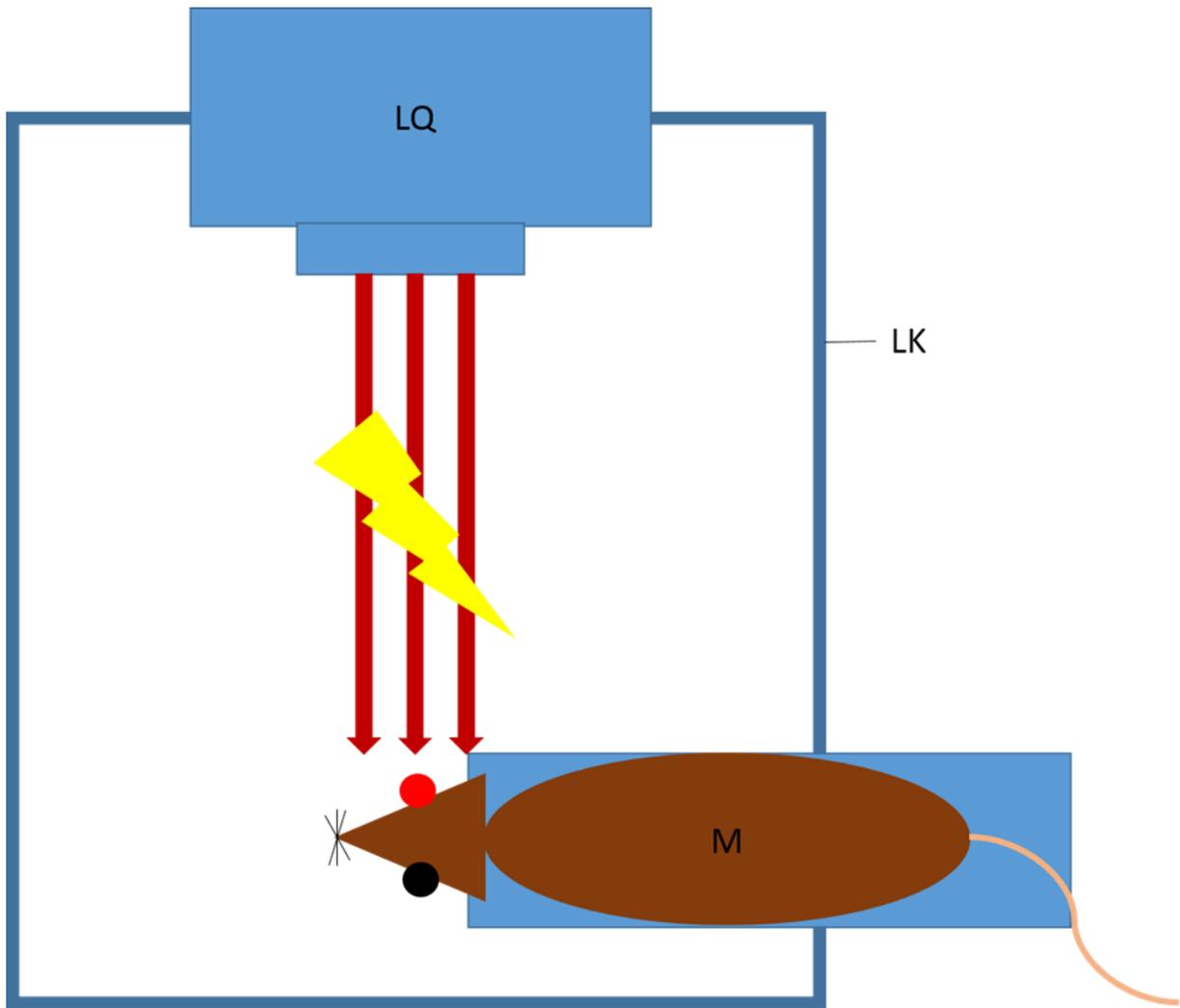


Abb. 1: Versuchsaufbau der PDI. LK = Lichtkammer, LQ = Lichtquelle, M = Maus

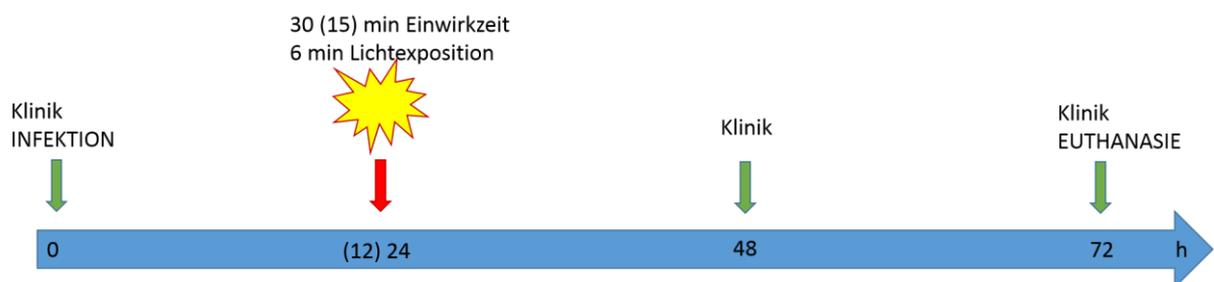


Abb. 2: Übersicht des zeitlichen Ablaufs der PDI. „Klinik“ beschreibt die Erhebung von Gewicht und Inspektion der Augen mithilfe einer Spaltlampe jeweils vor der Infektion, sowie 24h und 48h post infectionem.

Aufgrund nicht vorhandener Literatur zur Anwendung der PDI in diesem Bereich bestand die Notwendigkeit zur Etablierung eines bestmöglichen Therapiekonzeptes. Hierfür mussten folgende Parameter mehrmals variiert werden: Therapiezeitpunkt, Konzentration des Chlorin e6 der Fotosensitizer-Salbe und deren Einwirkzeit, prätherapeutische Entfernung des Hornhautepithels zur Erleichterung der Penetration des Fotosensitizers in das Gewebe und die Häufigkeit der Therapieanwendung.

Genannte Veränderungen beanspruchten mehrere Versuchsreihen mit verschiedenen Gruppen. Die Kontrolltiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: „infiziert/nicht therapiert“ und „infiziert/scheintherapiert“. Die Scheintherapie unterschied sich von der PDI lediglich in der Verwendung einer Salbe, welche keinen Fotosensitizer enthielt (Hydroxypropylmethylcellulose-Basis). Alle Tiere wurden mit gleicher Häufigkeit anästhesiert.

Nachstehende Tabelle gibt eine Übersicht über die Versuchsgruppen. Trotz unterschiedlicher Versuchsparameter innerhalb der einzelnen Gruppen wurden in der Auswertung die Ergebnisse jeweils zu den Gruppen „infiziert/therapiert“, „infiziert/scheintherapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“ zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht der Gruppen der PDI-Versuchsreihe mit zugehörigen Therapieparametern. Der Therapiezeitpunkt bezieht sich auf Stunden (h) post infectionem. I/T = „infiziert/therapiert“, I/ST = „infiziert/scheintherapiert“ (Verwendung einer Salbe ohne Chlorin e6, anschließende Lichtexposition), I/NT = „infiziert/nicht therapiert“, NI/NT = „nicht infiziert/nicht therapiert“.

Gruppe	n	Epithelentfernung	Therapieparameter			
			Zeitpunkt	Häufigkeit	cChlorin e6	Einwirkzeit Salbe
I/T	1	nein	24 h	1 x	0,1%	15 min
	3	nein	24 h	1 x	0,1%	30 min
	6	ja	24 h	1 x	0,1%	30 min
	1	nein	12 h	1 x	0,1%	30 min
	1	nein	12 h, 24 h	2 x	2,0%	30 min
I/ST	2	nein	12 h, 24 h	2 x	-	30 min
	6	ja	24 h	1 x	-	30 min
I/NT	4	nein	-	-	-	-
NI/NT	6	nein	-	-	-	-

4.7. Therapie mit gasförmigem Stickstoffmonoxid

Bei dieser Therapieform wurden die infizierten Augen mit gasförmigem Stickstoffmonoxid (gNO) begast. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Anflutung von Stickstoff vor der Kornea unter gleichzeitiger Sicherung der Atemluft für das Tier liegen zwei Entwürfe für den Versuchsaufbau vor:

Theoretischer Versuchsaufbau Nr.1

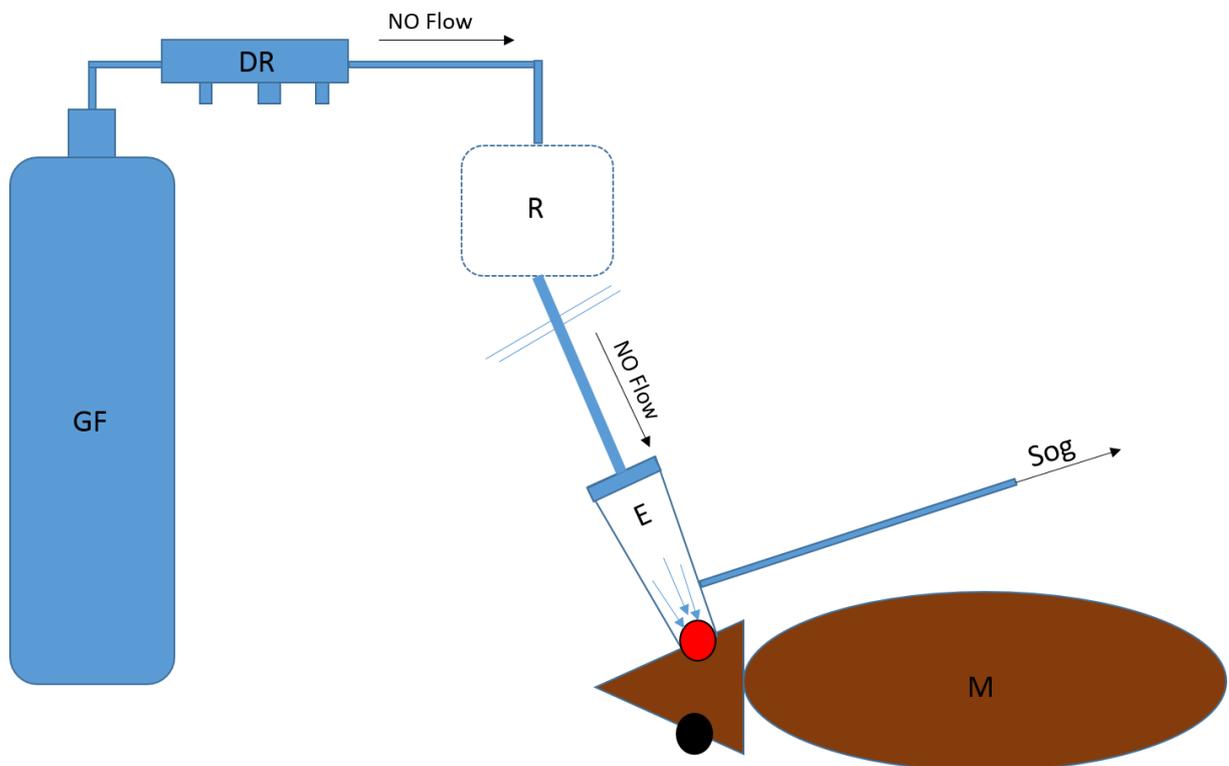


Abb. 3: Theoretischer Versuchsaufbau der gNO-Therapie. GF = Gasflasche, DR = Druckregler, R = NO-Reservoir, E = Eppendorf-Gefäß mit abgeschnittener Spitze, M = Maus. Das Gas gelangt über ein Schlauchsystem in eine Eppendorf-Tube. Ein vorgeschalteter Reservoirbeutel sichert eine ausreichende Gasakkumulation. Durch Entfernung der Spitze des Eppendorfgefäßes kann es über das Auge gestülpt werden. Die Perforation des Gefäßes mit einer Kanüle, an welche ein leichter Sog angeschlossen wird, sorgt für einen kontinuierlichen Gasaustausch.

Theoretischer Versuchsaufbau Nr. 2

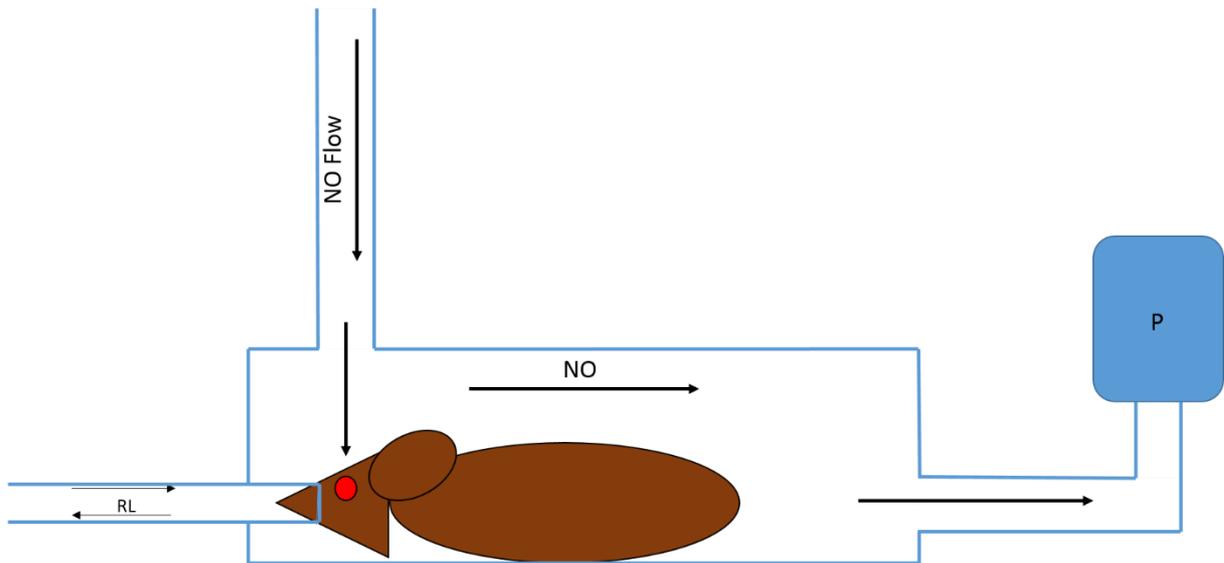


Abb. 4: Theoretischer Versuchsaufbau gNO-Therapie. RL = Raumluft, NO = gasförmiges Stickstoffmonoxid, P = sogerzeugende Pumpe.

Die Maus wird in einer gNO-gefluteten Kammer gelagert. An die Kammer ist eine Pumpe angeschlossen, die einen kontinuierlichen Gasfluss bewirkt. Ein Schlauch, der luftdicht um die Schnauze des Tiers liegt, stellt die Atemluftzufuhr sicher und verhindert gleichzeitig die Inspiration des gasförmigen Stickstoffmonoxids.

Beide Modelle waren mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht realisierbar. Probleme stellten die Größe der Augen der Tiere sowie der geringe Abstand zwischen Augen und Schnauze dar. Eine stabile Versuchsausrüstung konnte in der Praxis nicht umgesetzt werden.

Folglich wurde ein dritter Versuchsaufbau entworfen, bei dem ein Kompromiss zwischen ausreichender Atemluftzufuhr und gNO-Anreicherung eingegangen werden musste.

Die Gasflasche wurde an einen Druckregler angeschlossen, dieser wiederum über ein Schlauchsystem mit einem 5-Wege Metall Luftabsperrhahn (Aquaristikbedarf) verbunden. Die Tiere wurden narkotisiert auf der Seite gelagert, das jeweils infizierte Auge wurde mit einem Abstand von ca. 1 cm vor einem der fünf Absperrhähne platziert (Abb. 5). Die einmalige Therapie wurde 24 Stunden nach Infektion für 30 Minuten, bei einem Druck von 1 bar durchgeführt. Das NO-Gasgemisch hatte eine NO-Konzentration von 200 ppm, als Trägergas diente Stickstoff (Praxair, Düsseldorf, Deutschland). Pro Therapiezyklus wurden maximal drei Tiere behandelt. Mögliche negative Einflüsse auf die Tiere aufgrund vermehrter Anreicherung von Stickstoff in der Raumluft wurden durch eine eigens hierfür angefertigte Abluftkonstruktion unterbunden. Ein Schlauchsystem wurde an den Raumluftabzug des Labors angeschlossen und dessen Öffnung in unmittelbarer Nähe der Tiere platziert (Abb. 6).



Abb. 5: Lagerung der Tiere während gNO-Therapie.

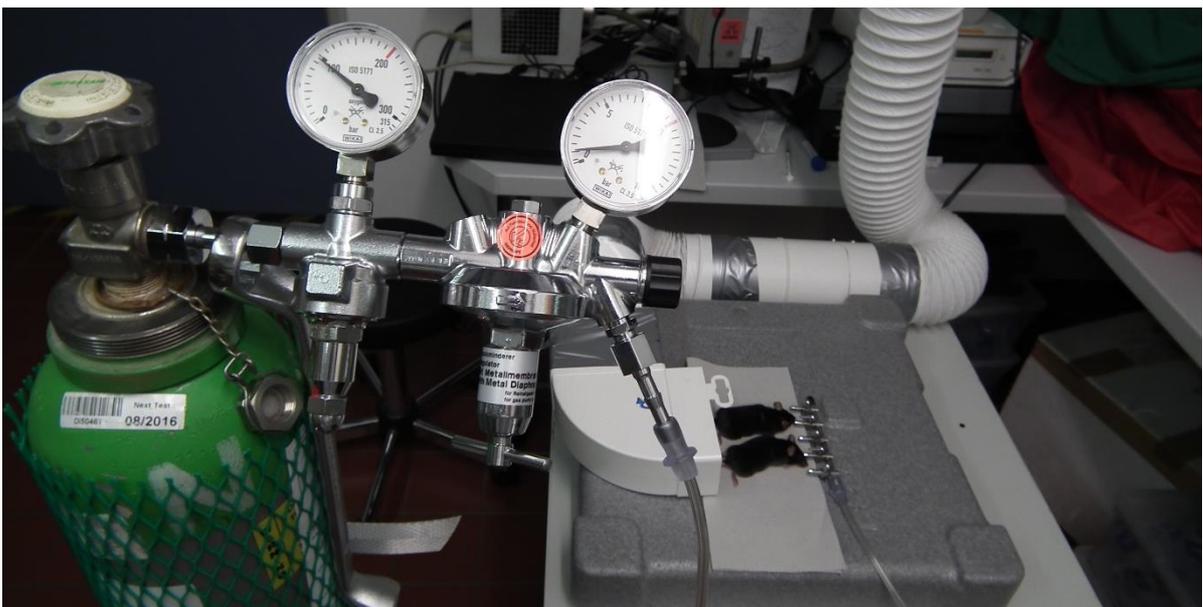


Abb. 6: Versuchsaufbau der gNO-Therapie.

Der Tötungszeitpunkt wurde auf drei Tage post infectionem festgesetzt. Lediglich zwei der therapierten Tiere wurden nach sieben Tagen getötet, um einen längerfristigen Verlauf verfolgen zu können. Eine genaue Auflistung der Versuchsgruppen kann Tabelle 3 entnommen werden.

Um einen schädlichen Einfluss der Begasung von Hornhäuten mit Stickstoff auszuschließen, wurden vor Beginn der Versuchsreihe gesunde Augen dreier weiblicher, fünf Monate alter C57BL/6-Mäuse therapiert. Nach zwei Tagen wurden die Tiere getötet. Zwei Augen wurden histologisch begutachtet, eines mikrobiologisch. Negative Auswirkungen der gNO-Therapie auf das gesunde Auge konnten ausgeschlossen werden.

Für die Kontrolle wurde von einer Scheintherapie in Form der Begasung infizierter Augen mit Raumluft abgesehen. Das Einwirken der Raumluft auf das durch Narkotisierung geöffnete Auge wurde als äquivalent betrachtet.

Tabelle 3: Übersicht der Gruppen der gNO-Versuchsreihe und zugehörige Therapieparameter. Der Therapiezeitpunkt bezieht sich auf Stunden (h) post infectionem. I/T = „infiziert/therapiert“, I/NT = „infiziert/nicht therapiert“, NI/NT = „nicht infiziert/nicht therapiert“.

Gruppe	n	Therapieparameter				Euthanasie
		Zeitpunkt	Häufigkeit	Dauer	Druckregulation	
I/T	9	24 h	1 x	30 min	1 bar	Tag 3
	2	24 h	1 x	30 min	1 bar	Tag 7
I/NT	7	-	-	-	-	Tag 3
	1	-	-	-	-	Tag 7
NI/NT	2	-	-	-	-	Tag 3
	4	-	-	-	-	Tag 7

4.8. Histologische Aufarbeitung der Präparate

Die Fixierung der Augenpräparate erfolgte in Davidson-Solution (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) für 4-6 Stunden auf dem Rüttler und anschließender Verweildauer in 70%igem Isopropanol (ISO) für mindestens 12 Stunden. Im Rahmen der Einbettung wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (ISO 70%, 80 %, 96%, 99%) entwässert. Die vollständige Entwässerung wurde durch Methylbenzoat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) erreicht. Es folgte Durchtränkung in Paraffin (Paraplast®, Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland) und Paraffineinbettung im Blöckchen mit dem Sehnerv als posterioren Orientierungspunkt.

Aufgrund der geringen Größe der Augenpräparate und zusätzlicher Schrumpfung durch die Fixierung gestaltete sich das Erstellen von vergleichbaren histologischen Schnitten schwierig. Ziel der Schnittführung war die Aufnahme mehrerer Längsschnitte durch die zentrale Kornea. Um ein solches Schnittschema zu etablieren, wurden im Rahmen von Präexperimenten gesunde Augen von C57BL/6-Tieren in Schnittabständen von 50 μm und einer Schnittdicke von 5 μm komplett durchgeschnitten. Es ergaben sich übereinstimmende Werte einer Pupillenweite von ca. 1000 μm . Daraus resultierte ein Schnittschema bei dem ab Öffnung der Iris der erste Schnitt aufgenommen wurde. Es folgte die Aufnahme drei weiterer Schnitte mit je 100 μm Abstand zum vorherigen Schnitt. Der erste Objektträger enthält somit die Schnitte mit den Distanzen 0 μm , 100 μm , 200 μm , 300 μm zur Irisöffnung. Ab 400 μm Abstand zur Irisöffnung wurden fünf Schnitte im Abstand von je 50 μm auf einen zweiten Objektträger aufgenommen. Demnach enthält Objektträger Nr. 2 die Schnitte mit den Abständen 400 μm , 450 μm , 500 μm , 550 μm , 600 μm zur Irisöffnung. Bei einer Pupillenweite von ca. 1000 μm liegen die fünf Schnitte der Augenmitte auf Objektträger Nr. 2, wobei Schnitt Nr. 3 im Idealfall den zentralen Schnitt repräsentiert (Abb. 7). Die Präparate wurden am Mikrotom (LKB Rotationsmikrotom Historange 2218) mit einer Glasklinge (Ralph Knives, Plano, G335, Glas für die Histologie, 25 mm) und einer Schnittdicke von 5 μm geschnitten. Für die Auswertung dienten die fünf zentralen Schnitte des zweiten Objektträgers.

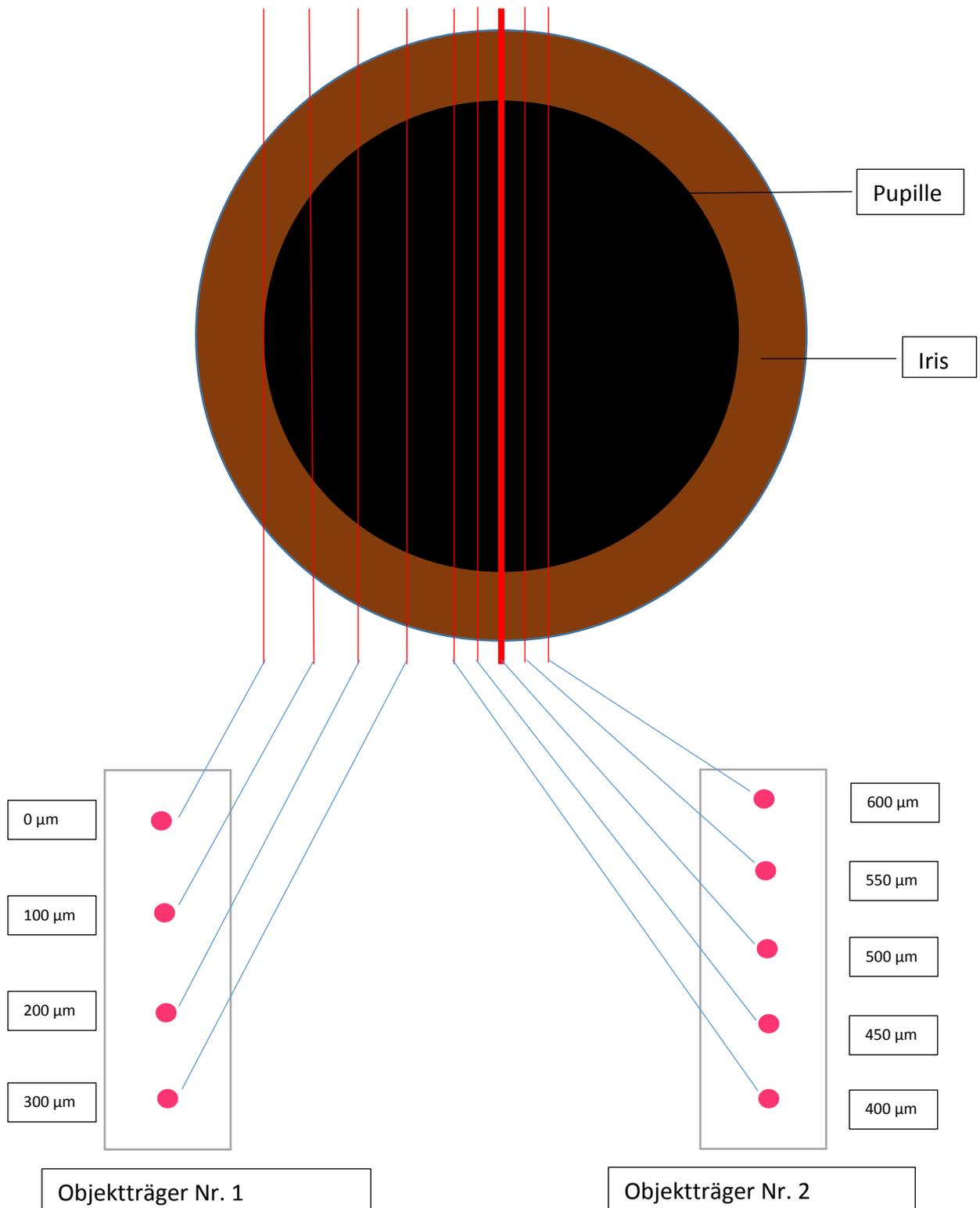


Abb. 7: Schnittschema. Objektträger Nr. 1.: vier Schnitte mit einem Schnittabstand von je 100 µm ab Irisöffnung; Objektträger Nr. 2: fünf zentrale Schnitte mit einem Schnittabstand von je 50 µm. Die Längenangaben beziehen sich auf die Distanz ab Irisöffnung. Die Schnittdicke beträgt 5 µm.

4.9. Auswertung

Die Versuche wurden mikrobiologisch und histologisch ausgewertet. Ergänzend wurde der klinische Verlauf berücksichtigt. Diese Arbeit fokussiert sich auf die histologische Auswertung. Der mikrobiologische Aspekt wird nur grob erläutert. Er wurde in einer Arbeit von Herrn Ming-Feng Wu genau aufgearbeitet.

4.9.1. Mikrobiologische Auswertung

Die entnommenen Augen wurden im Ganzen in 1 ml 2% Luria Bertani Broth (Difco™ LB Broth, Lennox (LB-L), Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) homogenisiert. Das Homogenisat wurde zehnfach in Reihe in 2% LB verdünnt und anschließend auf Blutagar (Trypticase™ Soy Agar, 5% Schafblut, BD, Heidelberg, Deutschland) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C wurden die CFU gezählt.

4.9.2. Klinische Untersuchung, Gewichtskontrolle

Vor der Infektion wurden die Tiere gewogen, klinisch inspiziert und fotodokumentiert, um bereits bestehende Hornhautschäden bzw. andere Krankheitserscheinungen ausschließen zu können. Eine tägliche Gewichtserfassung diente als Detektionsparameter für eine Verschlechterung des Allgemeinzustands. Die klinische Einstufung der Infektion wurde mithilfe eines Scores (siehe Tab. 4) anhand des Sichtbefunds mit der Spaltlampe (SL-17 Hand-held portable slit lamp, Kowa Company. Ltd., Nagoya, Japan) festgemacht.

Tabelle 4: Klinischer Score der Infektion der Kornea. Der Score wurde mithilfe einer Spaltlampe erhoben.

Score	Befund der Hornhaut
0	gesamte Kornea klar, keine Anzeichen einer Infektion
1	< 50% der Kornea semi-transparent (Iris hinter der Läsion noch sichtbar)
2	> 50% der Kornea semi-transparent
3	< 50% der Kornea opak (Iris hinter der Läsion nicht sichtbar)
4	> 50% der Kornea opak
5	spontane Perforation der Kornea oder Phthisis bulbi

4.9.3. Histologische Auswertung

Aufgrund individueller Schwankungen der Pupillenweite wurden in der Auswertung der zentrale, sowie die zwei jeweils rechts und links benachbarten Schnitte (Abb. 7) ausgewertet. Als Endwert wurde der Mittelwert dieser Ergebnisse herangezogen. Die für die Messung verwendeten Bilder wurden mithilfe einer Software (Olympus Soft Imaging System .slide 1.2) am Mikroskop (Olympus BX51, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einer Kamera aufgenommen und anschließend mit einem Computerprogramm (cellSens Standard 1.8.1, OLYMPUS Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) ausgemessen.

Als Auswertungsparameter wurden die maximale Hornhautdicke und der Ausprägungsgrad eines Hypopyons gewählt. Für die PDI-Versuchsreihe wurden des Weiteren die von Neutrophilen infiltrierten Hornhautareale mit der Gesamtfläche der Hornhaut in Relation gesetzt. Dieser Ansatz erwies sich jedoch als nicht wegweisend und wurde für die Auswertung der gNO-Versuche nicht weiter verfolgt. Es fand zudem eine deskriptive Dokumentation aller Schnitte statt.

a) Hornhautdickenmessung

Die Messung der Hornhautdicke diente als Maß für die Ödemausbildung und der Neutrophileninvasion in das Hornhautstroma. Im Rahmen der Methodenetablierung wurden anfangs zwei verschiedene Messungen vorgenommen: eine Dickenmessung der zentralen Kornea sowie eine eines peripheren Hornhautanteils. Um das Zentrum der Kornea zu ermitteln, wurde der Abstand der Ziliarkörper halbiert, davon ausgehend das Lot bis zum Endothel gezogen und in dessen Verlängerung die Distanz zwischen Endothel und Epithel gemessen. Im Falle eines zerstörten Epithels wurden die äußeren Stromalamellen als Referenzpunkt herangezogen. Dieses Verfahren warf zwei grundlegende Probleme auf: durch Verformung des Bulbus während der Fixierung war das Hornhautzentrum anhand des genannten Vorgehens nur mit Einschränkungen zu erfassen. Der zweite Nachteil ergab sich durch das peripher dominierende Infektionsschema: eine zentrale Messung beinhaltete häufig nicht die Erfassung des Hauptinfektionsorts. Genannte Gründe bekräftigten das Ausweichen auf eine Messung des jeweiligen Maximums der Hornhautdicke, um die Registrierung der massivsten entzündlichen Veränderungen sicherzustellen (Abb. 8).



Abb. 8: Messverfahren der maximalen Hornhautdicke am Beispiel eines infizierten Auges.

b) Ausprägung eines Hypopyons

Jeder Schnitt wurde bezüglich des Vorhandenseins bzw. Nicht-Vorhandenseins eines Hypopyons bewertet. Dabei wurden Schweregrade von 0 bis 3 unterschieden (Tab. 5).

Abbildung 9 zeigt Referenzbilder zur Bewertung der Ausprägung eines Hypopyons nach eben genannter Schweregradeinteilung.

Tabelle 5: Schweregrade des Ausmaßes eines Hypopyons.

Schweregrad	Beschreibung
0	Kein Hypopyon
1	Leichtes Hypopyon
2	Starkes Hypopyon
3	Massives Hypopyon

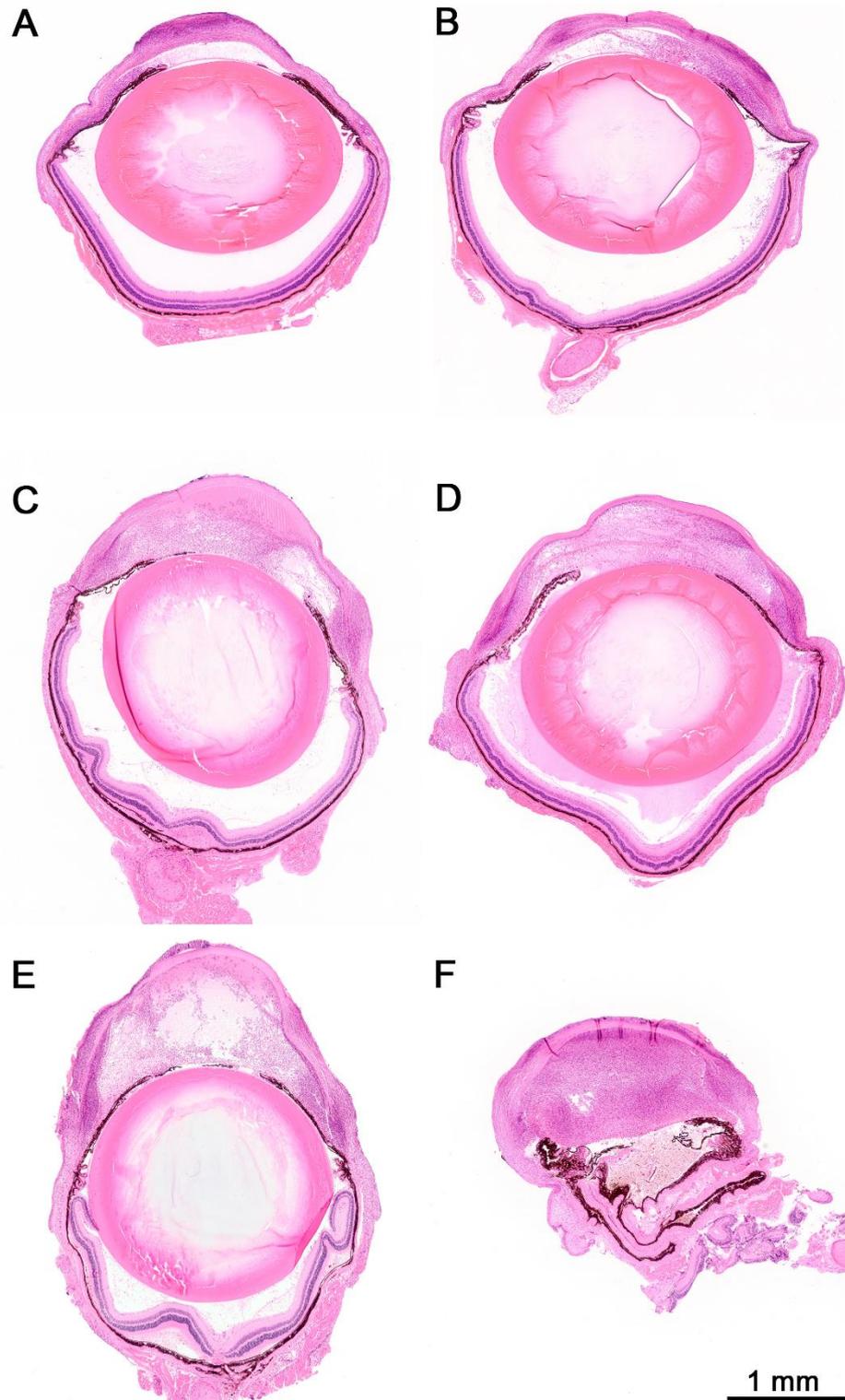


Abb. 9: Referenzbilder für die Schweregrade der Hypopyonausprägung. **A, B** weisen einen Schweregrad von 1 auf. **C, D** gelten als Referenz für Schweregrad 2. **E, F** wurden mit Schweregrad 3 klassifiziert. Die Linse des Auges von **F** ist bei Augenentnahme verloren gegangen.

c) Infiltrierter Hornhautanteil

Dieser Messparameter gibt den relativen Anteil der entzündlich infiltrierten Areale gemessen an der Gesamtfläche der Hornhaut wieder. Hierfür wurde mithilfe der Computersoftware durch Umrandung der Hornhaut deren Fläche berechnet. Anschließend wurden abgrenzbar infiltrierte Flächen nach gleichem Vorgehen ermittelt. Die Genauigkeit der Abgrenzung alternierte zwischen klar abgrenzbaren Bereichen über Konfluktationen bis hin zu kontinuierlicher Infiltration der gesamten Kornea. Eine rein objektive Bewertung war demzufolge nicht möglich.

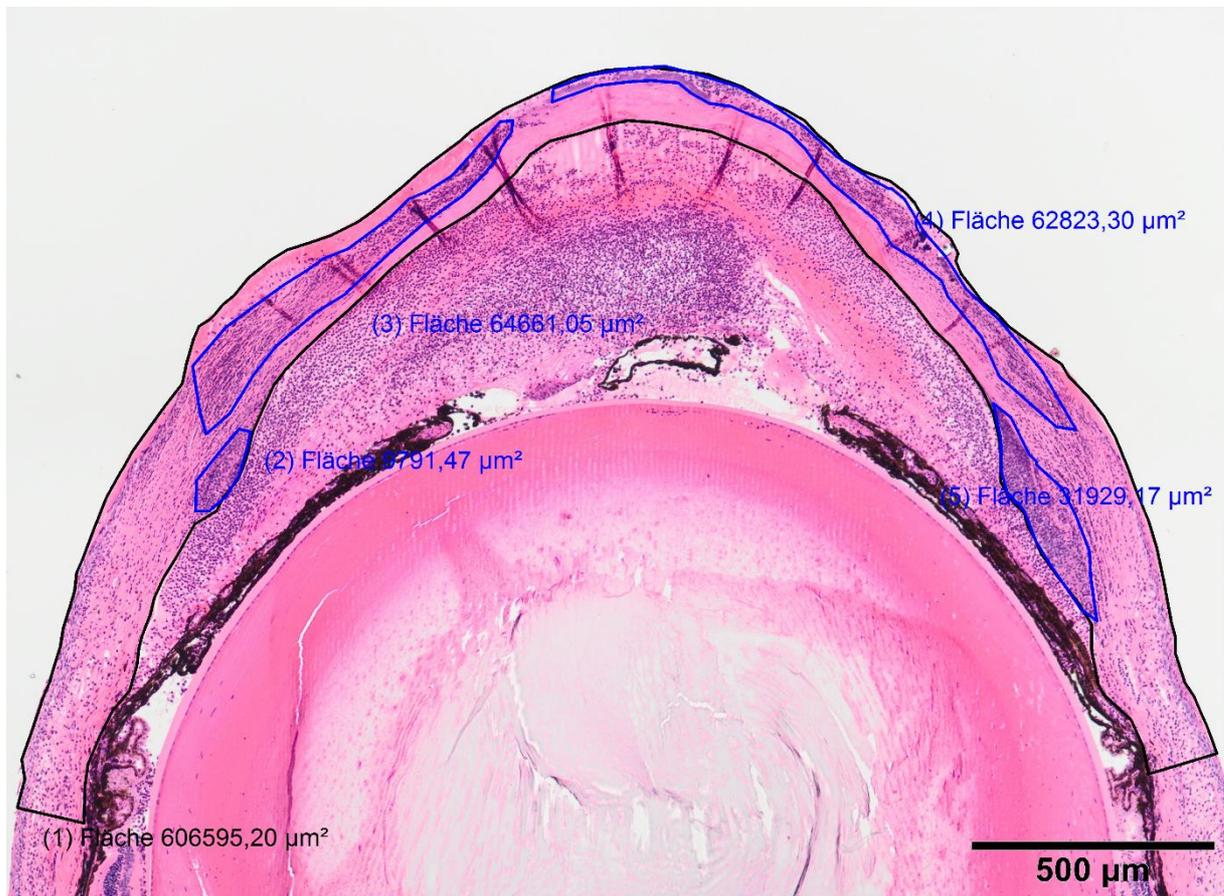


Abb. 10: Messverfahren zur Bestimmung des infiltrierten Hornhautanteils

4.10. Euthanasie der Tiere, Augenentnahme

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Vor der Tötung wurden die Tiere narkotisiert. Die Entnahme der Augen wurde unter lichtmikroskopischer Vergrößerung vorgenommen. Die Lidwinkel wurden eingeschnitten, anschließend die das Auge umgebende Konjunktiva entfernt. Durch eine Hebelbewegung unter Zuhilfenahme einer Kolibripinzette konnte das Auge samt eines Sehnervenstücks entfernt werden. Um die Blutung während der Augenpräparation zu minimieren, wurde das Tier zuvor dekapitiert.

4.11. Statistische Auswertung

Die ermittelten Ergebnisse wurden mithilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel 2013, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) erfasst und die Mittelwerte berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine Grafiksoftware GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, USA). Im Sinne einer Inferenzstatistik wurde nach Mann-Whitney-U getestet. Sekundäre Vergleiche wurden rein explorativ durchgeführt, weshalb auf multiples Testen verzichtet wurde. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichung (SD) berechnet, das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse der PDI mit Chlorin e6

5.1.1. Referenzwerte nicht infizierter, nicht therapierter Augen

Die mittlere zentrale Hornhautdicke betrug bei gesunden Augen von C57BL/6-Mäusen im Alter von 9-20 Monaten $87,7 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 7,5 \mu\text{m}$; $n = 6$). Der kleinste Wert betrug $77,4 \mu\text{m}$, der größte $97,3 \mu\text{m}$.

Die maximal gemessenen Werte lagen im Mittel bei $110,1 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 17,4 \mu\text{m}$; $n = 6$). Hier betrug das Minimum $95,6 \mu\text{m}$, das Maximum $141,3 \mu\text{m}$.

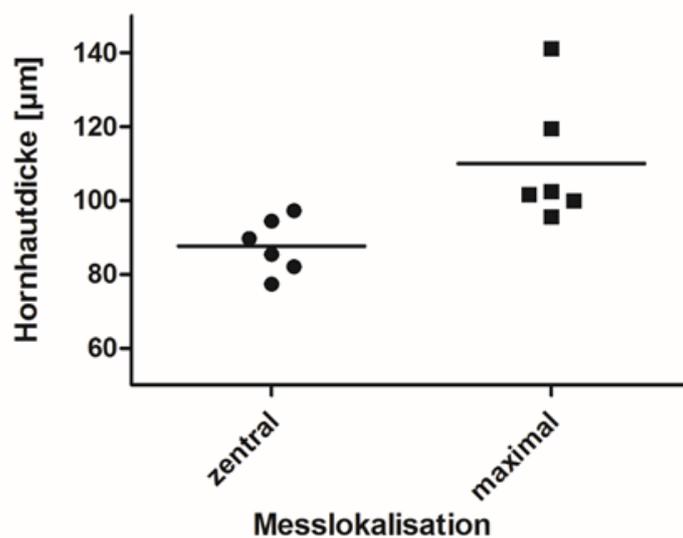


Abb. 11: Messergebnisse für die zentrale und maximale Hornhautdicke nicht infizierter, nicht therapierter Augen. Jeder Punkt bzw. jedes Quadrat repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarzen Linien geben jeweils den Mittelwert an.

5.1.2. PDI-therapierte Augen

5.1.2.1. Infiltrierter Hornhautanteil

Die prozentual infiltrierten Hornhautareale gemessen an der Gesamthornhautfläche eines Schnitts nahmen im Mittel einen Wert von 30,8% (SD = 7,4%; n = 12) an. Der kleinste Wert betrug 18%, der größte 43,5%.

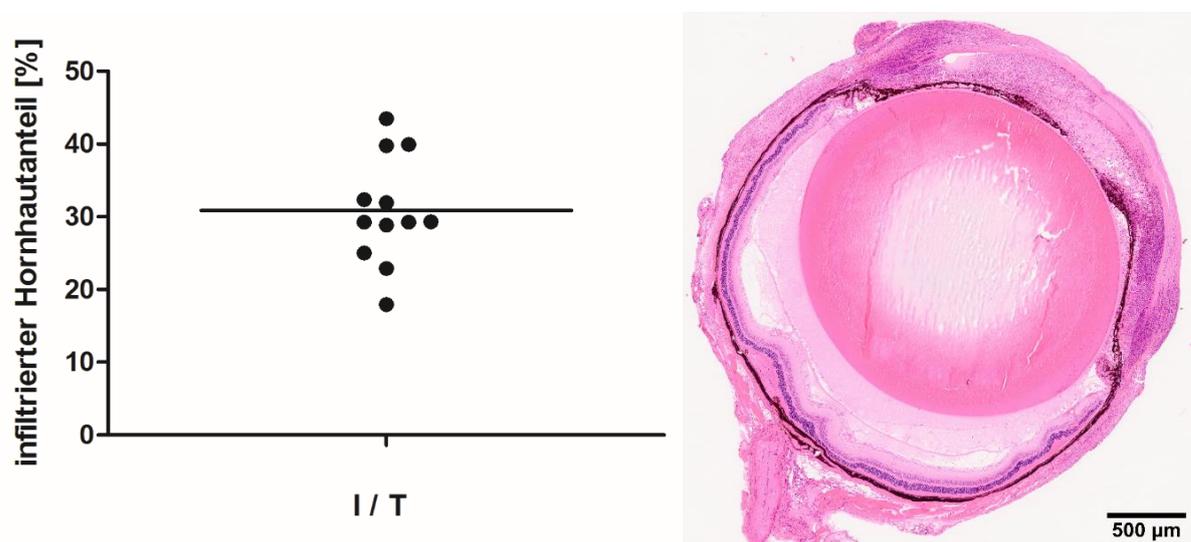


Abb. 12: Links: Prozentuale Werte infiltrierter Hornhautareale in Bezug auf die gesamte Hornhautfläche infizierter, therapierter Augen (I/T). Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarze Linie entspricht dem Mittelwert.

Rechts: Stellvertretendes histologisches Bild für die ermittelten Werte des infiltrierten Hornhautanteils der Gruppe infiziert/therapiert.

5.1.2.2. Zentrale und maximale Hornhautdicke

Der Mittelwert für die zentrale Hornhautdicke photodynamisch therapierter Augen betrug 121,6 μm (SD = 63,1 μm ; n = 12). Minimum und Maximum lagen bei 54,6 μm und 243,7 μm . Die Messungen zur maximalen Hornhautdicke ergaben einen Mittelwert von 220,1 μm (SD = 29,2 μm ; n = 12). Der kleinste Wert betrug 150,5 μm , der größte 264 μm .

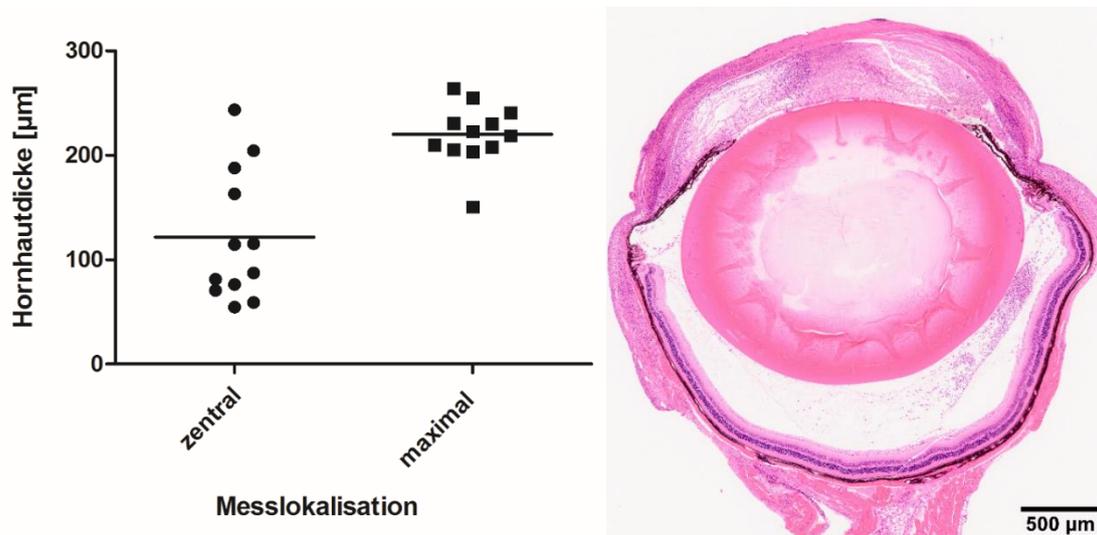


Abb. 13: Links: Zentrale und maximale Hornhautdicke infizierter, therapierter Augen. Jeder Punkt bzw. jedes Quadrat repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarzen Linien geben jeweils den Mittelwert an.

Rechts: Stellvertretendes histologisches Bild für die ermittelten Werte der zentralen wie auch der maximalen Hornhautdicke der Gruppe infiziert/therapiert.

5.1.2.3. Hypopyonausprägung

Bei allen Präparaten lag ein Hypopyon des Schweregrads 1 oder 2 vor. Der Schweregrad lag in der Mehrheit bei 2.

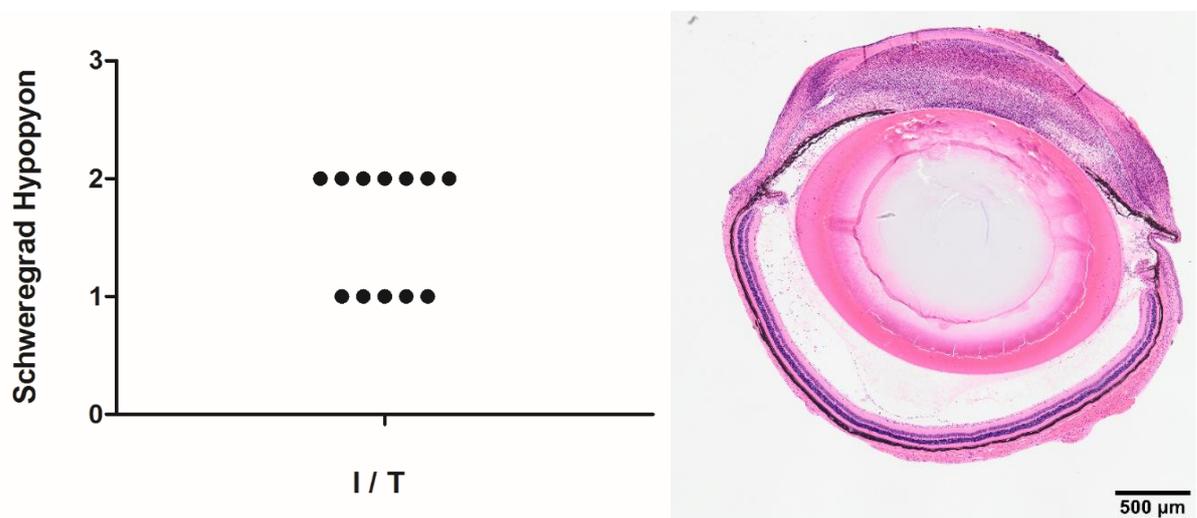


Abb. 14: Links: Hypopyonausprägung nach PDI. I/T steht für infiziert/therapiert. Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde.

Rechts: Stellvertretendes histologisches Bild für eine Hypopyonausprägung des Schweregrads 2 der Gruppe infiziert/therapiert.

5.1.3. Infizierte, scheintherapierte Augen

5.1.3.1. Infiltrierter Hornhautanteil

Im Mittel waren 27,7% der Hornhautfläche scheintherapierter Augen von Neutrophilen infiltriert (SD = 10,4%; n = 8). Das Minimum dieser Messung betrug 7,8%, das Maximum 39,7%.



Abb. 15: Links: Prozentuale Werte infiltrierter Hornhautareale in Bezug auf die gesamte Hornhautfläche nach Infektion und Scheintherapie (I/ST). Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarze Linie entspricht dem Mittelwert.

Rechts: Stellvertretendes histologisches Bild für die ermittelten Werte des infiltrierten Hornhautanteils der Gruppe infiziert/scheintherapiert.

5.1.3.2. Zentrale und maximale Hornhautdicke

Für die Hornhautdicke nach Scheintherapie ergab sich ein Mittelwert von $170,9 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 96,3 \mu\text{m}$; $n = 8$) im Zentrum. Der kleinste Wert betrug $76,5 \mu\text{m}$, der größte Wert $346,4 \mu\text{m}$. Die dickste Stelle der Hornhautmessungen nahm im Mittel den Wert $257,3 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 52,7 \mu\text{m}$; $n = 8$) an. Das Minimum betrug $195,2 \mu\text{m}$, das Maximum $356 \mu\text{m}$.

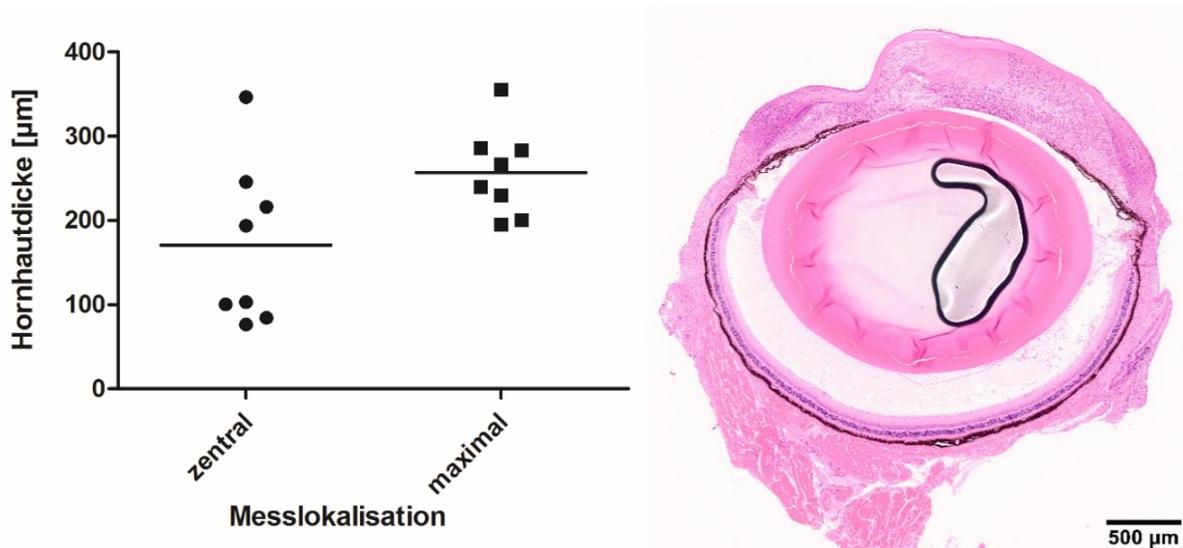


Abb. 16: Links: Ergebnisse der zentralen und maximalen Werte der Hornhautdicke infizierter, scheintherapierter Augen. Jeder Punkt bzw. jedes Quadrat repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarzen Linien geben jeweils den Mittelwert an.

Rechts: Stellvertretendes histologisches Bild für die ermittelten Werte der maximalen Hornhautdicke der Gruppe infiziert/scheintherapiert.

5.1.3.3. Hypopyonausprägung

Bei den infizierten, scheintherapierten Augen waren Hypopya des Schweregrads 1 und 2 zu vermerken. Lediglich ein Auge wies kein Hypopyon auf.

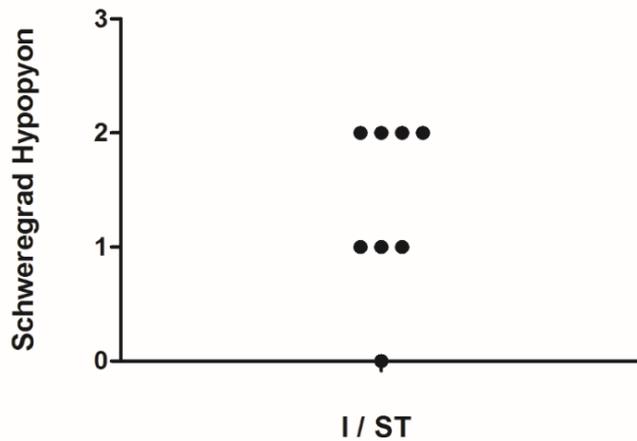


Abb. 17: Hypopyonausprägung nach Infektion und Scheintherapie (I/ST). Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde.

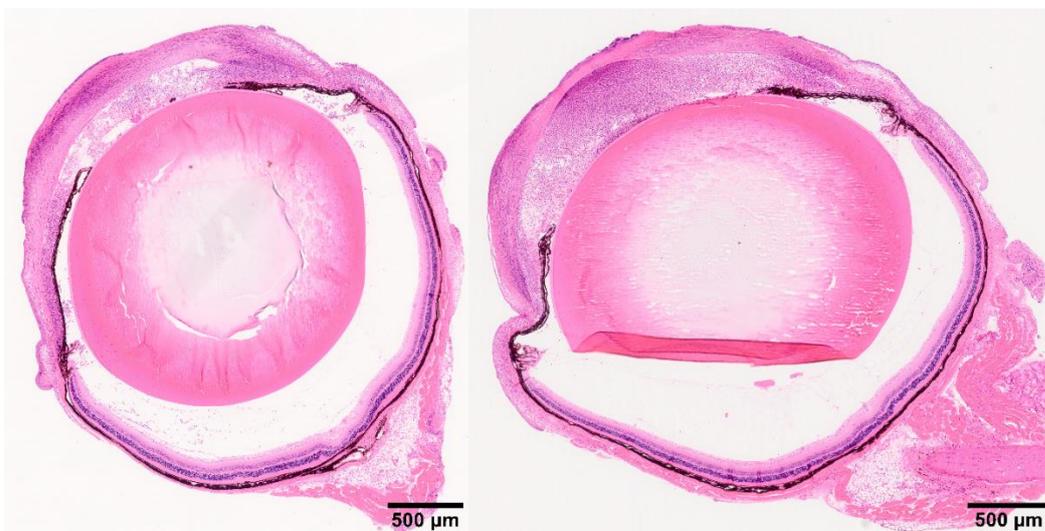


Abb. 18: Stellvertretende histologische Bilder für die Schweregrade der Hypopyonausprägung der Gruppe infiziert/scheintherapiert.

Links: Schweregrad 1. Rechts: Schweregrad 2.

5.1.4. Infizierte, nicht therapierte Augen

5.1.4.1. Infiltrierter Hornhautanteil

Der prozentual infiltrierte Hornhautanteil nahm für infizierte, nicht therapierte Augen im Mittel einen Wert von 37,3% (SD = 6,3%; n = 4) an. Der kleinste Wert betrug 31,8%, der größte 44,2%.



Abb. 19: Links: Prozentuale Werte infiltrierter Hornhautareale in Bezug auf die gesamte Hornhautfläche infizierter, nicht therapierter Augen (I/NT). Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarze Linie entspricht dem Mittelwert.

Rechts: Stellvertretendes histologisches Bild für die ermittelten Werte des infiltrierten Hornhautanteils der Gruppe infiziert/nicht therapiert.

5.1.4.2. Zentrale und maximale Hornhautdicke

Zentral betrug die mittlere Hornhautdicke infizierter, nicht therapierter Augen 139 μm (SD = 40,2 μm ; n = 4). Der kleinste Wert lag bei 95,3 μm , der größte bei 192,1 μm . Die Messungen der dicksten Hornhautstellen ergaben einen Mittelwert von 289,7 μm (SD = 32,6 μm , n = 4). Das Minimum betrug 259,7 μm , das Maximum 328,5 μm .

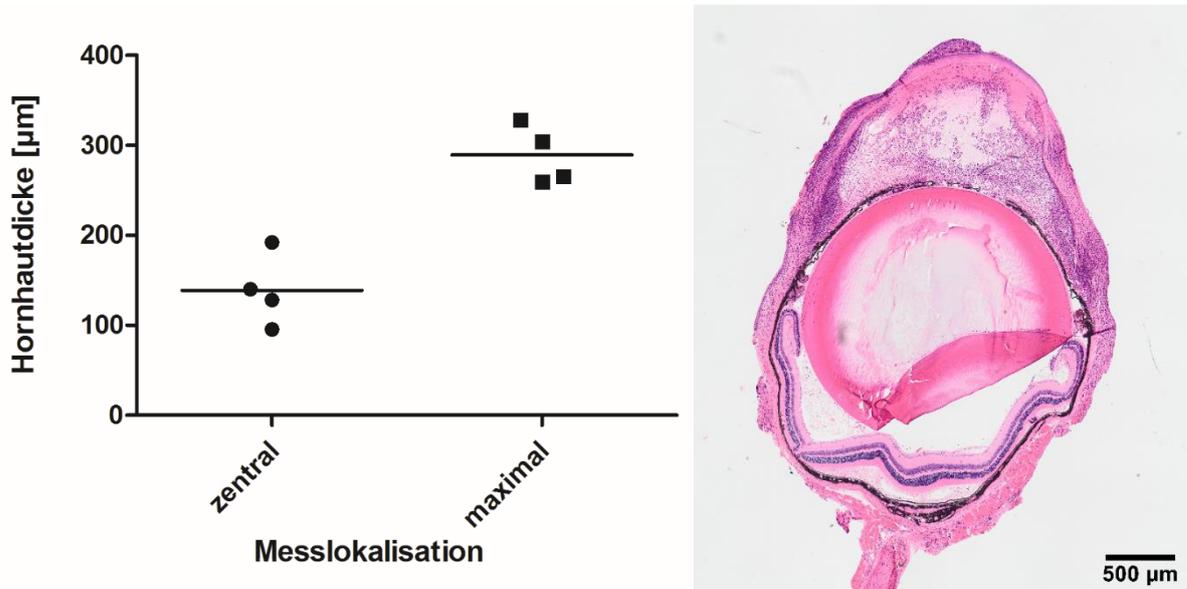


Abb. 20: *Links:* Ergebnisse der zentralen und maximalen Werte der Hornhautdicke infizierter, nicht therapierter Augen. Jeder Punkt bzw. jedes Quadrat repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarzen Linien geben jeweils den Mittelwert an. *Rechts:* Stellvertretendes histologisches Bild für die ermittelten Werte der maximalen Hornhautdicke der Gruppe infiziert/nicht therapiert.

5.1.4.3. Hypopyonausprägung

Die Gruppe der infizierten, nicht therapierten Augen wies von allen Gruppen die schwerwiegendsten Hypopya auf. Bei einem $n = 4$ entwickelte eine Hälfte der Gruppe ein starkes, die andere Hälfte sogar ein massives Hypopyon.

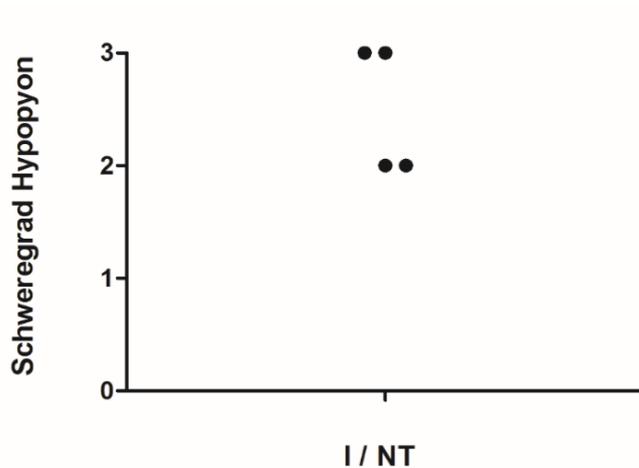


Abb. 21: Hypopyonausprägung infizierter, nicht therapierter (I/NT) Augen. Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde.

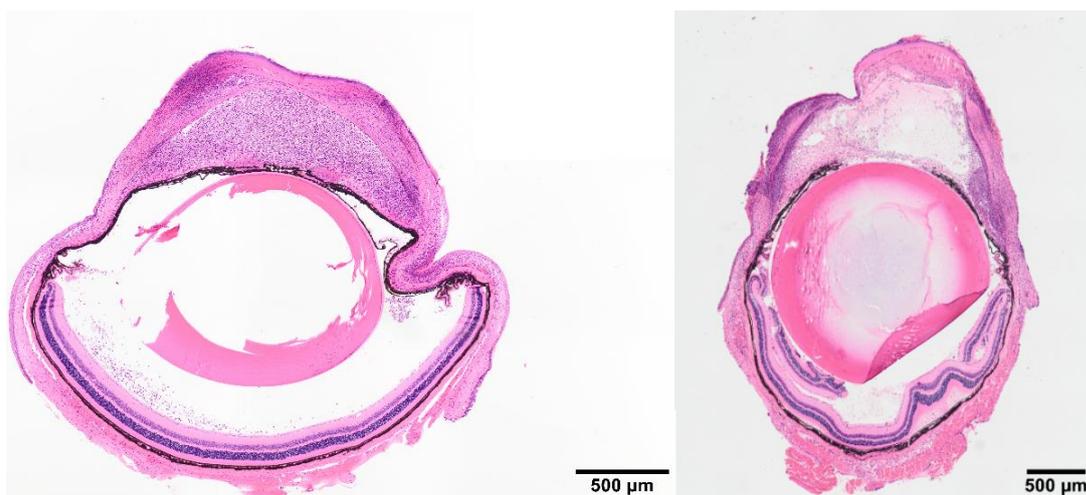


Abb. 22: Stellvertretende histologische Bilder für die Schweregrade der Hypopyonausprägung der Gruppe infiziert/nicht therapiert.

Links: Schweregrad 2. **Rechts:** Schweregrad 3.

5.1.5. Vergleich der Gruppen

Nach Erhebung der Einzelwerte wurden die Daten der Gruppen „nicht infiziert/nicht therapiert“, „infiziert/therapiert“, „infiziert/scheintherapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“ miteinander verglichen.

5.1.5.1. Infiltrierter Hornhautanteil

Der infiltrierte Gewebeanteil lag bei den infizierten, scheintherapierten Augen mit einem Mittelwert von 27,7% am niedrigsten, gefolgt von den infizierten, therapierten Tieren mit einem mittleren Wert von 30,8%. Mit 37,3% war der Wert für die Gruppe infizierter, nicht therapierter Tiere am größten. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden.

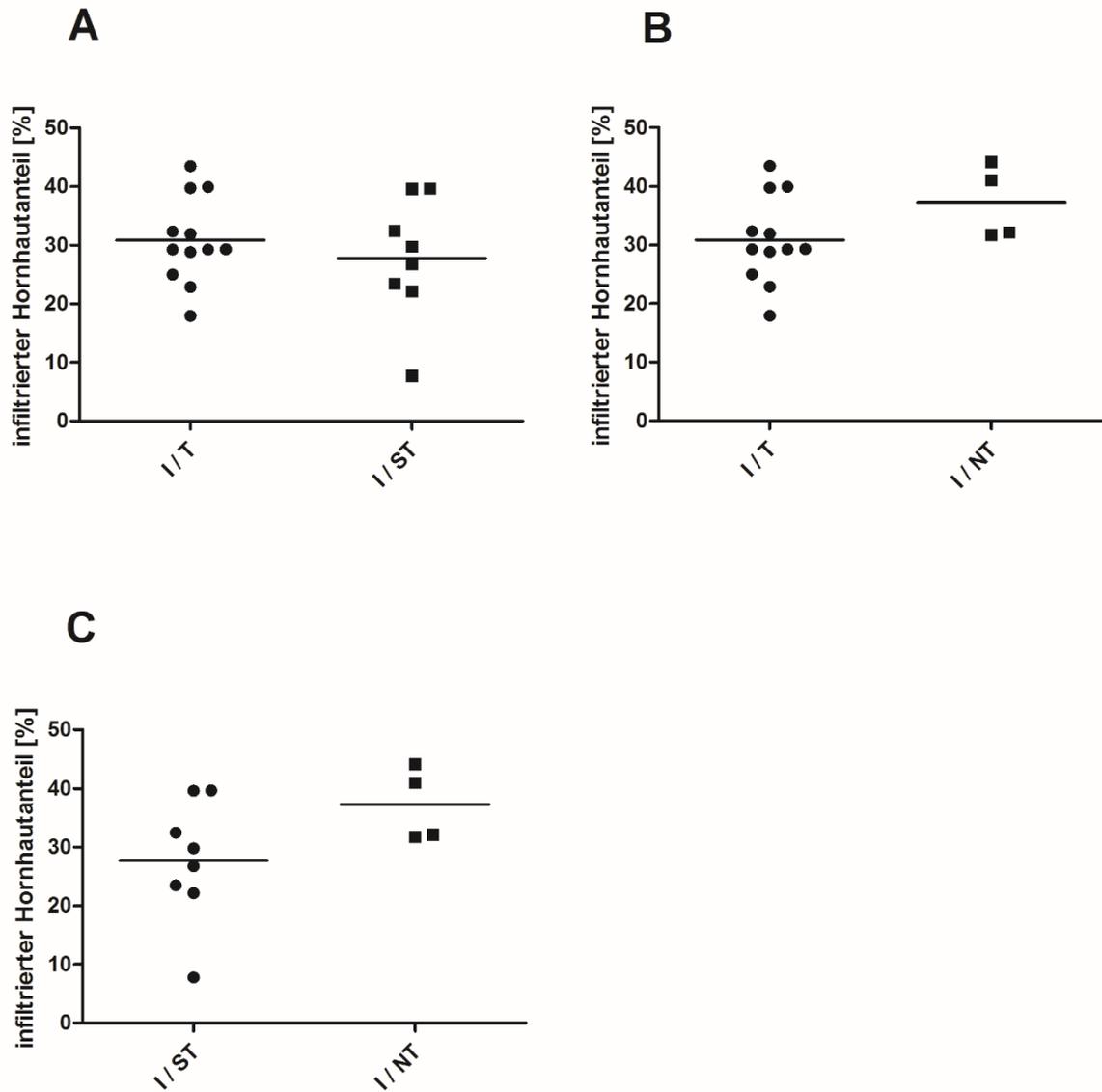


Abb. 23: Vergleich der prozentualen Werte infiltrierter Hornhautareale in Bezug auf die gesamte Hornhautfläche der verschiedenen Gruppen. **A:** Vergleich infiziert/therapiert (I/T) mit infiziert/scheintherapiert (I/ST). **B:** Vergleich infiziert/therapiert (I/T) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). **C:** Vergleich infiziert/scheintherapiert (I/ST) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). Ein Punkt bzw. ein Quadrat repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarzen Linien geben jeweils den Mittelwert an.

5.1.5.2. Zentrale Hornhautdicke

Die zentrale Hornhautdicke nicht infizierter, nicht therapierter Augen betrug im Mittel 87,7 μm . Bei infizierten, therapierten Augen betrug der Mittelwert 121,6 μm , bei Scheintherapie 170,9 μm und bei infizierten, nicht therapierten Augen 139 μm .

Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen den Gruppen „nicht infiziert/nicht therapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“ festgestellt werden.

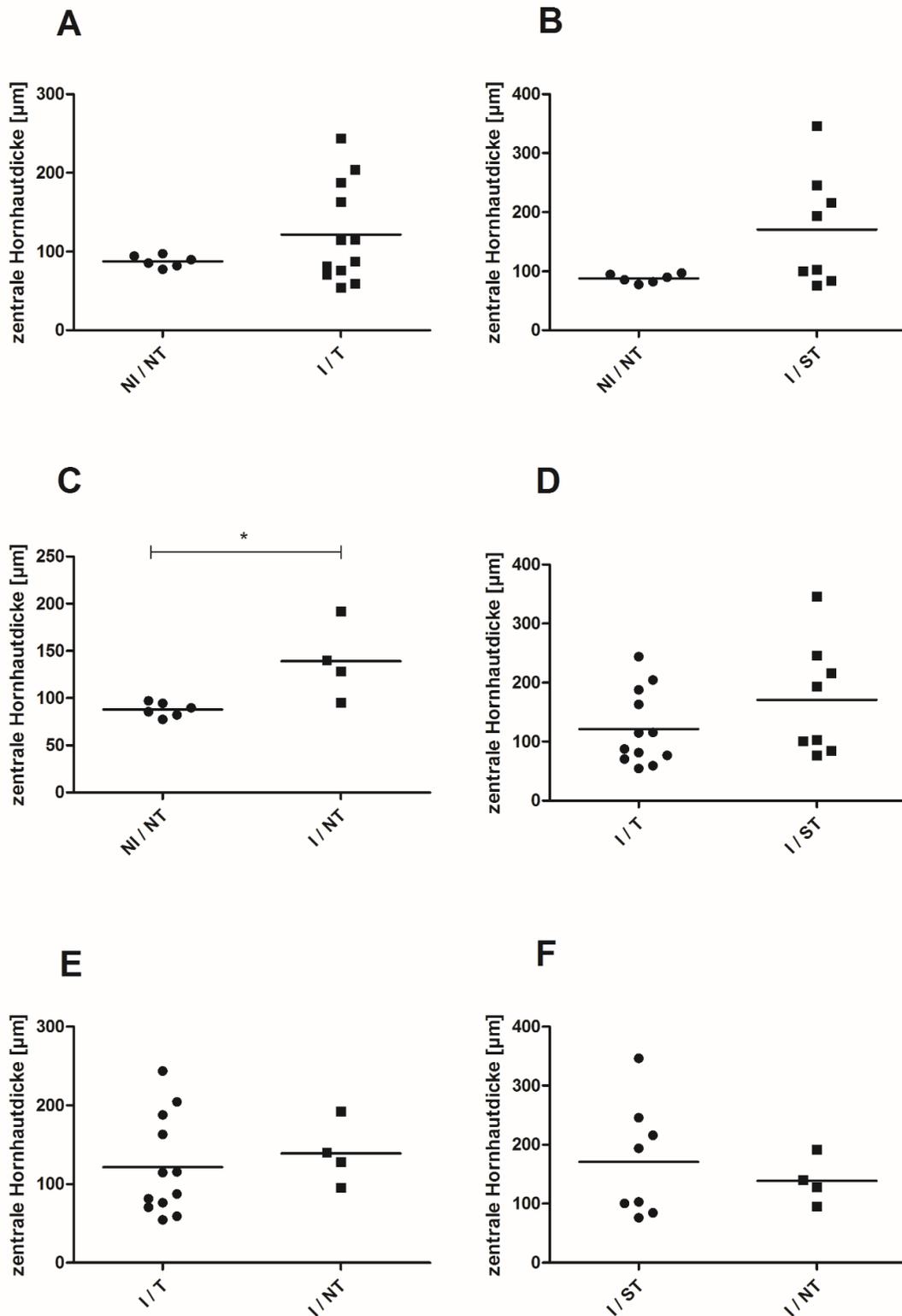


Abb. 24: Vergleich der zentralen Hornhautdicke der verschiedenen Gruppen. **A:** Vergleich nicht infiziert/nicht therapiert (NI/NT) mit infiziert/therapiert (I/T). **B:** Vergleich nicht infiziert/nicht therapiert (NI/NT) mit infiziert/scheintherapiert (I/ST). **C:** Vergleich nicht infiziert/nicht therapiert (NI/NT) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). **D:** Vergleich infiziert/therapiert (I/T) mit infiziert/scheintherapiert (I/ST). **E:** Vergleich infiziert/therapiert (I/T) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). **F:** Vergleich infiziert/scheintherapiert (I/ST) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). Ein Punkt bzw. ein Quadrat repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarzen Linien geben jeweils den Mittelwert an. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind mit * markiert.

5.1.5.3. Maximale Hornhautdicke

Gemittelter Referenzwert für die maximal gemessene Hornhautdicke gesunder Augen betrug 110,1 μm . Die Messungen bei infizierten, therapierten Augen ergaben im Mittel doppelt so hohe Werte. Die Mittelwerte der Gruppen „infiziert/scheintherapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“ betragen 257,3 μm und 289,7 μm . Signifikante Unterschiede ergaben sich im Vergleich nicht infizierter, nicht therapierter Augen mit allen anderen Gruppen, sowie zwischen den Gruppen „infiziert/therapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“.

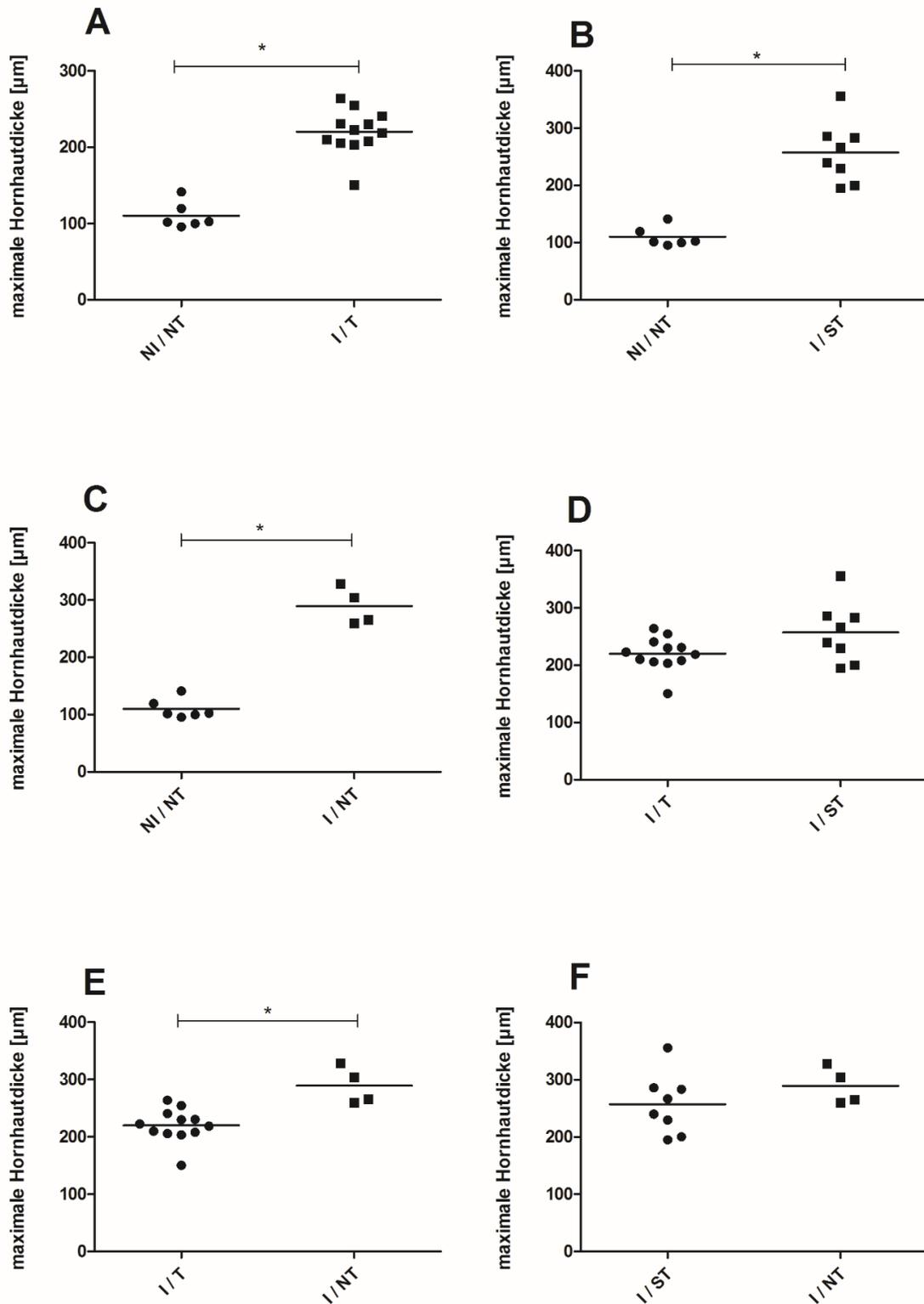


Abb. 25: Vergleich der Gruppen bezüglich der maximalen Hornhautdicke. **A:** Vergleich nicht infiziert/nicht therapiert (NI/NT) mit infiziert/therapiert (I/T). **B:** Vergleich nicht infiziert/nicht therapiert (NI/NT) mit infiziert/scheintherapiert (I/ST). **C:** Vergleich nicht infiziert/nicht therapiert (NI/NT) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). **D:** Vergleich infiziert/therapiert (I/T) mit infiziert/scheintherapiert (I/ST). **E:** Vergleich infiziert/therapiert (I/T) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). **F:** Vergleich infiziert/scheintherapiert (I/ST) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). Ein Punkt bzw. ein Quadrat repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarzen Linien geben jeweils den Mittelwert an. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind mit * markiert.

5.1.5.4. Hypopyonausprägung

Infizierte, nicht therapierte Augen zeigten signifikant stärker ausgeprägte Hypopya als die Gruppen „infiziert/therapiert“ und „infiziert/scheintherapiert“. Zwischen PDI und Scheintherapie konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

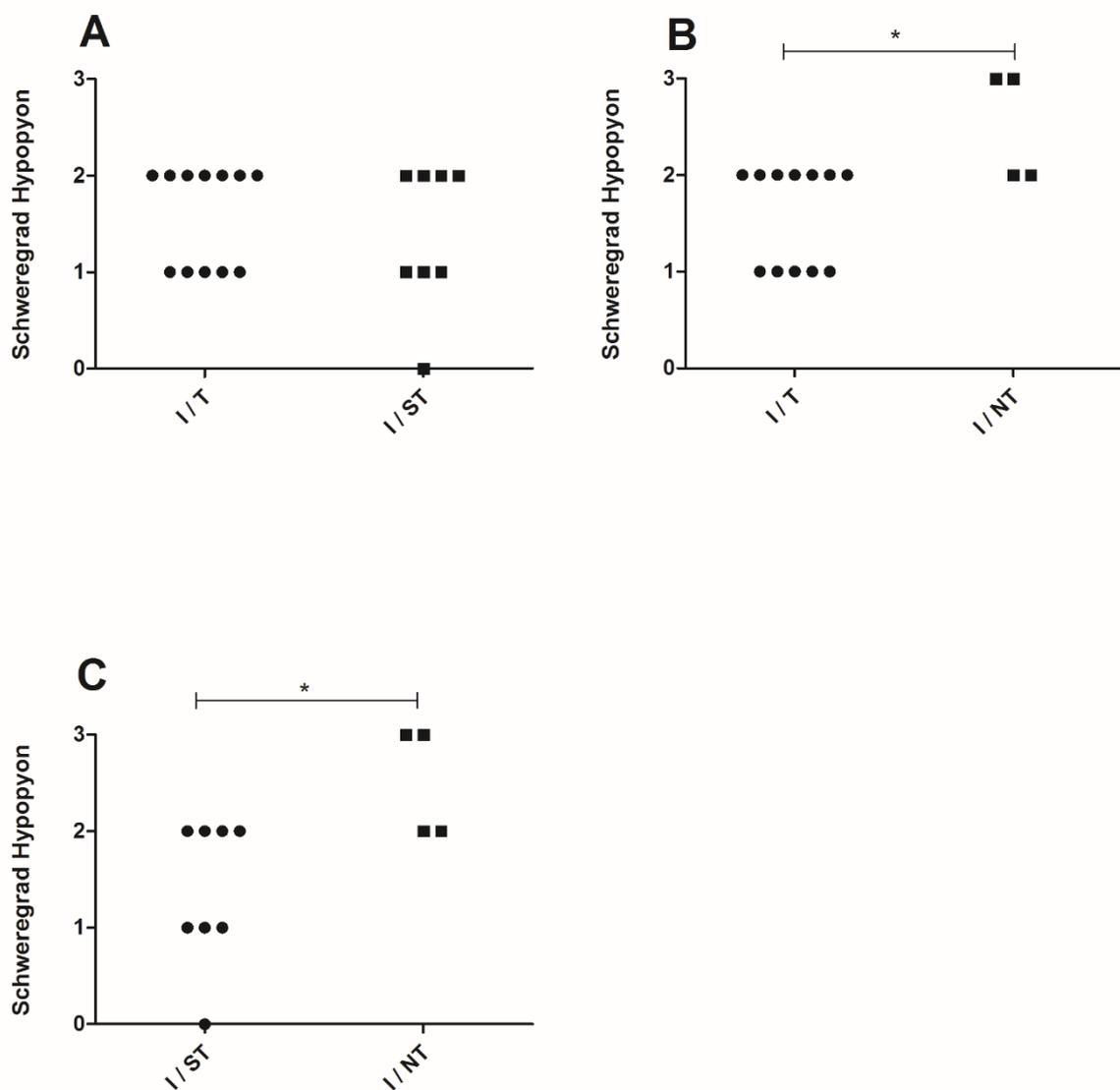


Abb. 26: Vergleich der Gruppen bezüglich des Schweregrads der Hypopyonausprägung. **A:** Vergleich infiziert/therapiert (I/T) mit infiziert/scheintherapiert (I/ST). **B:** Vergleich infiziert/therapiert (I/T) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). **C:** Vergleich infiziert/scheintherapiert (I/ST) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). Ein Punkt bzw. ein Quadrat repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind mit * markiert.

5.2. Ergebnisse der Therapie mit gNO

Die Ergebnisse der Therapie mit gNO beschränken sich auf die maximale Hornhautdicke und die Hypopyonausprägung.

5.2.1. Referenzwerte nicht infizierter, nicht therapierter Augen

Die maximale Hornhautdicke betrug für C57BL/6-Mäuse im Alter von 10,5 Wochen im Mittel 123,6 μm (SD = 10,7; n = 6). Das Minimum lag bei 112,8 μm , das Maximum bei 141,2 μm .

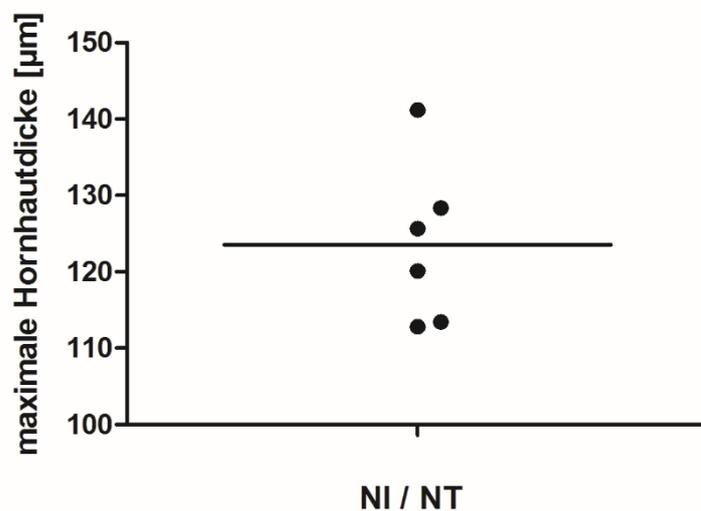


Abb. 27: Messergebnisse für die maximale Hornhautdicke nicht infizierter, nicht therapierter Augen (NI/NT). Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarze Linie entspricht dem Mittelwert.

5.2.2. gNO-therapierte Augen

5.2.2.1. Maximale Hornhautdicke

Das Mittel der maximalen Hornhautdicke gNO-therapierter Augen nahm einen Wert von 213,8 μm (SD = 77,5 μm ; n = 11) an. Der kleinste Wert betrug 109,9 μm , der größte 349,5 μm .



Abb. 28: Links: Messergebnisse für die maximale Hornhautdicke gNO-therapierter Augen (I/T). Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarze Linie entspricht dem Mittelwert.

Rechts: Stellvertretendes histologisches Bild für die ermittelten Werte der maximalen Hornhautdicke der Gruppe infiziert/therapiert.

5.2.2.2. Hypopyonausprägung

Mehr als 50% der gNO-therapierten Augen zeigten keinerlei Anzeichen eines Hypopyons. Bei den übrigen Augen der Gruppe wurden Hypopya des Schweregrads 1 festgestellt.

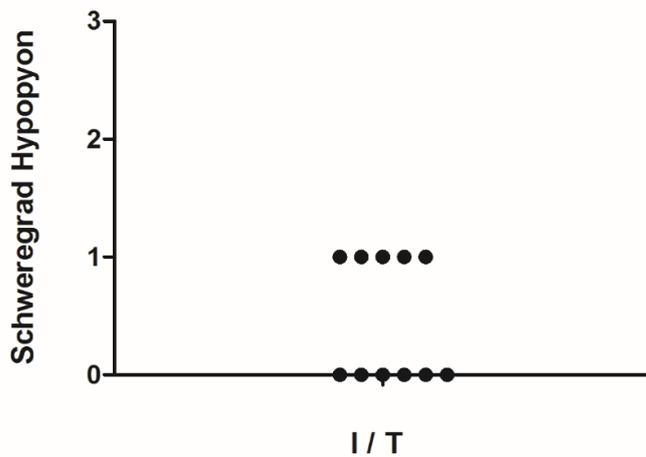


Abb. 29: Hypopyonausprägung nach gNO-Therapie. I/T steht für infiziert/therapiert. Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Tieres, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde.

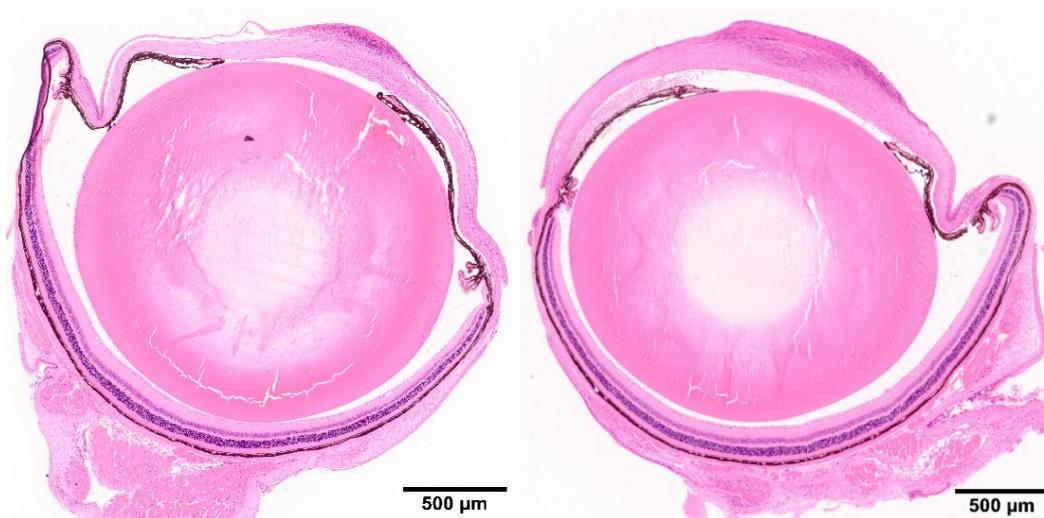


Abb. 30: Stellvertretende histologische Bilder für die Schweregrade der Hypopyonausprägung der Gruppe infiziert/therapiert.

Links: Schweregrad 0. **Rechts:** Schweregrad 1.

5.2.3. Infizierte, nicht therapierte Augen

5.2.3.1. Maximale Hornhautdicke

Bei der Berechnung des Mittelwerts für die maximale Hornhautdicke infizierter, nicht therapierter Augen ergab sich ein Wert von $168,2 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 55,4$; $n = 8$). Das Minimum betrug $119,7 \mu\text{m}$, das Maximum $292 \mu\text{m}$.

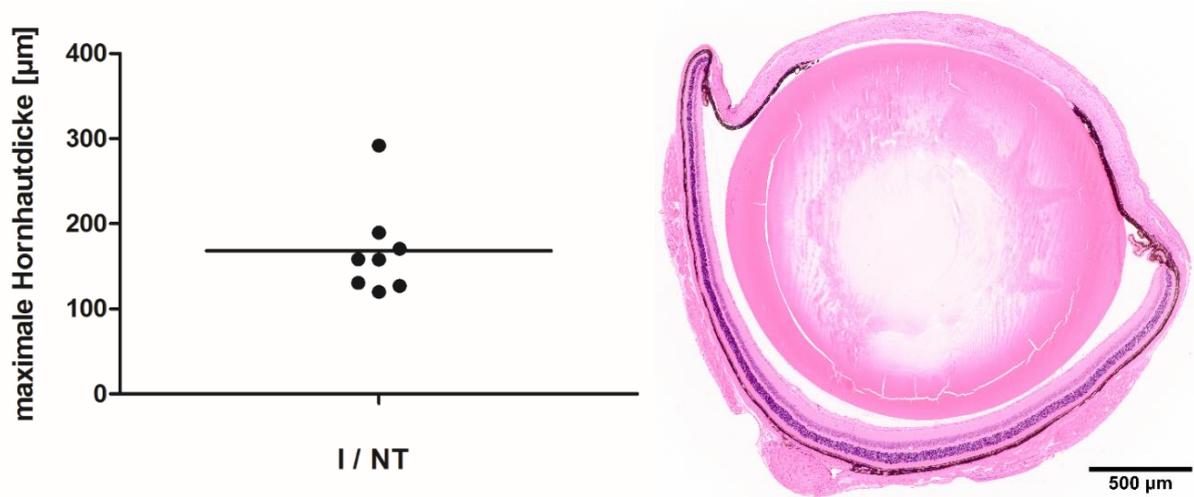


Abb. 31: Links: Messergebnisse für die maximale Hornhautdicke infizierter, nicht therapierter Augen (I/NT). Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Auges, welcher aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Die schwarze Linie entspricht dem Mittelwert.

Rechts: Stellvertretendes histologisches Bild für die ermittelten Werte der maximalen Hornhautdicke der Gruppe infiziert/nicht therapiert.

5.2.3.2. Hypopyonausprägung

Bei drei der infizierten, nicht therapierten Augen lag ein Hypopyon des Schweregrads 1 vor, bei fünf Tieren konnte kein Hypopyon festgestellt werden.

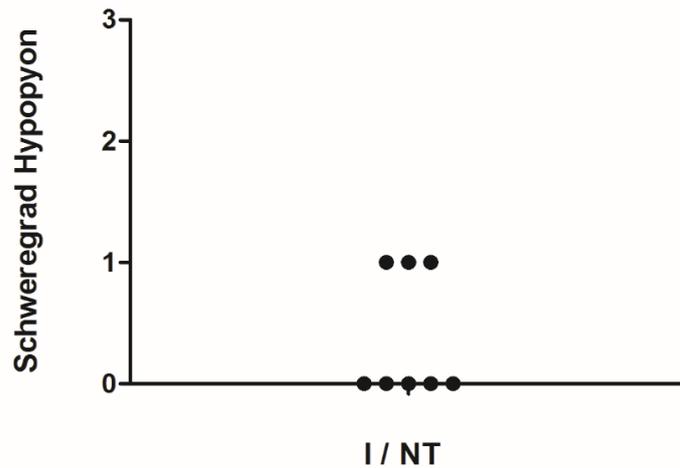


Abb. 32: Hypopyonausprägung infizierter, nicht therapierter Augen (I/NT). Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Auges, welcher aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde.

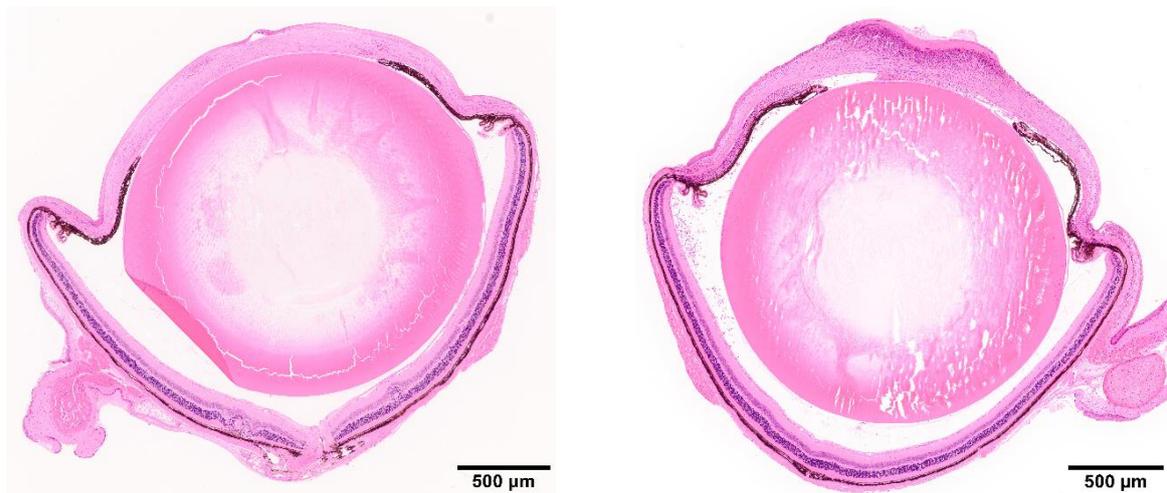


Abb. 33: Stellvertretende histologische Bilder für die Schweregrade der Hypopyonausprägung der Gruppe infiziert/nicht therapiert.

Links: Schweregrad 0. **Rechts:** Schweregrad 1.

5.2.4. Vergleich der Gruppen

5.2.4.1. Maximale Hornhautdicke

Der Mittelwert der gesunden Referenzgruppe aus den Messungen für die maximale Hornhautdicke belief sich auf 123,6 μm . Bei gNO-therapierten Tieren lag dieser Wert bei 213,8 μm , für die Gruppe „infiziert/nicht therapiert“ betrug er 168,2 μm . Die Gruppe „nicht infiziert/nicht therapiert“ zeigte im Vergleich mit den Gruppen „infiziert/therapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“ signifikant niedrigere Werte.

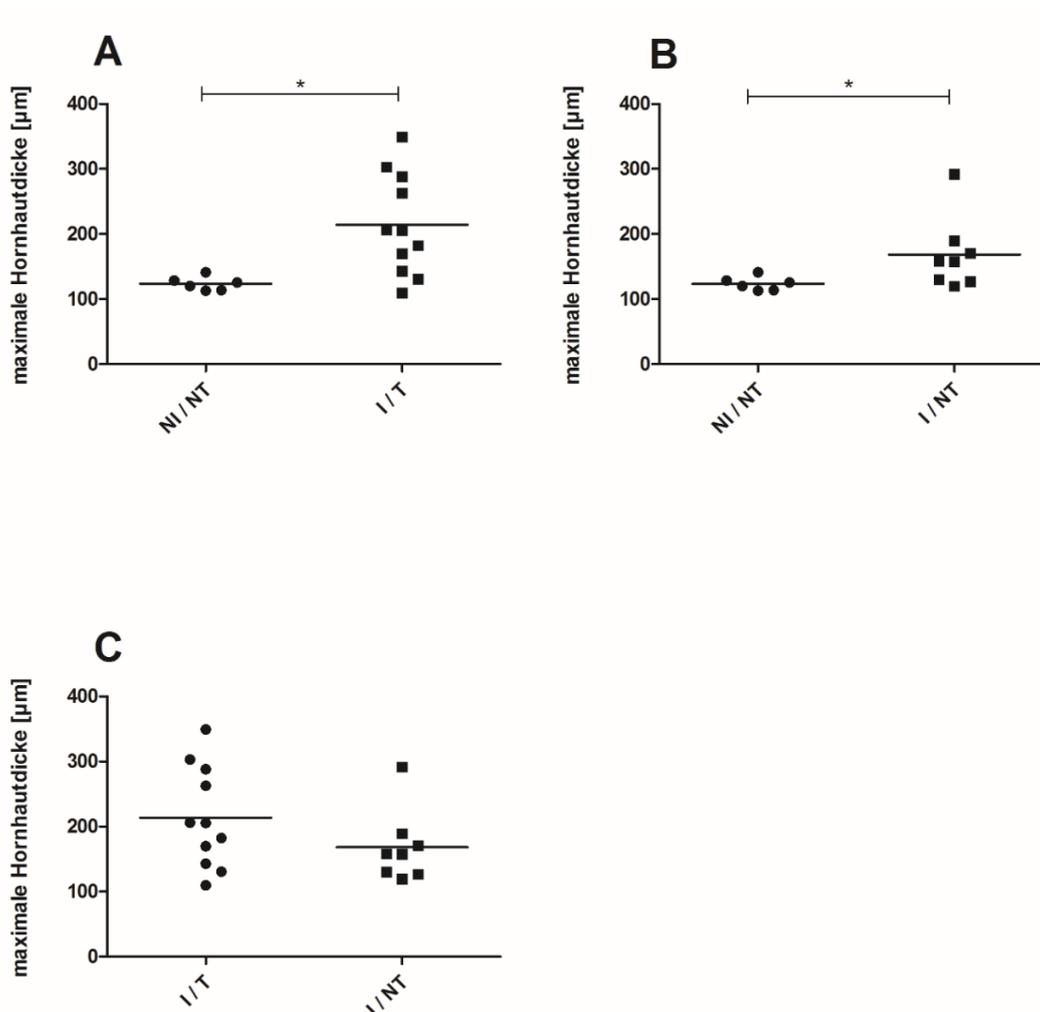


Abb. 34: Vergleich der Gruppen bezüglich der maximalen Hornhautdicke. **A:** Vergleich nicht infiziert/nicht therapiert (NI/NT) mit infiziert/therapiert (I/T). **B:** Vergleich nicht infiziert/nicht therapiert (NI/NT) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). **C:** Vergleich infiziert/therapiert (I/T) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT). Die schwarzen Linien geben jeweils den Mittelwert an. Ein Punkt bzw. ein Quadrat repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind mit * markiert.

5.2.4.2. Hypopyonausprägung

Bezüglich der Ausprägung eines Hypopyons stellte sich zwischen den Gruppen „infiziert/therapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“ kein signifikanter Unterschied ein.

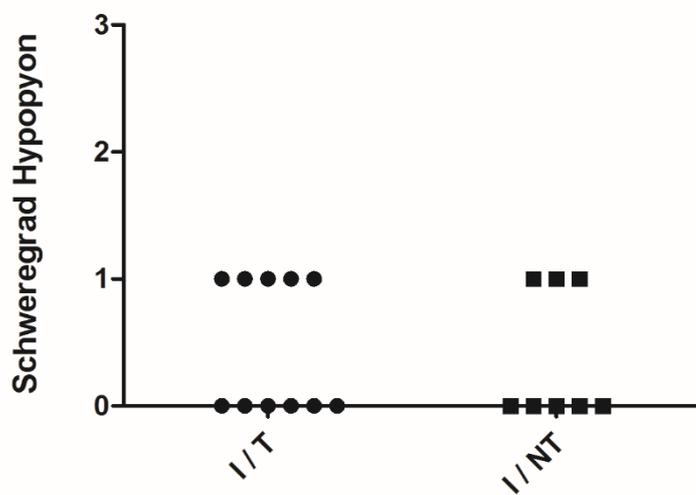


Abb. 35: Vergleich der Gruppen infiziert/therapiert (I/T) mit infiziert/nicht therapiert (I/NT) bezüglich der Hypopyonausprägung. Ein Punkt bzw. ein Quadrat repräsentiert den Wert eines Auges, der aus fünf Einzelmessungen gemittelt wurde.

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis antiinflammatorischer Effekte zweier neuer Therapieverfahren im Einsatz gegen bakterielle Keratitiden. Hierfür wurde die Studie in zwei Teile gesplittet. Ein Teil beschäftigte sich mit der Auswirkung der Photodynamischen Inaktivierung mit Chlorin e6, der zweite behandelte den Einfluss von gasförmigem Stickstoffmonoxid auf das entzündlich infiltrierte Hornhautgewebe.

6.1. Diskussion der Methodik

6.1.1. Modell der PDI mit Chlorin e6

Die chlorinhaltige Salbe, die zu Beginn der Phototherapie auf die Hornhaut aufgetragen wurde, war von relativ zäher Konsistenz. Nach der Einwirkzeit von 30 min bei geöffneten Augen gelang es aufgrund des Eintrocknens der Salbe nur bedingt, sie mit einem Watteträger zu entfernen. Dieses Verfahren wurde von einer *in vitro* Studie an Schweinehornhäuten [Winkler et al., 2016] übernommen, bei welcher die Überstände der Salbe mit einem Papiertuch entfernt wurden. In anderen *in vitro* Studien an Zellkulturen wurde der Fotosensitizer mithilfe eines flüssigen Mediums nach der Inkubationszeit entfernt [Wang et al., 2013], [Simon et al., 2014]. Eine Spülung des Auges mit einer geeigneten Lösung wäre für weitere Versuche eine Möglichkeit, diese Fehlerquelle zu eliminieren. Rückstände auf der Hornhautoberfläche könnten dazu geführt haben, dass das Rotlicht nicht in wirkungsvoller Dosis auf die Hornhaut traf. Zu diskutieren ist außerdem die Konzentration sowie die Einwirkzeit des Fotosensitizers. *In vitro* wurden bereits erste Versuche mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt [Wang et al., 2013], [Simon et al., 2014]. Für den Einsatz an der Maus gibt es - die Kornea betreffend - noch keine Erfahrungswerte. Möglicherweise war die verwendete Konzentration zu hoch, sodass der destruierende Effekt der ROS den therapeutischen Effekt überschritt. In parallel laufenden Studien mit mikrobiologischer Auswertung (siehe "Material und Methodik") wurde die PDI bezüglich verschiedener Konzentrationen des Chlorin e6 getestet. Die Ergebnisse zeigten ein besseres Outcome bei Verwendung niedrigerer Konzentrationen des Fotosensitizers [Wu et al., 2017]. Die 30-minütige Penetrationszeit des Fotosensitizers wurde nach Studien von Winkler et al. übernommen. Sie stammt von Versuchen an entnommenen Schweinehornhäuten,

deren Dicke ca. 800 µm beträgt [Schilde et al., 2008], also ungefähr das Achtfache von Mäusen. Bei zu großer Penetrationstiefe besteht die Gefahr, einen Endothelschaden hervorzurufen [Wang et al., 2013]. Folgen sind Beeinträchtigung der Pumpfunktion mit resultierender Ödembildung im Hornhautstroma. Dieser Sachverhalt wäre ein möglicher Grund für die auch bei therapierten Augen verdickten Hornhäute. Des Weiteren ist die vorzeitige Aktivierung des Fotosensitizers zu diskutieren. Zur Vermeidung dieser Problematik sollten theoretisch alle Versuche in Dunkelheit durchgeführt werden. In der praktischen Durchführung war ein vollkommenes Abdunkeln des Labors durch die räumlichen Gegebenheiten nicht umsetzbar. Zudem benötigten die Versuchsdurchführenden zumindest einen minimalen Lichteinfall für ausreichende Sicht. Ein Ausschluss frühzeitiger Aktivierung des Agens war somit nicht möglich, dennoch wurde sie so gering wie möglich gehalten.

6.1.2. Modell der Therapie mit gNO

Die Durchführung dieser Versuchsreihe nahm gewissermaßen die Form eines Pilotprojekts auf diesem Gebiet ein. Sämtliche Methodik musste neu entwickelt werden. Die Etablierung einer optimalen Versuchsapparatur war, wie bereits unter „Material und Methoden“ thematisiert, nicht möglich. Demnach gibt es mehrere angreifbare Punkte, die eine endgültige Ergebnisbewertung unmöglich machen und nach weiterführenden Studien verlangen. Grundsatz der gNO-Therapie und ihrer Wirkung ist die Anreicherung von Stickstoffmonoxid in unmittelbarer Nachbarschaft des betreffenden Gewebes. Eine ausreichende Stickstoffmonoxidkonzentration wurde anhand des angewandten Versuchsaufbaus möglicherweise nicht gewährleistet. Die Applikation durch den auf das Auge gerichteten Gasstrom könnte ein weiterer Grund für das Ausbleiben eines Therapieerfolgs begründen. Zwar zeigte sich in Vorversuchen kein schädigender Einfluss der Gasapplikation am gesunden Auge. Der austrocknende Effekt und damit einhergehende Begünstigungen für Infektionsausbreitung sind am infizierten Auge dennoch anders zu werten als am gesunden. Für weiterführende Experimente bezüglich dieses Therapieansatzes wäre aus genannten Gründen eine wie in „Material und Methoden“ theoretisch skizzierte Versuchsapparatur dringend anzuraten.

6.1.3. Histologische Aspekte

Vor Versuchsbeginn wurde eine Auswertung der Experimente nach mikrobiologischem und histologischem Aspekt festgelegt. Die Autorin dieser Arbeit war vor allem mit der Erstellung eines Auswertungsprotokolls für die Histologie beschäftigt. Histopathologische Analysen von Keratitiden in der Literatur beschreiben unter anderem die Adhäsion von Neutrophilen am Endothel, proteinreiche Exsudate in der Vorderkammer und Epithelzellverluste [Girgis et al., 2003]. Die Zellzahl der neutrophilen Granulozyten innerhalb des Hornhautgewebes schien der aussagekräftigste Parameter zu sein. Eine Auszählung war jedoch aufgrund massiven Neutrophilenvorkommens manuell nicht möglich. Die Zellzählung mithilfe eines Computerprogramms (Image J, NIH Image program, U.S. National Institutes of Health, USA) erbrachte keine verwertbaren Ergebnisse. Dieser Ansatz wurde mangels fehlender technischer Ressourcen und Kenntnissen nicht weiter verfolgt. Als Maß für die Neutrophileninvasion wurde aus genannten Gründen das unter „Material und Methoden“ erläuterte Verfahren entwickelt. Eine exakte Eingrenzung einzelner Läsionen war nicht immer durchführbar. Vor allem bei nur leicht infiltriertem Gewebe oder kontinuierlich gleich starker Infiltration verlor dieses Verfahren an Validität. Daher fand es im Falle der gNO-Versuchsreihe keine Anwendung mehr. Die eingesetzten Auswertungsparameter „maximale Hornhautdicke“ und „Hypopyonprägung“ erwiesen unter Berücksichtigung der zur Verfügung stehenden Mittel die höchste Aussagekraft. Als Messlokalisierung der Hornhautdicke setzte sich die jeweils dickste Stelle pro Schnitt durch. Diese Form der Datenerhebung mag dem Betrachter wenig standardisiert vorkommen. Im ersten Teil der Studie wurde daher zusätzlich die zentrale Hornhautdicke gemessen. Bei diesem Verfahren wurde der physiologische Hornhautaufbau berücksichtigt, der je nach Lokalisation in seiner Dicke variiert [Zhang et al., 2013]. Es ist bekannt, dass BALB/c-Stämme im Hornhautzentrum die maximale, in die Peripherie immer weiter abnehmende Hornhautdicke aufweisen. Bei Tieren von C57BL/6-Stämmen nimmt die Dicke vom Zentrum zur parazentralen Zone zu und anschließend wieder ab. Beiden Stämmen ist die geringste Dicke am Limbus gemein [Zhang et al., 2013]. Dennoch war die Messung der maximalen Hornhautdicke die einzige Möglichkeit, das wahre Ausmaß der Entzündungsreaktion festzustellen. Grund war das individuell verschiedene Infiltrationsschema der Kornea. In nahezu allen Fällen einer Infektion lag eine sich kontinuierlich über die Hornhaut ausbreitende Neutrophileninfiltration vor. Häufig traten neben dieser „Grundinfiltration“ einzeln lokalisierte, stärker invadierte Areale auf. In der PDI-Versuchsreihe wurde ein vorwiegend peripheres Infiltrationsschema, in der gNO-Versuchsreihe ein zentrales

Infiltrationsschema festgestellt. Die Bedeckung der peripheren Hornhautanteile durch Ober- und Unterlid mit resultierend geringerer UV-Einstrahlung und niedrigerer umgebender Sauerstoffkonzentration könnte zumindest für die peripher stärkere Infiltration ein Grund sein. Eine weitere Begründung liegt im manuell unter lichtmikroskopischer Sicht durchgeführten Infektionsmodell. Bei dem nach GIRGIS angewandten, modifizierten Verfahren konnte eine absolute Reproduzierbarkeit nicht gewährleistet werden. Tiefe sowie Lokalisation der „Scratches“ unterlagen stets geringen Schwankungen. Dieser Sachverhalt stellt auch eine Erklärung für die unterschiedlich starke Infektionsausprägung dar. Genannte Überlegungen mussten in die Erstellung des Schnittschemas miteinbezogen werden. Nach Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens stehen die fünf zentralen Präparatschnitte für die Auswertung zur Verfügung. Um den Verlust wichtiger Informationen oder gar das Übersehen des Hauptlokalisationsorts der Infektion auszuschließen, wurden drei Augen in einem Abstand von 100 µm und einer Schnittdicke von 5 µm von einem Limbuspol bis zum gegenüberliegenden Limbuspol kontinuierlich durchgeschnitten. Es zeigten sich nur geringfügige Abweichungen, die den Zeit- und Kostenmehraufwand nicht rechtfertigten. Unbeeinflussbare Faktoren mit Konsequenzen für die Schnittlage waren Irisverklebungen aufgrund sich ausbreitender Infektion und Pupillenerweiterungen wegen geringeren Lichteinfalls durch Hornhauttrübung und Hypopyonbildung. Die Einteilung der Hypopya in verschiedene Schweregrade erfolgte empirisch. Die Übergänge waren zum Teil fließend.

6.2. Diskussion der Ergebnisse

Anhand dieser Studie konnte ein signifikanter Effekt der Behandlung bakterieller Keratitiden unter Einsatz der Photodynamischen Inaktivierung mit Chlorin e6 erstmals am Mausmodell bestätigt werden. Auch die mittels gasförmigem Stickstoffmonoxid durchgeführten Versuche müssen trotz Ausbleiben positiver Beobachtungen als Vorreiter für die *in vivo* Forschung auf diesem Gebiet angesehen werden. Zum Vergleich heranziehbare Ergebnisse liegen derzeit nicht vor.

Den beschriebenen Versuchsreihen ist eine gewisse Inhomogenität der Versuchsgruppen nicht abzusprechen. Grund waren Schwierigkeiten in der Etablierung der Infektion sowie häufige Änderungen des Therapieablaufs in Bezug auf Therapiezeitpunkt, verwendeter Konzentrationen und Therapiehäufigkeit. Diese Umstände sorgten für zu geringe Fallzahlen, weshalb für die Ergebnisauswertung der Gruppen „infiziert/nicht therapiert“, „infiziert/therapiert“ und „infiziert/scheintherapiert“ Werte zusammengefasst wurden, die z.T. unter nicht identischen Versuchsbedingungen erhoben wurden.

6.2.1. Diskussion der Ergebnisse der PDI mit Chlorin e6

Die Variation der Versuchsparameter wie z.B. die Konzentration des Chlorin e6 in der Salbe, deren Einwirkzeit und die Therapiehäufigkeit zeigten im Vergleich der Messwerte keine gravierenden Unterschiede. Auf eine statistische Überprüfung wurde in dieser Hinsicht verzichtet, da die Fallzahlen nicht ausreichten.

Betrachtet man den Vergleich der maximalen Hornhautdicke der Gruppe „nicht infiziert/nicht therapiert“ mit den Gruppen „infiziert/therapiert“, „infiziert/scheintherapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“, ist in allen Fällen eine Verdickung der Hornhaut von signifikantem Niveau zu verzeichnen. Trotz Therapie verdoppelten sich die Werte der Hornhautdicke von 110 µm auf 220 µm im Vergleich zu den gesunden Augen. Eine therapiebedingte Schädigung des Auges könnte dafür verantwortlich sein. Die Betrachtung des signifikanten Unterschieds zwischen den Gruppen „infiziert/therapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“ ist wiederum als Anzeichen der Photodynamischen Inaktivierung zu interpretieren. Die alleinige Bewertung der zentralen Hornhautdicke ist wie bereits thematisiert kein repräsentatives Verfahren, als zusätzliches Kriterium unterstützt es jedoch ebenfalls diese These. Hier weist nur die Gegenüberstellung der Gruppen „nicht infiziert/nicht therapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“

einen signifikanten Unterschied auf. Zudem fällt die Hypopyonausprägung bei infizierten, therapierten Augen signifikant geringer aus als bei infizierten, nicht therapierten Augen. Erwähnenswert ist der Vergleich der Hypopyonstärke zwischen den Gruppen „infiziert/scheintherapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“. Bei infizierten, scheintherapierten Augen waren die Hypopya statistisch relevant weniger stark ausgeprägt als bei infizierten, nicht therapierten. Alleinige Rotlichteinwirkung scheint daher einen antibakteriellen Effekt zu haben. Dieser basiert Studien zufolge auf einer den Bakterien endogenen Produktion von ROS als Reaktion auf das Licht [Reznick et al., 2013], [Lipovsky et al., 2010].

Die Dokumentation des Infiltrationsmusters zeigte mehrheitlich eine durchgehende Invasion von Neutrophilen in das Hornhautstroma. In dieser Kontinuität konnte zudem häufig eine stärkere Ansammlung von Entzündungszellen in der Peripherie der Hornhaut festgestellt werden. Dieses Muster traf vor allem auf die Gruppe „infiziert/therapiert“ zu. Die Gruppe „infiziert/scheintherapiert“ wies ebenfalls häufig dieses Muster auf. Bei den infizierten, nicht therapierten Augen stand eine durchgehend starke Infiltration der gesamten Hornhaut im Vordergrund. Eine mögliche Erklärung ist die bakterizide Wirkung ubiquitär vorkommenden sichtbaren Lichts auf die Hornhaut. Die periphere Abdeckung der Kornea durch Überlappung der Lider könnte eine Nische für die Erreger gebildet haben mit daraus resultierend verstärkten Inflammationszeichen in diesem Bereich. Eine zusätzliche posttherapeutisch anhaltende Aktivierung des penetrierten Fotosensitizers durch Tageslicht stützt diese Theorie. Der Effekt wäre sicher nur gering, in Hinblick auf die Verteilung des Infiltrationsmusters jedoch denkbar. Eine Zerstörung des Epithels musste ebenfalls in allen drei Gruppen bei allen Augen festgestellt werden und blieb somit auch bei Therapie nicht aus. Dieser Aspekt ist jedoch nur bedingt aussagekräftig, da 12 der 24 Tiere eine prätherapeutische Epithelentfernung mittels Hockeymesser erhielten, um die Penetration des Fotosensitizers zu erleichtern. Vom Crosslinking mit Riboflavin und UVA-Licht sind Ausdünnung des Hornhautepithels, stromale Ödembildung und Apoptose von Keratozyten als unmittelbare Therapiefolge bereits bekannt [Mazzotta et al., 2012]. Gleiche Effekte durch die PDI mit Chlorin e6 können an dieser Stelle nicht widerlegt werden. Ein weiterer Fakt, der nicht unterschlagen werden darf, ist die Zytotoxizität der ROS. Diese ist im Hinblick auf Bakterien zwar wünschenswert, doch gilt sie auch für Keratozyten. Es ist nicht auszuschließen, dass die Messwerte der maximalen Hornhautdicke infizierter, therapierter Augen auf eben genannte Nebenwirkungen zurückzuführen sind. Bei folgenden Untersuchungen bezüglich dieses Ansatzes sollten daher dringend weitere Messparameter evaluiert werden.

6.2.2. Diskussion der Ergebnisse der Therapie mit gNO

Die Hypothese des antiinflammatorischen Effekts konnte durch die durchgeführten Versuche am Auge nicht bewiesen werden.

Bei alleiniger Betrachtung der Messergebnisse zeigten sich wie auch bei der PDI-Versuchsreihe signifikant größere Hornhautdickenwerte bei infizierten, therapierten sowie infizierten, nicht therapierten Augen im Vergleich zu nicht infizierten, nicht therapierten Hornhäuten. Nicht nur diese Signifikanz, sondern auch die ca. doppelt so starke Verdickung der Hornhaut nach Therapie (+90 μm des Referenzwerts), verglichen mit den Kontrolltieren (+44 μm des Referenzwerts), spricht deutlich gegen die erhoffte Wirkung. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „infiziert/therapiert“ und „infiziert/nicht therapiert“ blieb jedoch aus. Die Analyse des Infiltrationsschemas ergab ein eher kontinuierliches Muster mit zentral verstärkt infiltrierten Arealen.

In einer bereits durchgeführten Studie [Miller et al., 2013] wurde die Auswirkung von gNO auf *Pseudomonas aeruginosa* assoziierte Pneumonien bei Ratten verfolgt. Eine Minderung der Entzündungsparameter konnte auch in jener Studie nicht belegt werden. Jedoch wurde durch die Therapie mit gNO eine Reduktion der Bakterienlast bewiesen. Da für die hier vorliegende Studie der Schwerpunkt auf der histologischen Auswertung lag und die Bakterienlast nicht anhand einzelner histologischer Schnitte bestimmt werden kann, besteht also die Möglichkeit, dass auch in diesem Fall die Bakterienzahl trotz ausbleibendem antiinflammatorischen Effekt abnahm.

Ein Aspekt, der in dieser Studie nicht verfolgt wurde, ist die durch NO getriggerte Angiogenese [Ghaffari et al., 2006]. Damit die Hornhaut ihre Funktion erfüllen kann, ist sie avaskulär. Bei den Voruntersuchungen sowie auch bei der Auswertung der infizierten, therapierten Augen wurden diesbezüglich keine Anzeichen der Angiogenese beobachtet. Untermauert werden diese Beobachtungen durch eine bereits in der Einleitung unter 3.5. aufgeführten *in vitro* Studie [Ghaffari et al., 2007]. Im Falle weiterer Untersuchungen zu diesem Konzept müsste dennoch ein Augenmerk darauf gelegt werden.

6.2.3. Vergleich der Gruppen

Bei der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse der zwei durchgeführten Versuchsreihen fielen einige interessante Sachverhalte auf, welche im Folgenden kurz erläutert werden.

Das Gesamtbild der Augen der gNO-Versuche war im Vergleich zu jenen der PDI-Versuche deutlich besser. Die Ausprägung von Hypopya war in der gNO-Versuchsreihe generell schwächer als bei den PDI-Versuchen. Ebenso war der Epithelzellverlust weniger stark ausgeprägt. Im Falle der gNO-Therapie hielten sich intaktes und zerstörtes Epithel die Waage. Bei infizierten, nicht therapierten Augen war überwiegend intaktes Epithel nachweisbar. Bei zwei gNO-therapierten Augen konnte sogar eine komplette „Ausheilung“ der Infektion beobachtet werden. Von statistischer Relevanz kann jedoch nicht gesprochen werden, da auch die Kontrolltiere über den Beobachtungszeitraum hinweg deutliche Heilungstendenzen zeigten und eine therapieunabhängige „Genesung“ nicht ausgeschlossen werden kann. Ursächlich hierfür muss zum einen die schwächere Ausgangsinfektion in dieser Versuchsreihe und zum anderen die Dauer des Beobachtungszeitraums angesehen werden. Bei eben jenen Tieren mit starker Ausheilungstendenz betrug die Observation bis zum Zeitpunkt der Tötung sieben statt drei Tage. Eine eindeutige Differenzierung zwischen Therapieerfolg und inerter Immunantwort ist nach sieben Tagen nicht mehr möglich. Für die PDI wurde deshalb ein Observationszeitraum von nur drei Tagen gewählt. In der Literatur werden Beobachtungszeiträume von 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen beschrieben [Girgis et al., 2003]. Ein direkter Therapieeffekt sowie über längeren Zeitraum wirkende, dem Organismus eigene Heilungsmechanismen, können auf diese Weise genauer erfasst werden.

Bei nahezu allen Präparaten der PDI-Versuche konnte außerdem ein proteinreiches Exsudat in der Vorderkammer nachgewiesen werden, welches in der gNO-Versuchsreihe ausblieb. Diese Tatsache ist ein weiterer Indikator dafür, von welcher Wichtigkeit eine identisch starke Infektion im Hinblick auf die Auswertungsparameter ist.

Spannend ist das unterschiedliche Infiltrationsmuster der zwei Versuchsreihen. Durchweg konnte bei der PDI-Versuchsreihe wie oben beschrieben ein vorwiegend kontinuierlich, peripher akzentuiertes Muster beschrieben werden, wohingegen in der gNO-Versuchsreihe ausschließlich zentral verstärkte Entzündungsherde bei durchgehender Grundinfiltration vorlagen. Erklärungsversuche für ersteres wurden bereits aufgeführt. Für die zentrale Häufung könnte der austrocknende Effekt durch die NO-Begasung verantwortlich gemacht werden, der peripher durch Lidbedeckung geringer war. Ein weiterer Aspekt ist das unterschiedliche Alter der Versuchstiere. Die jüngeren gNO-Versuchstiere waren immunkompetenter als die PDI-Versuchstiere, was sich auch an der Stärke der Infektion unter gleichen Infektionsbedingungen widerspiegelte.

6.3. Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich der antientzündliche Effekt der gNO-Therapie im hier durchgeführten Modell nicht bewahrheitete. Da ihr antibakterielles Potential jedoch bereits in der Wundheilung [Ghaffari et al., 2007] und Lungenforschung [Miller et al., 2013] erprobt und eingesetzt wurde, sollte der Therapieansatz weiterhin auch in der Augenheilkunde in Erwägung gezogen und Untersuchungen vorangetrieben werden.

Die Photodynamische Inaktivierung mit Chlorin e6 zeigte eine statistisch validierte Wirkung. Zwar sind die vorliegenden Ergebnisse noch kein Ausdruck einer klinischen Heilung der bakteriellen Keratitis, dennoch dienen sie als erste Hinweise dafür, dass die PDI mit Chlorin e6 einen potenziellen Therapieansatz darstellt. Es müssen weitere Studien mit größeren Fallzahlen durchgeführt werden, um die Chlorin e6-Konzentration zu optimieren. Außerdem sollte der Beobachtungszeitraum verlängert werden, um Therapieverlauf und natürlichen Heilungsverlauf besser einschätzen zu können. Sinnvoll wäre eine Erweiterung der Auswertungsparameter auf die Quantifizierung proteinreichen Exsudats oder Zellzählung der Neutrophilen wie nach GIRGIS, um ein besseres Gesamtbild über den Zustand des Auges zu erhalten. Der Therapiezeitpunkt 24 Stunden post infectionem scheint in Betracht auf eine zukünftige klinische Anwendung sinnvoll und sollte keinesfalls vorher angesetzt werden, da Patienten meist erst bei voller Symptomausprägung einen Arzt aufsuchen.

Abschließend ist zu sagen, dass das Gesamtbild der Augen, die mit PDI behandelt wurden, noch nicht zufriedenstellend war. Dennoch können die Ergebnisse dieser Studie richtungsweisend für eine neue Therapieform der bakteriellen Keratitis sein. Dies wäre durch nachfolgende Studien erneut zu verifizieren und weiterzuentwickeln.

7. Literaturverzeichnis

1. Aldebasi YH, Mohamed HA, Aly SM (2014) *Histopathological Studies on Rabbits Infected by Bacteria Causing Infectious Keratitis in Human through Eye Inoculation*. Int J Health Sci. 8:257-67.
2. Chang VS, Dhaliwal DK, Raju L, Kowalski RP (2015) *Antibiotic Resistance in the Treatment of Staphylococcus aureus Keratitis: a 20-Year Review*. Cornea. 34:698-703.
3. Chuang CC, Hsiao CH, Tan HY, Ma DH, Lin KK, Chang CJ, Huang Y (2012) *Staphylococcus aureus ocular infection: methicillin-resistance, clinical features, and antibiotic susceptibilities*. PLoS One. 8:e42437.
4. Dai T, Huang YY, Hamblin MR (2009) *Photodynamic therapy for localized infections--state of the art*. Photodiagnosis Photodyn Ther. 6:170-88.
5. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, Leaper D, Georgopoulos NT (2015) *Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process*. Int Wound J., in press.
6. Fang FC (1997) *Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity*. J Clin Invest. 99:2818-25.
7. Ghaffari A, Miller CC, McMullin B, Ghahary A (2006) *Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent*. Nitric Oxide. 14:21-9.
8. Ghaffari A, Jalili R, Ghaffari M, Miller C, Ghahary A (2007) *Efficacy of gaseous nitric oxide in the treatment of skin and soft tissue infections*. Wound Repair Regen. 15:368-77.
9. Girgis DO, Sloop GD, Reed JM, O'Callaghan RJ (2003) *A new topical model of Staphylococcus corneal infection in the mouse*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 44:1591-7.

10. Girgis DO, Sloop GD, Reed JM, O'Callaghan RJ (2004) *Susceptibility of aged mice to Staphylococcus aureus keratitis*. Curr Eye Res. 29:269-75.
11. Grehn F (2008) *Augenheilkunde*. 30. Aufl. , Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 118-120, 195.
12. Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S (eds) (2009) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 192-199, 275-278, 803-807, 849-851
13. Hazlett LD, McClellan S, Kwon B, Barrett R (2000) *Increased severity of Pseudomonas aeruginosa corneal infection in strains of mice designated as Th1 versus Th2 responsive*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 41:805-10.
14. Lee JE, Sun Y, Gjorstrup P, Pearlman E (2015) *Inhibition of Corneal Inflammation by the Resolvin E1*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 56:2728-36.
15. Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A, Lubart R (2010) *Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: implication for wound healing*. Lasers Surg Med. 42:467-72.
16. Matthaei M, Meng H, Bhutto I, Xu Q, Boelke E, Hanes J, Jun AS (2012) *Systematic assessment of microneedle injection into the mouse cornea*. Eur J Med Res. 17:19.
17. Mazzotta C, Caporossi T, Denaro R, Bovone C, Sparano C, Paradiso A, Baiocchi S, Caporossi A (2012) *Morphological and functional correlations in riboflavin UV A corneal collagen cross-linking for keratoconus*. Acta Ophthalmol. 90:259-65.
18. Miller CC, Hergott CA, Rohan M, Arsenault-Mehta K, Döring G, Mehta S (2013) *Inhaled nitric oxide decreases the bacterial load in a rat model of Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. J Cyst Fibros. 12:817-20.
19. Mitton D, Ackroyd R (2008) *A brief overview of photodynamic therapy in Europe*. Photodiagnosis Photodyn Ther. 5:103-11.

20. Papaioannou L, Miligkos M, Papathanassiou M (2016) *Corneal Collagen Cross-Linking for Infectious Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Cornea*. 35:62-71.
21. Park JH, Moon YH, Bang IS, Kim YC, Kim SA, Ahn SG, Yoon JH (2010) *Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6*. *Lasers Med Sci*. 25:705-10.
22. Pinto JG, Pereira AH, de Oliveira MA, Kurachi C, Raniero LJ, Ferreira-Strixino J (2016) *Chlorin E6 phototoxicity in L. major and L. braziliensis promastigotes-In vitro study*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 15:19-24.
23. Rajaiya J, Zhou X, Barequet I, Gilmore MS, Chodosh J (2015) *Novel model of innate immunity in corneal infection*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 51:827-34.
24. Rasoulinejad SA, Sadeghi M, Montazeri M, Hedayati Goudarzi H, Montazeri M, Akbarian N (2014) *Clinical Presentation and Microbial Analyses of Contact Lens Keratitis; an Epidemiologic Study*. *Emerg*. 2:174-7.
25. Rautaraya B, Sharma S, Ali MH, Kar S, Das S, Sahu SK (2014) *A 3½-Year Study of Bacterial Keratitis From Odisha, India*. *Asia Pac J Ophthalmol*. 3:146-50.
26. Ren M, Wu X (2010) *Evaluation of three different methods to establish animal models of Acanthamoeba keratitis*. *Yonsei Med J*. 51:121-7.
27. Reznick Y, Banin E, Lipovsky A, Lubart R, Polak P, Zalevsky Z (2013) *The synergistic effect of visible light and gentamycin on Pseudomona aeruginosa microorganisms*. *J Vis Exp*. 77:e4370.
28. Romanowski EG, Kowalski TA, O'Connor KE, Yates KA, Mah FS, Shanks RM, Kowalski RP (2016) *The In Vitro Evaluation of Tigecycline and the In Vivo Evaluation of RPX-978 as an Ocular Antibiotic*. *J Ocul Pharmacol Ther*. 32:119-26.

29. Sanfilippo CM, Morrissey I, Janes R, Morris TW (2016) *Surveillance of the Activity of Aminoglycosides and Fluoroquinolones Against Ophthalmic Pathogens from Europe in 2010-2011*. Curr Eye Res. 41:581-9.
30. Schilde T, Kohlhaas M, Spoerl E, Pillunat LE (2008) *Enzymatischer Nachweis der Tiefenabhängigkeit der Vernetzungswirkung von Riboflavin/UVA an der Hornhaut*. Ophthalmologe. 105:165-9.
31. Schrier A, Greebel G, Attia H, Trokel S, Smith EF (2009) *In vitro antimicrobial efficacy of riboflavin and ultraviolet light on Staphylococcus aureus, methicillin-resistant Staphylococcus aureus, and Pseudomonas aeruginosa*. J Refract Surg. 25:799-802.
32. Siddiqui R, Lakhundi S, Khan NA (2015) *Status of the effectiveness of contact lens solutions against keratitis-causing pathogens*. Cont Lens Anterior Eye. 38:34-8.
33. Simon C, Wolf G, Walther M, Winkler K, Finke M, Hüttenberger D, Bischoff M, Seitz B, Cullum J, Foth HJ (2014) *Photodynamic inactivation of pathogens causing infectious keratitis*. Proc. SPIE 8931, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXIII, 89310T.
34. Skaat A, Zadok D, Goldich Y, Varssano D, Berger Y, Ezra-Nimni O, Avni I, Barequet IS (2014) *Riboflavin/UVA photochemical therapy for severe infectious keratitis*. Eur J Ophthalmol. 24:21-8.
35. Song X, Stachon T, Seitz B, Wang J, Bischoff M, Langenbacher A, Janunts E, Szentmáry N (2015) *Effekt photodynamischer Inaktivierung (PDI) mit Riboflavin oder riboflavinkonjugierten Antikörpern gegen Staphylococcus aureus*. Klin Monbl Augenheilkd. 232:988-92.
36. St Denis TG, Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR, Tegos GP (2011) *All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease*. Virulence. 2:509-20.

37. Stachon T, Wang J, Song X, Langenbacher A, Seitz B, Szentmáry N (2015) *Impact of crosslinking/riboflavin-UVA-photodynamic inactivation on viability, apoptosis and activation of human keratocytes in vitro*. J Biomed Res. 29:321-5.
38. Szentmáry N, Goebels S, Bischoff M, Seitz B (2012) *Photodynamische Therapie bei infektiöser Keratitis*. Der Ophthalmologe. 109:165-170
39. Tal K, Gal-Or O, Pillar S, Zahavi A, Rock O, Bahar I (2015) *Efficacy of Primary Collagen Cross-Linking with Photoactivated Chromophore (PACK-CXL) for the Treatment of Staphylococcus aureus-Induced Corneal Ulcers*. Cornea. 34:1281-6.
40. Wainwright M (1998) *Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)*. J Antimicrob Chemother. 42:13-28.
41. Wang J, Stachon T, Eppig T, Langenbacher A, Seitz B, Szentmáry N (2013) *Impact of photodynamic inactivation (PDI) using the photosensitizer chlorin e6 on viability, apoptosis, and proliferation of human keratocytes in vitro*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 251:2725-31.
42. Winkler K, Simon C, Finke M, Bleses K, Birke M, Szentmáry N, Hüttenberger D, Eppig T, Stachon T, Langenbacher A, Foth HJ, Herrmann M, Seitz B, Bischoff M (2016) *Photodynamic inactivation of multidrug-resistant Staphylococcus aureus by chlorin e6 and red light ($\lambda=670\text{nm}$)*. J Photochem Photobiol B. 162:340-7.
43. WHO *10 facts about blindness and visual impairment*. (Aug. 2014) URL: <http://www.who.int/features/factfiles/blindness/en/> (Stand: 20.11.2015).
44. Wu MF, Deichelbohrer M, Tschernig T, Laschke MW, Szentmáry N, Hüttenberger D, Foth HJ, Seitz B, Bischoff M (2017) *Chlorin e6 mediated photodynamic inactivation for multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa keratitis in mice in vivo*. Scientific Reports, im Druck.
45. Zhang H, Wang L, Xie Y, Liu S, Deng X, He S, Chen G, Liu H, Yang B, Zhang J, Sun S, Li X, Li Z (2013) *The measurement of corneal thickness from center to limbus in*

vivo in C57BL/6 and BALB/c mice using two-photon imaging. Exp Eye Res. 115:255-62.

8. Publikationen

Artikel

Deichelbohrer M, Wu MF, Seitz B, Wagenpfeil S, Meier C, Bischoff M, Tschernig T (2017) *Gaseous nitric oxide for the local treatment of bacterial keratitis in mice*. Biomedical Reports. 6: 75-78.

Deichelbohrer M, Wu MF, Seitz B, Hüttenberger D, Laschke MW, Foth HJ, Wonnenberg B, Wagenpfeil S, Meier C, Bischoff M, Tschernig T (2017) *Bacterial keratitis – photodynamic inactivation reduced experimental inflammation*. Experimental and Therapeutic Medicine, im Druck.

Wu MF, **Deichelbohrer M**, Tschernig T, Laschke MW, Szentmáry N, Hüttenberger D, Foth HJ, Seitz B, Bischoff M (2017) *Chlorin e6 mediated photodynamic inactivation for multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa keratitis in mice in vivo*. Scientific Reports, im Druck.

Posterpräsentation

Deichelbohrer M, Wu MF, Wonnenberg B, Meier C, Hüttenberger D, Foth HJ, Laschke MW, Bischoff M, Seitz B, Tschernig T (2016) *Photodynamic inactivation is a success in reducing inflammation in a mouse model of bacterial keratitis in contrast to nitric oxide*. Posterpräsentation beim 114. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), 29.9.-2.10. 2016 Berlin.

9. Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. B. Seitz für die Ermöglichung dieses Projekts bedanken. Ein großer Dank geht an die Projektleiter Herrn Prof. Dr. M. Herrmann und Herrn Prof. Dr. M. Bischoff für Räumlichkeiten, Utensilien und Hilfestellung bei der Versuchsdurchführung. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Menger und Herrn Prof. Dr. M. Laschke für die Unterstützung dieses Projekts.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig. Er unterstützte mich von Anfang bis Ende und hat mich immer wieder aufs Neue motiviert. Ich konnte immer auf ihn zählen. Ohne ihn wäre diese Arbeit nie entstanden.

Für die Versuchsdurchführung bedanke ich mich bei Herrn Ming-Feng Wu, der den mikrobiologischen Teil dieser Studie übernommen hat.

Vielen lieben Dank an das Team in der Histologie, allen voran Marion Schwarz und Ingrid Lang, für das nicht immer einfache Herstellen der Schnittpräparate und die kontinuierliche Unterstützung. Kein geringerer Dank gilt Ann Soether, die mir bei englischen Formulierungen stets zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. S. Wagenpfeil danke ich für seinen Rat hinsichtlich der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein Dank gilt außerdem den Tierpflegern der Experimentellen Chirurgie für die gute Versorgung unserer Versuchstiere.

Danken möchte ich auch Angela Heller, die mein Leben lang für mich da war.

Abschließend will ich meinen Eltern von ganzem Herzen für ihre ausdauernde Unterstützung, Rückhalt, Geduld und Vertrauen danken.