

Antimikrobielle Therapie der Hornhaut
Die Pharmakokinetik in der lokalen Therapie und
ihre Optimierung durch den Mikrotrepan
- am Beispiel von Ciprofloxacin und PVP-Jod -

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Henrike Wüstemeyer
aus
Düsseldorf

Berichter: Herr Privatdozent
Dr. med. Norbert Schrage

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Martin Reim

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Gliederung der Gesamtstudie.....	1
1.2	Struktur der Studie	1
1.3	Das Auge – Sonderstellung im Organismus	1
1.3.1	Medikamente am Auge	2
1.3.2	Penetration in das Auge	3
1.3.3	Die Hornhaut als Barriere	3
1.3.4	Die Blut-Kammerwasser-Schranke	3
1.3.5	Augentropfen.....	3
1.4	Ziel der Arbeit.....	4
2	Material und Methoden.....	6
2.1	Ciprofloxacin.....	6
2.1.1	Medikamentengruppe	6
2.1.2	Chemie, Strukturformel.....	6
2.1.3	Wirkungsmechanismus / Pharmakodynamik	7
2.1.4	Wirkungsspektrum / antibakterielle Aktivität	8
2.1.5	Resistenzbildung	8
2.1.6	Löslichkeit.....	9
2.1.7	Metaboliten des Ciprofloxacin	10
2.2	Polyvidon-Jod (PVP-Jod).....	10
2.2.1	Chemie und Wirkmechanismus	11
2.2.2	Wirkungsspektrum und klinische Anwendung	11
2.2.3	Resistenzen.....	12
2.2.4	Penetration in die Hornhaut.....	13
2.2.5	Toxizität	13
2.3	Augentropfen.....	14
2.4	Mikrotrepan.....	14
2.4.1	Indikation	15
2.4.2	Anwendung.....	16
2.4.3	Alternativmethoden.....	16
2.5	NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance).....	17

2.5.1	Einleitung	17
2.5.2	Funktionsprinzip	18
2.5.3	Resonanz-Absorption.....	18
2.5.4	Rf-Puls, Relaxation, FID	19
2.5.5	NMR-Spektrum.....	19
2.5.6	Interaktionen.....	20
2.5.7	Elektromagnet.....	20
2.5.8	Verarbeitungsmethoden.....	20
2.5.9	Interpretation der Spektre und quantitative Analyse	21
2.5.10	Meßbedingungen.....	22
2.5.11	Ophthalmologische Anwendung	23
2.6	EDXA (energy dispersive X-ray analysis).....	24
2.6.1	Rasterelektronenmikroskop (REM).....	24
2.6.2	EDXA	25
2.6.3	Mapping	30
2.7	Versuchsaufbau.....	31
2.7.1	Versuchsdurchführung.....	32
2.7.2	Vom Präparat zur Probe	33
2.7.3	Feuchtgewicht (FG), Trockengewicht (TG), Osmolarität.....	34
2.7.4	Makroskopische Beurteilung	35
2.7.5	Histologie	35
3	Ergebnisse	36
3.1	NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance).....	36
3.1.1	Ciprofloxacin-Spektren.....	36
3.1.2	NMR-Spektroskopie der Kaninchenaugen.....	41
3.2	EDXA	46
3.2.1	Phosphatkonzentrationen im Vergleich.....	47
3.2.2	Chlorkonzentrationen im Vergleich	49
3.2.3	Jodkonzentrationen.....	51
3.3	Mapping	55
3.4	FG, TG, Osmolarität.....	57
3.4.1	Feuchtgewicht, Trockengewicht, Hydratation, Osmolarität.....	57
3.5	Makroskopische Beurteilung	58

3.5.1	Präzipitation von Ciprofloxacin	58
3.6	Histologie	59
4	Diskussion.....	62
4.1	NMR-Spektroskopie	62
4.1.1	Methodik	62
4.1.2	Ciprofloxacin-NMR-Spektroskopie	62
4.1.3	NMR-Spektroskopie der Kaninchenaugen.....	65
4.1.4	Metabolite des Ciprofloxacin unter topischer Therapie?.....	66
4.1.5	Tropfschema für Ciprofloxacin – Auswirkungen auf die Ergebnisse	66
4.2	EDXA.....	68
4.2.1	EDXA in der Ophthalmologie	68
4.3	Mikrotrepan.....	70
4.3.1	Hornhautbiopsie in der ophthalmologischen Diagnostik	70
4.3.2	Der Mikrotrepan in der Therapie	70
4.4	PVP-Jod.....	72
4.4.1	Effektivität und Toxizität	72
4.4.2	Penetration und Nachweisgrenze	73
4.5	Mapping	74
4.6	Makroskopie und Histologie.....	75
4.6.1	FG, TG, Hydratation, Osmolarität	75
4.6.2	Präzipitation von Ciprofloxacin	75
4.7	Histologie	76
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	77
6	Literatur	78
7	Anhang.....	I
7.1	Feuchtgewicht, Trockengewicht, Osmolarität.....	I
7.2	Meßeinstellungen der NMR-Spektroskopie	II
7.3	EDXA Standards und Ergebnisse.....	III
8	Danksagung	XXIX
9	Lebenslauf	XXX

Abkürzungsverzeichnis

ADC	Analog-to-digital-converter
B ₀	Magnetisches Feld
B ₁	durch Radiofrequenz-Puls induziertes magnetisches Feld
Beta	Betaisodona (11% PVP-Jod)
Cipro	Ciprofloxacin
COSY	Homonuclear (chemical shift) correlated spectroscopy
Count	Anzahl detektierter EDXA-Signale
D ₂ O	Deuteriumoxid
DSM	Digital scanning microscope
EDXA	Energy dispersive X-ray analysis
et al.	et alii / alia
FG	Feuchtgewicht
FID	Free induction decay
GFE	Gemeinschaftsinstitut für Elektronenmikroskopie (RWTH Aachen)
HF	Hexafluorbenzen
HH	Hornhaut
HOD	Wasser-Deuterium
HPLC	High pressure liquid chromatography
Hz	Hertz
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JFC	Kopplungskonstante zwischen Fluor- und Kohlenstoffatomen
KeV	Kilo-Elektronenvolt
KPL	Keratoplastik
KW	Kammerwasser
M	Mol, molar
M ₀	Netzmagnetisierung
MBK	= MBK: minimale bakterizide Konzentration
MIC	= MHK: minimale Hemmkonzentration
MR	Magnetic resonance
mT/B	mit Trepanation, mit PVP-Jod (Betaisodona) behandelt
mT/C	mit Trepanation, mit Ciprofloxacin behandelt
NaCl	Natriumchlorid
NMR	Nuclear magnetic resonance
NTNU	Norwegische Technische und Naturwissenschaftliche Universität Trondheim
oT/B	ohne Trepanation, mit PVP-Jod (Betaisodona) behandelt
oT/C	ohne Trepanation, mit Ciprofloxacin behandelt
P/B	Peak-Background-Quotient
PCA	Perchloroessigsäure
PCR	Polymerase chain reaction
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
ppm	parts per million
PVP	Polyvinylpyrrolidon (N-vinyl-2-pyrrolidone)
REM	Rasterelektronenmikroskop
Rf-Puls	Radiofrequenz-Puls
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
SE	Sekundärelektronenrückstreubild in der EDXA
Sub-Epi	Subepithel
TFA	Trifluoroacetic acid = Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
TSP	Natrium-3'-trimethylsilylpropionat-2,2,3,3-d ₄
V.a.	Verdacht auf
Vor-Desc.	Vor-Descemet

1 Einleitung

1.1 Gliederung der Gesamtstudie

Die Grundlage dieser Arbeit ist eine zweiteilige Studie, deren erster Teil im Rahmen eines Erasmus-Austauschprogramms an der Augenklinik der NTNU in Trondheim, Norwegen, unter der Betreuung von Frau Prof. A. Midelfart, und deren zweiter Teil an der Augenklinik der RWTH Aachen unter der Betreuung von Herrn PD Dr. med. N.F. Schrage entstand.

Die gemeinsamen Ansätze beider Teile bestehen in dem Vergleich von Meßmethoden bei der Betrachtung des vorderen Augenabschnitts. Ebenfalls im Fokus beider Studienabschnitte steht die antimikrobielle Therapie bei Erkrankungen der Hornhaut und die Untersuchung der Pharmakokinetik von antimikrobiell wirksamen Substanzen. Die Schwerpunkte der jeweiligen Studienteile sind unterschiedlich gelagert. In Trondheim betrachten wir die NMR-Spektroskopie als Analysemethode für fluorhaltige Medikamente am Beispiel von Ciprofloxacin. In Aachen haben wir den Mikrotrepan mit der Frage nach seiner Eignung als therapeutisches Instrumentarium in den Mittelpunkt der Untersuchungen gestellt. Hier dient Polyvidon-Jod (PVP-Jod, 11%) als Marker- und Referenzsubstanz zum Ciprofloxacin.

1.2 Struktur der Studie

Es sind zwei Hauptachsen abzugrenzen. Zum einen betrachten wir die **Methodik**, die EDX Analyse (EDXA = **E**nergy **D**ispersive **X**-ray-**A**alysis) und die NMR-Spektroskopie (NMR = **N**uclear **M**agnetic **R**esonance) mit ihren jeweiligen Qualitäten bei der Untersuchung der Hornhaut, bzw. der Hornhaut, des Kammerwassers und der Linse. Die zweite Achse beschäftigt sich mit der **Pharmakokinetik**. Hier haben wir zunächst *Ciprofloxacin* untersucht. Dabei treffen wir wieder auf die methodische Achse mit der Frage, wie sich Ciprofloxacin im Auge mit den erwähnten Meßmethoden nachweisen läßt und wie weit Ciprofloxacin in das Auge penetriert. Daran schließt sich die Frage nach dem Metabolismus von Ciprofloxacin. Findet er schon im Auge statt, und lassen sich Metabolite nachweisen? Schließlich haben wir im Vergleich von Ciprofloxacin und *PVP-Jod* untersucht, wie sich die Penetration in das Auge, besonders in die Hornhaut, optimieren läßt, und zwar unter besonderer Fokussierung auf den *Mikrotrepan* (Schrage et al. 1996) und der Frage nach seinem therapeutischen Nutzen.

1.3 Das Auge – Sonderstellung im Organismus

Bedingt durch seine Lage im Organismus und durch seine Funktion nimmt das Auge eine Sonderstellung in der medizinischen Versorgung ein.

Der Lidreflex und die epithelisierten Oberflächen von Hornhaut und Bindehaut schützen das Auge vor äußeren Einflüssen mechanischer, physikalischer und chemischer Art. Das Kammerwasser, das aus dem Blutplasma filtriert wird, unterliegt in seiner Zusammensetzung den Regeln der intakten Blut-Kammerwasser-Schranke. Das bedeutet für intravenös oder oral verabreichte Medikamente, dass sie für den Übertritt in das Kammerwasser geeignet sein müssen (Reim).

Es ist für die medikamentöse Behandlung am Auge von Vorteil, dass es möglich ist, lokal und nah am Ort der Erkrankung Wirkstoffe zu applizieren, ohne den systemischen Kreislauf wesentlich zu belasten. Um jedoch systemische Nebenwirkungen z.B. bei antibiotischen Augentropfen vollständig zu vermeiden, müssen nicht resorbierbare Augentropfen appliziert werden. Bei resorbierbaren Antibiotika kann es zu einer systemischen Sensibilisierung kommen (Reim). Um das Innere des Auges zu erreichen, müssen Wirkstoffe dann intraokular appliziert werden, wenn weder die Akkumulation des topisch applizierten Wirkstoffs, noch die des systemisch applizierten Medikaments intraokular ausreichend hoch wird.

1.3.1 Medikamente am Auge

Zu den Medikamenten, die am häufigsten am Auge verwendet werden, zählen Kortikosteroide und Antibiotika in Form von Augentropfen oder Augensalben, bedingt dadurch, dass häufig eine Unterdrückung immunologisch-allergischer bzw. bakteriell bedingter Entzündungen angezeigt ist (Reim).

Verschiedene Fertigungen antibiotischer Augentropfen und Augensalben können je nach Problemstellung ausgewählt werden. Bei Entzündungen des vorderen Augenabschnittes (z.B. bakteriellen Keratitiden) und auch intraokular, erreichen absorbierbare Antibiotika bakterizide Konzentrationen am Wirkort. Das Antibiotikum Ciprofloxacin, das in 0,3%-iger Lösung als Augentropfen verwendet wird, verbindet ein breites Wirkspektrum mit guter Resorbierbarkeit (Celebi et al.; McDermott et al.; Leibowitz).

Für oberflächliche Bindehautentzündungen stehen nicht resorbierbare Antibiotika zu Verfügung, die zwar eine lokale Reizung und Unverträglichkeit an der Bindehaut, jedoch keine systemische Sensibilisierung hervorrufen können (Reim). Abhängig vom Ort der Infektion können wässrige Lösungen der Wirkstoffe auch intraokular injiziert werden, z.B. intravitreal bei Endophthalmitiden oder intracameral. Um eine Depotwirkung zu erzielen, werden vor allem bei der Behandlung mit Steroiden subkonjunktivale Injektionen vorgenommen.

1.3.2 Penetration in das Auge

Die Penetration eines Wirkstoffs in das Auge wird von verschiedenen Faktoren begrenzt, die zum einen durch die Anatomie und Physiologie der okulären Strukturen, und zum anderen durch die chemische Struktur des Wirkstoffs und seiner Trägerstoffe bedingt sind.

Hornhaut und Bindehaut bieten eine große Oberfläche, die zur Resorption zur Verfügung steht. Wenn allein die Hornhaut Ziel der Behandlung sein soll, bedeutet es jedoch einen Verlust von Wirkstoff, wenn sich der Wirkstoff auch über die Bindehaut verteilt. Gerade Augentropfen verteilen sich aber unter normalen Applikationsbedingungen schnell und gleichmäßig über die vordere Augenoberfläche. Die Tropfen werden in den unteren Fornix eingetropfelt und das Auge dann geschlossen, um die Lösung zu verteilen. Mit jedem Lidschlag bewirkt der Tränenfluß, dass die applizierte Lösung verdünnt und über die Tränenpunkte abtransportiert wird. Unverträglichkeiten in Form von Reizungen des Auges oder allergischen Reaktionen gegen den Wirkstoff selbst oder ein Lösungsmittel begrenzen die Therapie (Maurice et. al).

1.3.3 Die Hornhaut als Barriere

Das Epithel der Hornhaut ist 5-7schichtiges, nicht verhornendes Plattenepithel. Desmosomen zwischen den Epithelzellen und Zonulae occludentes zwischen den Deckzellen sorgen für eine funktionierende Diffusionsbarriere. Diese besteht für niedermolekulare Substanzen, Wasser und Mikroorganismen, die das corneale Stroma und das Augeninnere schädigen könnten (Reim). Genauso besteht diese Barriere aber auch für einen Wirkstoff, der auf das Auge aufgetragen wird. Bei intaktem Hornhautepithel ist die Penetration eines Wirkstoffs deutlich geringer als bei beschädigtem Epithel (Ellerhorst et al.; Price et al.). Eine infektiöse Keratitis geht häufig mit einem Epitheldefekt einher. Es können sich bakterielle Prozesse aber auch unter intaktem Hornhautepithel abspielen (Newton et al.; Lee et al.).

1.3.4 Die Blut-Kammerwasser-Schranke

Im Vergleich zum Blut hat das Kammerwasser einen 3-4fach erhöhten Laktat- und Pyruvatspiegel, die Ascorbinsäure liegt 75mal höher. Dagegen ist der Gehalt an Protein im Kammerwasser gering und steigt typischerweise erst dann signifikant an, wenn die Blut-Kammerwasser-Schranke infolge penetrierender Verletzungen, Traumata oder Entzündungen, zusammengebrochen ist (Reim).

1.3.5 Augentropfen

Die am Auge verwendeten Tropfen sind meist wässrige Lösungen, die durch verschiedene Zusätze an die Bedingungen im Auge angepaßt werden können. Viskösere Tropfen neigen

weniger dazu, sofort nach der Applikation abzulaufen und können, wie z.B. Öle, besser an der Oberfläche haften. Organische Lösungen dienen dazu, wasserunlösliche Substanzen zu binden. Wichtig ist dabei, dass die Tropfen möglichst isoton und pH-neutral sind, weil damit die lokale Reizung gering gehalten werden kann (Reim). Ellerhorst et al. fanden anhand von Gentamicin (0,3%), dass die Effizienz einer antibiotischen Behandlung mit Augentropfen von dem Ort der Infektion, der Behandlungsdauer und Applikationsfrequenz, dem Grad der okulären Entzündung und der Sensitivität und Resistenzlage des Mikroorganismus abhängt.

Es ist erforderlich, dass am Wirkort des Medikamentes, z.B. eines Antibiotikums, über eine genügend lange Zeit eine Wirkstoffkonzentration über der minimalen Hemmkonzentration (MHK) des Erregers besteht, um die Infektion sicher zu behandeln. Dazu muß die Applikationsfrequenz genügend hoch sein.

Für Ciprofloxacin wird die erforderliche Dauer eines cornealen Konzentrationslevels über der MHK grampositiver Erreger auf 8-24 Stunden beziffert, um 99,9 % der Erreger zu eradizieren (Kowalski et al.).

1.3.5.1 Abbau des Wirkstoffs im Auge

Die nötige Applikationsfrequenz am Auge wird durch den beschleunigten Abtransport der Wirkstoffe mit dem Kammerwasser beeinflusst. Die Halbwertszeit für Ciprofloxacin beträgt dort nach einer Studie von O'Brien nur 1-2 Stunden (O'Brien et al.), im Blut beträgt sie 3-4 Stunden (Hooper et al.). Daher muß das Tropfschema für eine Behandlung entsprechend angepaßt, das heißt, das Tropfintervall verkürzt werden. Ein Ziel dieser Studie ist es, den Metabolismus von Ciprofloxacin im Auge zu erfassen.

Für PVP-Jod liegen noch keine solchen Untersuchungen vor.

1.4 Ziel der Arbeit

Wir möchten mit dieser Arbeit die NMR-Spektroskopie als Methode zum Nachweis von Ciprofloxacin im Auge etablieren. Der Nutzen der ¹⁹F-NMR-Spektroskopie hat sich bereits in der Untersuchung von Dexamethason und Dexamethason-Phosphat erwiesen (Midelfart et al. 1998). Aus der gleichen Arbeitsgruppe liegt auch die metabolische Analyse verschiedener Kompartimente des Auges mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie vor. Wir werden die Werte dieser Studien als Kontrolle für unsere Ergebnisse nutzen.

Das Fernziel dieser Studie ist die Entwicklung einer Methode, mit der die *in vivo* Detektion von entzündlichen Prozessen in der Hornhaut und die intraindividuelle Kontrolle des therapeutischen Fortschritts möglich ist.

Wir möchten am Beispiel von Ciprofloxacin und PVP-Jod, Aussagen zur Pharmakokinetik von antimikrobiellen Substanzen an der Hornhaut treffen. Es stellt sich die Frage, wie sich allgemeingültige pharmakokinetische Abläufe von spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Substanzen abgrenzen lassen.

Der Mikrotrepan, der von PD Dr. med. N.F. Schrage entwickelt wurde, wird in der Diagnostik von Hornhauterkrankungen bereits genutzt (Kompa et al. 1999). Wir untersuchen hier tierexperimentell sein therapeutisches Potential. Durch die Eröffnung des cornealen Stromas könnte sich ein zeitlicher und quantitativer Vorteil und ein Vorsprung für die topische Therapie ergeben.

2 Material und Methoden

2.1 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin ist als Fluorochinolon in der Augenheilkunde als Single-Drug-Therapie bei der Behandlung von Keratitiden und schweren Infektionen im Auge in klinischem Gebrauch. Es eignet sich aufgrund seiner Fluorierung an Position 6 des Moleküls zum Nachweis mit der ^{19}F -NMR-Spektroskopie.

2.1.1 Medikamentengruppe

Ciprofloxacin ist ein Antibiotikum und gehört zu der Gruppe der Fluorochinolone, die aus dem ersten Medikament dieser Art, Nalidixinsäure, entwickelt wurden. Als Gyrasehemstoffe greifen sie in den Replikationsmechanismus von Bakterien ein. Nalidixinsäure wurde erstmals 1962 synthetisiert, die sogenannten "Neuen Gyrasehemmer", zu denen auch Ciprofloxacin zählt, kamen in den späten 80er Jahren auf den Markt.

2.1.2 Chemie, Strukturformel

Abb. 2-1 zeigt die Strukturformel von Ciprofloxacin.

(1-Cyclopropyl-6-Fluoro-1,4-Dihydro-4-Oxo-7)-(1-Piperazinyl)-3-Chinolon

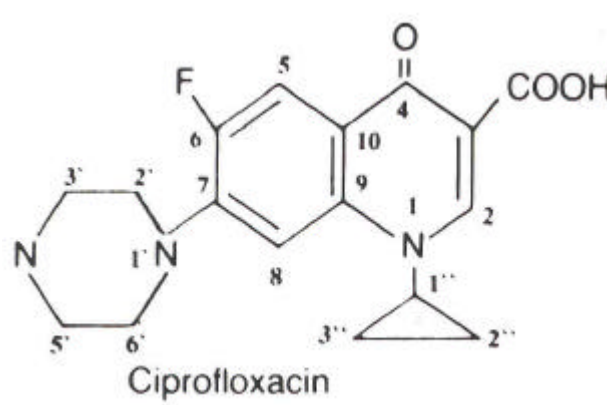


Abb. 2-1: Strukturformel Ciprofloxacin

Nalidixinsäure ist ein 1,8 Naphthyridin. Die neuen Chinolone bestehen aus einer bizyklischen Ringstruktur, wobei an der Position N1 ein variabler Rest hängt. Von diesem ist die Aktivität gegen grampositive Erreger sowie *Pseudomonas aeruginosa* abhängig. Im Falle von Ciprofloxacin ist dies eine Cyclopropylgruppe, die eine gute Aktivität gegen *P. aeruginosa* sowie *Enterobacteriaceae*, *Staphylokokken* und *Streptokokken* bewirken soll.

Ciprofloxacin hat in Position 7 eine Piperazingruppe. Ein Piperazinring, der eine 4-Methyl oder eine 3-Methyl-Gruppe enthält, wie z.B. bei Ofloxacin oder Perfloxacin, verbessert die Absorption bei oraler Applikation (Neu H. 1989).

Das Fluoratom in Position 6 macht in seiner Atommasse 5,79% des Ciprofloxacin-Moleküls aus.

2.1.3 Wirkungsmechanismus / Pharmakodynamik

Der Wirkungsmechanismus der Fluorochinolone zielt auf die DNA-Gyrase der Bakterien, die eine Topoisomerase Typ 2 ist. Sie besteht aus vier Untereinheiten - zwei A- und zwei B-Einheiten. Die Fluorochinolone interagieren mit der A-Untereinheit der DNA-Gyrase. Eine Interaktion mit der B-Einheit wird diskutiert (Yamagishi et al.). Die DNA-Gyrase greift bei der DNA-Replikation, der genetischen Rekombination, sowie bei der DNA-Reparation ein. In diesen Prozessen wandelt sie negative, superhelikale Stränge in kovalente, geschlossene, zirkuläre DNA um und schließt die DNA-Ringe reversibel.

Bindet ein Chinolon an eine Untereinheit der DNA-Gyrase, wird das Zusammenfügen der DNA-Stränge nach einem Bruch verhindert (Neu H 1989).

Einige Studien schlagen vor, dass die Hemmung der DNA-Synthese zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Protein-Biosynthese oder der DNA-Replikation stattfinden muss, um die niedrigen minimalen Hemmkonzentrationen (MIC) und minimalen bakteriziden Konzentrationen (MBC) bei *Escherichia coli* zu erklären. Auf diese Weise soll die bakterizide Wirkung in Verbindung mit einem SOS-Reparationsmechanismus eintreten, der von der Hemmung auf helikaler Ebene unabhängig ist (Smith et al.).

Andere Studien vermuten eine direkte Bindung der neueren Chinolone an die DNA, die mit der bakteriziden Wirkung in Verbindung stehen könnte (Neu H 1987).

Für einen Wirkungsmechanismus, der unabhängig von der Protein-Biosynthese ist, spricht die Tatsache, dass die neuen Chinolone im Gegensatz zur Nalidixinsäure auch in Gegenwart von Rifampicin und Chloramphenicol, die ihrerseits die Biosynthese hemmen, sowohl bakteriostatische als auch bakterizide Wirkung zeigen.

Hinsichtlich seiner antibakteriellen Aktivität ist Ciprofloxacin unter den Fluorochinolonen eines der aktivsten und effektivsten Medikamente (Chin et al.). Kowalski et al. sehen Ciprofloxacin bei topischer Anwendung am Auge gleich auf mit Ofloxacin. Die Konzentrationsbreite, in der Ciprofloxacin bakterizid wirkt, ist in den meisten Geweben des Körpers groß. Neben diesen Effekten besitzt Ciprofloxacin auch einen sogenannten "postantibiotischen Effekt", der bewirkt, dass Bakterienwachstum der nicht abgetöteten

Bakterien auch noch 2-6 Stunden nach dem Ciprofloxacin-Kontakt gehemmt wird (Neu H. 1987/1989). Cutarelli et al. bescheinigt Ciprofloxacin im Vergleich zu Gentamicin eine bessere *in vitro* Aktivität gegen gängige corneale Erreger und eine geringere Toxizität gegen das Hornhautepithel.

2.1.4 Wirkungsspektrum / antibakterielle Aktivität

Im Gegensatz zu den frühen Gyrasehemmern haben die neuen Fluorochinolone eine gute Wirkung gegenüber *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*-Arten und anderen (Cokington et al., Hobden et al.). Ciprofloxacin hemmt *in vitro* über 90% der *Enterobacteriaceae* schon in einer Konzentration von $<0,25 \mu\text{g/ml}$. In extrem niedrigen Konzentrationen von $<0,06 \mu\text{g/ml}$ hemmt Ciprofloxacin *Haemophilus*, *Neisseria* und *Moraxella* Spezies. Es hat keine Wirkung gegen Pilze und Viren (Neu H 1991). Ciprofloxacin zeigt gute Wirkung bei der Therapie bakterieller Keratitiden (Wilhelmus et al.).

Die Konzentration, die die bakteriostatische von der bakteriziden Wirkung trennt, unterscheidet sich nur um einen Faktor 2, das heißt, wo eine Konzentration von $0,12 \mu\text{g/ml}$ bakteriostatisch wirkt, tritt die bakterizide Wirkung bei $0,24 \mu\text{g/ml}$ ein.

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Aktivität der Fluorochinolone. Die antibakterielle Aktivität ist bei einem sauren pH 5,5 wesentlich schwächer als bei leicht alkalischem pH 7,4. In bakteriell infiziertem Gewebe liegt der pH im sauren Bereich und behindert damit die Wirkung des Antibiotikums.

Fluorochinolone können in der Therapie mit anderen Antibiotika kombiniert werden, ohne einen Wirkverlust zu erfahren. Es besteht bei der Behandlung einer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion ein synergistischer Effekt mit Ureidopenicillinen, Azlocillin und Piperacillin.

2.1.5 Resistenzbildung

Bei der Anwendung von Ciprofloxacin und anderen neuen Gyrasehemmern hat die Frequenz der "single-step" Resistenzbildung, im Vergleich zu den frühen Fluorochinolonen, zunächst stark abgenommen. Sie betrug nur noch $1 \cdot 10^{11}$ für *Enterobacteriaceae*, sowie $1 \cdot 10^9$ für *P. aeruginosa* und *Staph. aureus*. Ein besonderes Problem stellten Methicillin-resistente Stämme dar, die auch gegen Fluorochinolone zu einer schnellen Resistenzentwicklung neigten (hier vor allem *Staph. aureus* und *P. aeruginosa*). Insgesamt schien die Gefahr entstehender Resistenzen bei den hier besprochenen Antibiotika, auch verglichen mit anderen Antibiotika-Klassen, bisher sehr gering (Neu 1989).

Neuere Studien weisen nun auf eine verstärkte Resistenzbildung gegenüber Ciprofloxacin hin (Snyder et al.). Garg et al. berichtet über eine erhöhte Tendenz von *P. aeruginosa*-Stämmen,

Resistenzen auszubilden. Goldstein et al. hat eine steigende Resistenzbildung über einen Zeitraum von 4 Jahren bei *Staph. aureus* festgestellt. Beide kommen zu dem Schluß, dass eine Monotherapie mit Ciprofloxacin bei bakterieller Keratitis kritisch überdacht werden müsse. Alexandrakis et al. bestätigt eine über den Beobachtungszeitraum von 9 Jahren zunehmende Tendenz von *Staph. aureus* Resistenzen gegen Fluorochinolone auszubilden. Auch *in vitro* Versuche zeigen eine steigende Resistenz gegen Ciprofloxacin (Kunimoto et al.). Vor allem grampositive Kokken (32,5% resistent) und *Actinomyces* (35,1% resistent) zeigten sich hiervon betroffen. Bei der Therapie cornealer Ulcera ist diese Entwicklung als besonders kritisch zu sehen, weil *Pseudomonas aeruginosa* und *Staph. aureus* zu den häufigsten Erregern gehören. *Pseudomonas aeruginosa* findet sich häufig in Lösungen für Kontaktlinsen, Augentropfen und Augenkosmetika (Wang et al.).

2.1.6 Löslichkeit

Die Löslichkeit von Ciprofloxacinhydrochlorid in 100 ml Lösung bei 25° C beträgt:

Lösungsmittel		Löslichkeit (g/100ml)
Wasser	polar	3,5
Essigsäure		0,14
Ethanol		0,016
Methanol		0,21
Acetonitril		$2 \cdot 10^{-3}$
Ethylacetat		$6 \cdot 10^{-5}$
Hexan		$3 \cdot 10^{-5}$
Dichlormethan		$2 \cdot 10^{-4}$
Aceton		$1 \cdot 10^{-5}$

Abb. 2-2: Löslichkeit von Ciprofloxacin in Abhängigkeit von der Polarität des Solventen

Die Löslichkeit von Ciprofloxacinhydrochlorid steigt mit steigender Polarität des Solventen.

Die Löslichkeit von Ciprofloxacinhydrochlorid in wässrigen Lösungen bei variablen pH-Werten beträgt:

pH	Puffer	Löslichkeit (mg/ml)
7,80	Tris-Puffer (0,05 %)	0,086
6,66	Phosphat (0,05 M)	0,10
6,43	Carbonat (0,05 M)	0,094
6,05	Carbonat (0,05 M)	0,194
5,39	Carbonat (0,05 M)	0,430
5,20	Acetat (0,05 M)	1,17
5,00	Acetat (0,05 M)	3,56
4,60	Acetat (0,05 M)	15,0
4,42	Acetat (0,05 M)	20,0
4,13	Succinat (0,05 M)	32,5
3,78	Succinat (0,05 M)	> 20,0

Abb. 2-3: Löslichkeit von Ciprofloxacin in Abhängigkeit von dem pH-Wert des Solventen

Die Löslichkeit von Ciprofloxacinhydrochlorid steigt mit sinkendem pH-Wert einer wässrigen Lösung.

(Werte nach Alcon Norge)

2.1.7 Metaboliten des Ciprofloxacin

Nach einer Studie von Bacracheva et al., in der Ciprofloxacin als einzelne intravenöse Dosis appliziert wurde, wird der Wirkstoff zu 80% unverändert ausgeschieden, 10-20% werden aber metabolisiert, wobei die Metaboliten pharmakologisch genauso aktiv sein sollen, wie die Ausgangssubstanz. Darunter ist bei intravenöser Applikation das Oxociprofloxacin mit 4,7% am häufigsten, es folgen Sulfociprofloxacin (3,6%), Desethylenciprofloxacin (2,1%) und Formylciprofloxacin (<0,1%) (Beerman et al.). Über die Gewebepenetration der Metaboliten liegen bis heute wenig Informationen vor. Die renale Elimination von Ciprofloxacin und seinen Metaboliten beträgt nach Beermann bei intravenöser Applikation etwa 75%, bei oraler Applikation etwa 55%. Entsprechend umgekehrt verhält es sich mit der fäkalen Elimination.

2.2 Polyvidon-Jod (PVP-Jod)

PVP-Jod dient in dieser Studie als Vergleichssubstanz zu Ciprofloxacin. Als 11%ige Lösung wird PVP-Jod als Breitband-Mikrobiozid zur Desinfektion der Haut und Schleimhäute, z.B. vor Operationen, oder zur antiseptischen Wundbehandlung verwendet (Fleischer et al.).

2.2.1 Chemie und Wirkmechanismus

PVP-Jod besteht aus wasserlöslichem Polyvinylpyrrolidon (N-vinyl-2-pyrrolidone), einem synthetischen Polymer mit hohem osmotischen und kolloidalen Druck, und Jod. Das Jod wird in diesem Komplex zu 30% zu organischem Jod, 70% verbleiben als freies, elementares Jod, das die antimikrobielle Aktivität besitzt. PVP-Jod zeichnet sich durch mikrobiozide Eigenschaften gegen Bakterien, Viren, Hefen, Pilze und Protozoen aus (Michalová et al., Pels et al.).

Die mikrobiozide Wirkung des PVP-Jod erklärt sich aus dem Zusammenspiel des Träger- und Vermittlermoleküls Polyvinylpyrrolidon und der zytoziden Wirkung des elementaren Jod. Polyvinylpyrrolidon selbst besitzt keine intrinsische antimikrobielle Aktivität (Reverdy et al.). Gleichzeitig kann Jod ohne Zugang zum bakteriellen Zytoplasma und zytoplasmatischen Membranen nur gering antimikrobiell wirken. Durch die Affinität des Polyvinylpyrrolidon zu Zellmembranen wird freies Jod direkt zur Bakterienoberfläche transportiert (Vratsanos; DiGenis et al.). Hier erhält das freie Jod Verbindung zu Sulfhydrylgruppen, Peptiden, Proteinen, Enzymen, Vitamin C, Lipiden und Zytosinen, die dadurch iodiniert und oxidiert werden. Dies mündet in einer Inaktivierung biologischer Moleküle, die für die Funktionsfähigkeit der Zelle essentiell sind (Alexander). Entscheidend für die mikrobiozide Aktivität ist die Menge freien Jods, die mit Hilfe des Polyvinylpyrrolidon an die Zelloberfläche des Bakteriums und die Zielstrukturen des bakteriellen Zytoplasmas sowie der zytoplasmatischen Membranen befördert wird (Rutherford). Daraus erklärt sich der Umstand, dass Lösungen mit einem höheren Gehalt an freiem Jod, z.B. Lugolsche Lösung, geringer antimikrobiell aktiv sind als PVP-Jod (Zamora).

Wenn Mikroorganismen mit dem freien Jod in Lösung interagieren, verschiebt sich das Gleichgewicht in Lösung zu Ungunsten des freien Jods, und es wird zum Ausgleich des Gleichgewichts nachfolgend mehr davon freigesetzt, so dass es weiter mikrobiozid wirken kann (Melki et al.). Dieser Mechanismus folgt einer glockenförmigen Kurve mit ihrem Maximum bei einer PVP-Jod-Lösung von 7 mg/ml (Zamora). PVP-Jod büßt bei Kontakt mit organischen Verbindungen bakterizide Aktivität ein (Pels et al.). Der Komplex aus PVP-Jod wirkt bei einem pH-Wert zwischen 2 und 7.

2.2.2 Wirkungsspektrum und klinische Anwendung

In der operativen Ophthalmologie hat PVP-Jod an Bedeutung gewonnen. Es wird nicht nur zur prä- und postoperativen Antisepsis eingesetzt, sondern in Konzentrationen zwischen 1,25% und 2,5% auch postoperativ als Augentropfen appliziert. Es vermindert die Koloniebildung von Bakterien beträchtlich und ebenso effektiv wie Breitbandantibiotika (Isenberg et al.).

Darüber hinaus berichten Reimer et al. über liposomale PVP-Jod Lösungen in einer Konzentration von 2,5% bis 5%. Diese Lösungen sind mit dem Tränenfilm bei pH 6 isoton und sollen die Penetration von PVP-Jod verbessern. Sie wurden zur Behandlung der bakteriellen und viralen Keratitis herangezogen. Im Tierversuch wurden gute Ergebnisse bei der Behandlung einer tiefen *Staph. aureus* Infektion erzielt. PVP-Jod ist schon in 0,5%iger Lösung virucid gegenüber Adenoviren und Herpes simplex-Viren (Janthur et al.).

Fleischer verweist auf die universelle antimikrobielle Wirkung von PVP-Jod, die sich auch gegen Problemkeime wie methicillinresistente *Staph. aureus* und *Enterococcus sp* richtet. Er beschreibt vor allem die Bedeutung in der Behandlung von Hautinfektionen, Operationswunden und Verbrennungen, einerseits als Prophylaxe, aber auch als Therapie.

Aus ophthalmologischer Sicht haben Michalova et al. in ihrer Studie an Kaninchenaugen gefunden, dass 5% PVP-Jod als alleinige topische Therapie nicht ausreicht, um eine durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachte Keratitis zu behandeln. PVP-Jod erwies sich, trotz ausreichender *in vitro*-Aktivität gegen den Erreger *in vivo* als nicht effektiv, im Vergleich zur mit 0,9% NaCl behandelten Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse von Gopinathan et al., dass 5% PVP-Jod, im Vergleich zu 0,3% Ciprofloxacin und 0,3% Gentamicin, bei der Dekontamination von menschlichen Spenderhornhäuten überlegen ist, und zwar auch bei der Elimination von *Pseudomonas aeruginosa*. Hagenah et al. empfehlen die Verwendung von 3% PVP-Jod zur Dekontamination von humanen Spenderbulbi.

Die Ergebnisse von Melki et al. zeigen, dass PVP-Jod in einer Konzentration von 0,5% wirkungsvoller bakterizid wirkt, als in einer Konzentration von 10%. Sie verglichen diese Konzentrationen anhand einer experimentellen Staphylokokkenkeratitis bei Kaninchen. Weiterhin waren 0,9% NaCl und 0,3% Ofloxacin in die Studie mit einbezogen. Ofloxacin war beiden PVP-Jod Konzentrationen statistisch signifikant überlegen. 0,5% PVP-Jod war aber ebenfalls statistisch signifikant effektiver als 10% PVP-Jod. Melki macht eher Penetrationsprobleme als bakterizide Potenz für den Unterschied zwischen Ofloxacin und 0,5% PVP-Jod verantwortlich.

Zusätzlich zu der antibakteriellen Wirksamkeit glaubt Rieger Jod auch eine antioxidative Wirkung zuschreiben zu können (Rieger et al.). Die Untersuchungen hierzu befinden sich im *in vitro* bzw. *ex vivo* Stadium und zeigen eine verbesserte Jodaufnahme der okulären Gewebe bei Iontophorese. Fernziel ist hierbei die Prävention oxidativer Prozesse in der Linse und der Netzhaut, die Pathologien auslösen können.

2.2.3 Resistenzen

Bisher sind in Verbindung mit PVP-Jod keine Resistenzbildungen beobachtet worden.

2.2.4 Penetration in die Hornhaut

Die Penetration von PVP-Jod in die Hornhaut ist abhängig von einer Vielzahl chemischer und biologischer Faktoren. Es besteht zwischen dem applizierten PVP-Jodtropfen und der Hornhaut ein Konzentrationsgradient für Jod. Die Verteilung der applizierten Lösung ist von der Größe der verfügbaren Oberfläche abhängig. Einerseits steigert eine große Oberfläche die Menge, die penetriert. Andererseits sorgt die Bindehaut für eine Verteilung, die für die Hornhaut Verlust von Wirkstoff bedeutet, und zusätzliches organisches Gewebe senkt die bakterizide Aktivität des PVP-Jod. Dazu ist es vom Löslichkeitskoeffizienten des Wirkstoffes abhängig, wie gut die Stabilität im Augenmilieu ist. Schließlich sorgen strukturelle Barrieren in Epithel, Endothel, Bowman und Descemet für Penetrationsverzögerung oder –verhinderung (Pels et al.). In der Studie von Pels et al. wurde im Zusammenhang mit der Dekontamination von Spenderaugen auch die Penetration von Jod in die Hornhaut untersucht. Es zeigt sich in der EDX-Analyse der Hornhäute aus den mit PVP-Jod dekontaminierten Augen, dass bei einer PVP-Jodkonzentration von 5 mg/ml und einer Einwirkzeit von 5 Minuten, bei intaktem Epithel keine Penetration in das Hornhautstroma erfolgt. Hingegen stellt sich bei einer verlängerten Einwirkzeit (30 min.) bzw. einer erhöhten Konzentration (100 mg/ml), eine Jodpenetration in das Stroma der Hornhaut ein.

2.2.5 Toxizität

Alp et al. untersuchten die okuläre Toxizität von 5% und 10% PVP-Jod im Vergleich zu 0,9% NaCl. Die Lösungen wurden direkt in die Vorderkammer instilliert und corneale Veränderungen untersucht. Es fand sich bei beiden PVP-Jod Gruppen eine Schädigung des Hornhautendothels, die bei 10% PVP-Jod stärker ausgeprägt war. Sie äußerte sich in einem Zellödem, Vakuolenbildung im Endothel und einer Dickenzunahme der Hornhaut insgesamt. Gleichzeitig wird aber darauf hingewiesen, dass PVP-Jod bei topischer Applikation auf die intakte Hornhaut, also bei fehlendem Kontakt zum Endothel, keinen Hinweis auf eine okuläre Toxizität geliefert hat (MacRae et al.). Die Toxizität für Fibroblasten der humanen Hornhaut wurde in Zellkultur anhand der mitochondrialen Aktivität nach PVP-Jod-Exposition untersucht (Pels et al.). Bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml PVP-Jod und einer Einwirkzeit von 2 Minuten entsteht eine signifikante Schädigung der Fibroblasten. Diese Schädigung ist dosisabhängig und kommt bei > 2,5 mg/ml (0,25%) PVP-Jod zu einer vollständigen Schädigung der Fibroblasten mit Erlöschen der mitochondrialen Aktivität. Auf die klinische Situation übertragen bedeutet das, dass bei einer Konzentration von > 5 mg/ml (0,5%) und einer Einwirkzeit von mehr als 2 Minuten, stromale Fibroblasten durch penetriertes PVP-Jod geschädigt werden können. Dies zeigt weiterhin, dass die Wirkung von PVP-Jod nicht auf einer temporären, reversiblen Hemmung der Zellenzyme beruht, sondern dass es sich um eine „cytozide“ Reaktion handelt.

Tsunoda et al. berichtet im Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen von einem zytotoxischen Effekt des PVP-Jod in Konzentrationen um 5%. Hierbei zeigt sich eine deutliche Reduktion der lokalen Metastasierung im Nahtbereich im Tierversuch an der Ratte. *In vivo* ist der zytotoxische Effekt nach dieser Studie geringer als *in vitro*.

2.3 Augentropfen

Als 0,3% Ciprofloxacin verwendeten wir Ciloxan Augentropfen der Firma Alcon. Zur Herstellung von 1% Ciprofloxacinlösung verwendeten wir Ciloxan als Grundlage und fügten Ciprofloxacin Trockenstoff (Firma Bayer) hinzu. Diese Augentropfen enthalten folgende Lösungsmittel und Zusatzstoffe: Benzalkoniumchlorid 0,006%, Dinatrium EDTA 0,05%, Mannitol 4,6%, Acetylsäure 0,04% und Natriumacetat 0,03%. Benzalkoniumchlorid verbessert durch Verminderung der epithelialen Barrierefunktion die Penetration des Antibiotikums. Somit wird bei der topischen Therapie bewußt eine Schädigung des Epithels zur Verbesserung der Penetration in Kauf genommen. Polyvidon-Jod ist als 11% Lösung in Form von Bataisodona Lösung (Firma Mundipharma) erhältlich. Wir verwendeten die Lösung als solche als Augentropfen. Sie enthält als Hilfsstoffe Glycerol, Nonoxinol 9, Kaliumiodat, Natriummonohydrogenphosphat.

Es wurden mit einer Eppendorfpipette 50µl (= 1 Tropfen) je Applikationsvorgang appliziert.

Ciprofloxacin	PVP-Jod
▪ Benzalkoniumchlorid 0,006% ▪ Dinatrium EDTA 0,05% ▪ Mannitol 4,6% ▪ Acetylsäure 0,04% ▪ Natriumacetat 0,03%	▪ Glycerol ▪ Nonoxinol 9 ▪ Kaliumiodat ▪ Natriummonohydrogenphosphat

Tab. 2-1: Lösungsmittel und Zusatzstoffe von Ciprofloxacin und PVP-Jod

2.4 Mikrotrepan

Der Mikrotrepan wurde von Schrage et al. in Aachen, in Zusammenarbeit mit der Firma Geuder GmbH (Heidelberg), entwickelt. Es handelt sich um einen Hohlbohrer mit einer Schneideöffnung von 160 µm und einer konisch geformten Spitze. Er wird von einer Zahnarztbohrereinheit mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 30.000 U/min (RS2000 Eickmeyer) angetrieben. Mit diesem Gerät können der Hornhaut Mikrobiopsien entnommen werden. Die Epitheldefekte an den Punktionsstellen sind nach drei Tagen im Spaltlampenmikroskop größtenteils nicht mehr nachweisbar (Schrage et al. 1994).



Abb. 2-4: Mikrotrepanation der Kaninchenhornhaut

2.4.1 Indikation

In der Klinik hat sich der Mikrotrepan als diagnostisches Instrument zur sicheren und komplikationsarmen Biopsienahme aus der Hornhaut bewährt. Seine Vorteile zeigen sich vor allem dort, wo ein Abstrich, z.B. bei Keratitis, an seine diagnostischen Grenzen stößt: bei resistenten Keimen zeigt der Abstrich unter Antibiotikatherapie oft negative Ergebnisse. Hier können mit dem Mikrotrepan Biopsien aus tieferen stromalen Schichten entnommen werden, die dann für Analysen wie Histopathologie (Färbungen: Gram, Hämatoxylin-Eosin, Lactophenolblau), PCR (polymerase chain reaction) Elektronenmikroskopie oder EDXA zu Verfügung stehen (Kompa et al. 1999). Die Schichten der Hornhaut bleiben in dem bioptischen Präparat erhalten. Die Indikation zur Mikrobiopsie wird dann gestellt, wenn ein mit Breitspektrumantibiotika an behandelter infektiöser Hornhautbefund nicht zur Besserung kommt, wenn ein Ulkus einzuschmelzen droht, bei Verdacht auf eine Pilz- oder Akanthamöbenkeratitis, bei unklar fortschreitenden Keratitiden, bei Verdacht auf Mischinfektionen und vor einer Keratoplastik à chaud, zur Abklärung der Prognose.

Bei der Diagnostik von Pilzkeratitiden hat sich die bioptische Diagnostik gegenüber dem cornealen Abstrich als deutlich überlegen gezeigt (Ishibashi et al.). Bei experimentellen Pilzkeratitiden am Kaninchen wurde gezeigt, dass bei allen biopsierten Augen (Erreger: *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans*) ein positiver Nachweis mit Hilfe einer Tinten-Kaliumhydroxid-Färbung unter dem Lichtmikroskop geführt werden konnte. Im Gegensatz dazu brachte der Abstrich nur in 50% (*Fusarium solani*), 60% (*Aspergillus fumigatus*) bzw. 30% (*Candida albicans*) ein positives Ergebnis.

Bestimmte Erreger (*Neisseria*, *Listeria*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*) sind in der Lage, durch intaktes Hornhautepithel zu penetrieren und somit die antibiotische Therapie schwierig zu gestalten. Abstriche führen in solchen Fällen zu negativen Ergebnissen (Lee et al. 1990).

Indikationen zur Mikrobiopsie bei lokalisierten stromalen Hornhautprozessen und Keratitis

- Keine Besserung des HH-Befundes unter Breitbandantibiotika
- Negative Abstrichergebnisse bei Keratitis
- V.a. Einschmelzung eines Ulcus
- Tiefes stromales Infiltrat
- V.a. Pilz- oder Akanthamöbenkeratitis
- V.a. Mischinfektionen
- Chronische Keratitis
- Unklar progrediente Keratitis
- Abschätzung der Prognose vor KPL à chaud

Tab. 2-2: (nach Schrage 1999 und Lee et al.)

2.4.2 Anwendung

Die Biopsienahme mit dem Mikrotrepan kann am Spaltlampenmikroskop, idealerweise am Operationsmikroskop, vorgenommen werden. Als Anästhesie reicht beim Patienten eine lokale Tropfenanästhesie mit Proparackain bzw. Kokain aus. Im Tierversuch dieser Studie wurde unter Vollnarkose trepaniert, es wurden 10 Mikrobiopsien pro Hornhaut entnommen. Am Patienten sind bis zu 6 Mikrobiopsien aus einem lokalisierten Befund im cornealen Stroma sinnvoll. Der Trepan wird zur Biopsie leicht schräg auf die Hornhaut aufgesetzt, der Antrieb erfolgt mit einer Zahnarztbohrereinheit. Der Biopsiezylinder sollte gleich mit dem Trepan aus dem trepanierten Areal entfernt und mit Hilfe des Mandrins in ein steriles Gefäß gegeben werden. Sollte dies nicht gelingen, ist es möglich, den Stanzzyylinder mit einer Pinzette zu gewinnen. In der Klinik wird vor und nach der diagnostischen Trepanation einmalig mit 11% PVP-Jod gespült. Im Tierversuch folgten wir dem unten beschriebenen Applikationsschema.

2.4.3 Alternativmethoden

Eine andere Methode, die zur Biopsienahme aus tiefen stromalen Schichten existiert, ist die Hornhautbiopsie über einen lamellären Lappen (Hwang et al.). Diese chirurgische Intervention erfordert aber eine retrobulbäre oder peribulbäre Anästhesie und stellt einen wesentlich größeren Eingriff in die strukturelle Integrität der Hornhaut dar. Sie beinhaltet eine Naht der Hornhaut, um die entstandene Eröffnung des Hornhautstromas zu verschließen und

führt zu einer vaskularisierten Hornhautnarbe, die, wenn zentral lokalisiert, das Sehen deutlich beeinträchtigen sowie einen Astigmatismus hervorrufen kann.

Die von Friedländer et al. vorgestellte Feinnadelbiopsie wird mit einer 3-5 mm durchmessenden Nadel durchgeführt und verursacht somit einen wesentlichen Hornhautdefekt. Die klassische Methode der lamellären Keratektomie kann einen irregulären Astigmatismus verursachen und ist ebenfalls mit einem erhöhten Operationsaufwand belegt. Außerdem wird ein erheblicher Anteil des anterioren Stromas über dem tiefen stromalen Defekt entfernt, und die Hornhaut erfährt eine signifikante Ausdünnung in diesem Bereich. Von Newton et al. wird aber beschrieben, wie diese Methode die Diagnostik der chronischen Keratitis unterstützt. Hierbei kann es bei intaktem Epithel zu stromalen Infiltraten kommen, weswegen Abstriche negativ bleiben. Darüber hinaus sind diese Patienten häufig intensiv mit Breitbandantibiotika antherapiert worden. Vorteil der lamellären Keratektomie ist die relativ große Probe, die gewonnen werden kann und für verschiedene Untersuchungen ausreichend Material liefert (Immunhistochemie, Licht- und Elektronenmikroskopie, Kultur). Zusätzlich wird aus dem eröffneten Stroma ein Abstrich gewonnen, der auf Kulturmedien ausgestrichen wird und anzüchtbar ist.

2.5 NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance)

Die Messungen zu der vorliegenden Arbeit wurden im MR-Zentrum der NTNU (Norwegische Technische und Naturwissenschaftliche Universität Trondheim) Trondheim, Norwegen durchgeführt (MR Center, Natural Science Section, Norwegian University of Science and Technology).

2.5.1 Einleitung

Die NMR-Spektroskopie ermöglicht Untersuchungen des endogenen Metabolismus eines Gewebes und die Charakterisierung von Medikamenten in Geweben und Flüssigkeiten. Hierzu ist die Isolierung der zu untersuchenden Substanzen nicht erforderlich. Es kann gleichzeitig eine große Anzahl von lipophilen und hydrophilen Metaboliten detektiert werden.

Anhand der ^1H -NMR-Spektroskopie können sowohl der Metabolismus der verschiedenen Kompartimente des Auges, als auch die intramolekularen Wechselwirkungen eines Medikamentes beurteilt werden. Zusätzliche Informationen erhält man durch zweidimensionale Techniken, z.B. durch Kombination der ^1H - mit der ^{13}C -Spektroskopie in der COSY-Technik (homonuclear chemical shift correlated technique). Hier werden Kopplungen zwischen Atomen innerhalb des Spektrums identifiziert (Marion et al.).

Für die Analyse von Ciprofloxacin ist durch das im Molekül vorhandene Fluoratom neben der ^1H - und ^{13}C -Spektroskopie besonders die ^{19}F -Spektroskopie geeignet. Sie dient der Detektion des fluorierten Medikamentes. Der Vorteil der Fluor-Detektion ist, dass endogene Metabolite des Auges nicht in signifikanten Mengen Fluor enthalten, und damit die Signale des Medikamentes und seiner Metabolite nicht durch Signale aus dem Gewebe gestört oder überlagert werden. Die Sensitivität der ^{19}F -NMR-Spektroskopie ist ähnlich hoch wie die der ^1H -Spektroskopie (Midelfart).

2.5.2 Funktionsprinzip

Die NMR-Spektroskopie basiert auf der Interaktion von Atomkernen mit einem externen magnetischen Feld, B_0 . Einige Isotope haben die Eigenschaft, auf ein magnetisches Feld wie ein kleiner Stabmagnet zu reagieren. Dazu gehören z.B. ^1H -, ^{13}C -, ^{15}N -, ^{19}F -, ^{31}P -Atome. Die intrinsische Bewegung des Atomkerns, die einem magnetischen Impuls folgt, nennt man Spin oder Drehung.

Die Netzmagnetisierung (M_0) repräsentiert die Magnetisierung einer Probe in Anwesenheit des magnetischen Feldes (B_0). M_0 ist proportional zu B_0 und stellt die Quelle des NMR-Signals dar.

2.5.3 Resonanz-Absorption

Das Prinzip der NMR-Spektroskopie ist, dass elektromagnetische Schwingungsenergie in ein System gegeben wird, eine Energieabsorption („Resonanz“) erfolgt, diese detektiert und prozessiert wird, und kurze Zeit später Energie durch Relaxation der Kerne wieder freigesetzt wird.

Die magnetisch aktiven Kerne eines Isotops drehen als Reaktion auf die magnetisierende Erregung (Puls) auf ein höheres Energieniveau. Bei einer vorgegebenen magnetischen Feldstärke werden die Kerne eines Isotops bei einer bestimmten Frequenz angeregt. Magnetische Feldstärke und Sendefrequenz müssen also aufeinander abgestimmt sein, so daß die Energie der eingestrahnten Quanten der Energiedifferenz der beiden Niveaus entspricht. Es wird umso mehr Energie absorbiert, je größer die Differenz zwischen den beiden Energieniveaus ist und je größer die Differenz in der Besetzung der Niveaus ist. Besetzungszahlen und Energie sind der Feldstärke proportional. Entsprechend resultiert die Erhöhung der magnetischen Feldstärke in einem Anstieg des Absorptionssignals. Dies ist der Grund für die Nutzung großer Magnetfeldstärken in der NMR-Spektroskopie. Nach dem Puls setzt der Spin des Kerns die Energie wieder frei und kehrt auf sein Ausgangsniveau zurück. Diese Vorgänge werden als Resonanzabsorption (auch kernmagnetische Resonanz, NMR) und Relaxation bezeichnet. Die Frequenz der absorbierten Energie ist die Resonanzfrequenz für die Kerne des

jeweiligen Isotops. Jedes Isotop zeigt nach der magnetischen Anregung eine Reihe von Resonanzfrequenzen, entsprechend der Anzahl der Kerne in der betroffenen Probe. Dies ist durch die lokal unterschiedliche Wirkung des äußeren Magnetfeldes auf die verschiedenen Kerne eines Isotops innerhalb der Probe bedingt. Diese Frequenzen geben wichtige Informationen zur Strukturaufklärung in Molekülen (Suhr).

2.5.4 Rf-Puls, Relaxation, FID

Energie wird als Rf-Puls (radiofrequency pulse) in Form eines elektromagnetischen Feldes in das System gegeben, mit einer Frequenz ω_1 und einem magnetischen Feld B_1 , das senkrecht zu B_0 steht.

Auf den Rf-Puls folgt die Absorption der Energie durch den Kern, der Spin dreht vom niedrigeren Niveau zu einem höheren Energieniveau (Energie wird absorbiert); dann erfolgt die Emission von Energie, weil der Spin vom höheren Energieniveau zum niedrigeren Niveau zurückkehrt (Energie wird freigesetzt, Relaxation).

Wenn der Rf-Puls lange genug appliziert wird und eine genügend große Amplitude hat, wird die absorbierte Energie dazu führen, dass M_0 komplett in eine transversale Ebene rotiert. Das ist der 90° Puls. Unter dieser Bedingung ist die Spannung, die durch M_0 bei der Relaxation an einer Empfängerspule induziert wird, maximal. Die Spannung wird als FID (free induction decay) bezeichnet und ist das MR-Signal.

Um das magnetische Umfeld, das der Spin erfährt, beurteilen zu können, wird das FID mit Hilfe der Fourier-Transformation von einer Funktion der Zeit in eine Funktion der Frequenz umgewandelt.

2.5.5 NMR-Spektrum

Das NMR-Absorptionsspektrum hat drei Quantitäten, die der Identifizierung des energieemittierenden Kerns dienen. Das integrierte Areal (die Peak-Fläche), die Position im Spektrum (Resonanzfrequenz) und die Breite des Peaks (die Peakform).

Die Fläche des Peaks ist proportional zur Anzahl der Spins, die das Signal erzeugen. Die Position des Peaks im Spektrum (Resonanzfrequenz des spezifischen Kerns) dient der Identifikation des Kerns und seiner molekularen Umgebung. Die Form des Peaks lässt ebenfalls Rückschlüsse auf die molekulare Umgebung des Kerns zu (z.B. Dupletts infolge Spin-Spin-Kopplungen).

Die Einteilung des Spektrums erfolgt in σ = ppm (Sigma = parts per million). Dies ist eine relative, dimensionslose Größe. Sie beschreibt die Differenz in Hertz zwischen einer Probe

und einer Referenz, die „chemische Verschiebung“. Die chemische Verschiebung ist unabhängig von der magnetischen Feldstärke, das heißt, dass Tabellen mit Werten der chemischen Verschiebung immer vergleichbar sind, unabhängig davon, bei welcher magnetischen Feldstärke sie gemessen wurden.

2.5.6 Interaktionen

Das lokale Magnetfeld an einem Atom ist, infolge lokaler Wechselwirkungen mit anderen Atomen, anders als das von außen einwirkende Feld.

Die Resonanzfrequenzen der Atomkerne - auch wenn sie vom gleichen Element sind - variieren mit ihrer Umgebung. Die Verteilung der Elektronen, samt der Elektronenbindungen, ist bei einer O-H Bindung eine andere als bei einer C-H Bindung.

In einem Molekül muß beachtet werden, dass sich die einzelnen Atome in einem Verbund befinden, aus dem sich auch für das NMR-Spektrum relevante Wechselwirkungen ergeben.

Die sogenannte Spin-Spin-Kopplung ändert die Resonanzfrequenz eines Spins, da die Kerne eines Moleküls miteinander interagieren und auf das lokale Magnetfeld des anderen wirken. Infolgedessen können sich die Peaks aufsplitten.

Es entstehen Dupletts und Multipletts, die einerseits die Deutung des Spektrums erschweren, andererseits aber auch zur Klärung der Molekülstruktur beitragen können.

2.5.7 Elektromagnet

Für die Aufnahmen verwendeten wir ein AVANCE DRX500 Spektrometer (11,74 T) mit einer Resonanzfrequenz von 500,13 MHz für ^1H , 125,77 MHz für ^{13}C und 470,53 MHz für ^{19}F . Die Breite des Spektrums beträgt bei der ^1H -Spektroskopie 5,00 kHz, bei der ^{13}C -Spektroskopie 25,252 kHz und bei der ^{19}F -Spektroskopie 61,162 kHz.

2.5.8 Verarbeitungsmethoden

Wasser-Signal-Suppression in dem ^1H NMR Spektrum:

Durch die hohe Wasserkonzentration in biologischen Geweben werden schwache Signale in einem Protonen-Spektrum leicht durch das starke Wassersignal übersehen. Außerdem können sogenannte Clipping-Artefakte entstehen. Hierbei handelt es sich um falsche Signale, die durch eine Reizüberflutung des „analog-to-digital-converter“ (ADC) zustande kommen. Wenn der quantitative Unterschied zwischen dem stärksten und dem schwächsten Signal zu groß ist, kann es dazu führen, dass das schwächste Signal vom ADC nicht digitalisiert oder detektiert wird.

Deswegen wird in Erwartung schwacher Signale selektiv das Signal mit der größten Amplitude unterdrückt. In unserem Fall handelt es sich um das Wassersignal. Die Suppression erfolgt über eine der Messung vorausgehende Aufsättigung der H_2O -Resonanz. Das Signal muß nicht vollständig supprimiert sein, denn das verbleibende Wassersignal wird oft zur Frequenz- oder Phasenkorrektur verwendet.

2.5.9 Interpretation der Spektren und quantitative Analyse

2.5.9.1 Peak-Identifikation

Die vorhandenen Informationen aus der hoch auflösenden Spektroskopie werden mit den neuen Daten verglichen, so dass Resonanzfrequenzen bestimmten Kernen zugeordnet werden können. Dazu kommt die Verifizierung der Ergebnisse mit Hilfe von *in vitro* Messungen von Lösungen, die den gefragten Stoff unter möglichst physiologischen Bedingungen enthalten. Alternativ können hoch auflösende Spektren von Auszügen des Gewebes herangezogen werden. Charakteristische Merkmale der Peaks, z.B. Laktat-Dupletts, helfen bei der Identifikation. Diese Art der Identifikation ist besonders bei qualitativer Fragestellung wichtig.

2.5.9.2 Peak-Fläche

Die Berechnung der Peak-Fläche dient der Quantifizierung eines Signals. Unter stabilen Meßbedingungen ist die Fläche unter dem Peak direkt proportional zur Anzahl der am Peak beteiligten Spins.

Zur Berechnung der Peak-Fläche stehen verschiedene Verfahren, von der Berechnung des Integrals bis zur Abschätzung der Fläche durch Höhenbestimmung des Peaks, zur Verfügung. Die Verfahren unterscheiden sich in ihrer Genauigkeit.

2.5.9.3 Absolute Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung ist mit einem hoch auflösenden Laborspektrometer mit guten Spektren gut durchzuführen. Eine Peak-Fläche kann mit einem Standardpeak von bekannter Konzentration und Zusammensetzung verglichen werden. Beide müssen jedoch unter den gleichen Meßbedingungen entstanden sein, Relaxationseffekte müssen korrigiert oder eliminiert werden. Dann läßt sich die unbekannte Konzentration berechnen.

Als interner Standard kann z.B. ein bekannter Metabolit dienen. Ein externer Standard ist anfällig für B_0 - und B_1 -Inhomogenitäten, ermöglicht aber eine bessere Kontrolle über die Zusammensetzung des Standards (Salibi et al; Zeeck; Faulkner).

2.5.10 Meßbedingungen

Als Lösungsmittel diente bei allen Messungen Deuteriumoxid (D_2O). Die Proben für die Proton-Spektroskopie wurden in 500 μl D_2O gelöst, die für die ^{19}F -Spektroskopie in 330 μl D_2O . Es wurde eine 5 mm NMR-Röhre als Probengefäß verwendet.

Die Resonanzfrequenz beträgt für Protonen 500,132 MHz, die Breite des Spektrums 5,00 kHz, die Aquisitionszeit 3,5 s. Es wird ein 90° Puls (11 μs) verwendet. Die FID's werden mit 17 K Datenpunkten gemessen und auf 34 K Datenpunkte mit Hilfe des „zero-filling“ aufgefüllt. Es erfolgt eine Suppression des Wassersignals. Die Meßtemperatur betrug $32^\circ C$ (Tabelle aller Meßeinstellungen der NMR-Spektroskopie s. Anhang).

Die Resonanz des bei der Protonenspektroskopie verwendeten internen Standards TSP (Natrium-3-Trimethylsilylpropionat) wird im Spektrum gleich 0 ppm gesetzt, das Laktatsignal erscheint relativ dazu bei 1,33 ppm. Alle anderen chemischen Verschiebungen der Spins im Spektrum werden ebenfalls relativ zum Standard auf der ppm-Skala beurteilt.

Beim Kohlenstoff liegt die Resonanzfrequenz bei 125,77 MHz, die Breite des Spektrums bei 25,252 kHz, der Puls beträgt 6,58 μs und die Aquisitionszeit 1,3 s, mit einer Wiederholungsverzögerung von 3,0 s. Die Meßtemperatur lag bei $23,5^\circ C$.

Für die COSY Technik liegt die Resonanzfrequenz bei 125,77 MHz, die Breite des Spektrums bei 25,252 kHz, der Puls beträgt 5 μs , und die Aquisitionszeit 0,08 s, mit einer Wiederholungsverzögerung von 2 s. Die Meßtemperatur lag bei $23^\circ C$.

Bei der ^{19}F -NMR-Spektroskopie beträgt die Resonanzfrequenz für Fluor 470,59 MHz, die Breite des Spektrums 61,162 kHz, die Aquisitionszeit 1,3 s, mit einer Wiederholungsverzögerung (repetition delay) von 1,5 s. Es wird ebenfalls ein 90° Puls (8,75 μs) verwendet. Die Meßtemperatur beträgt $19,0^\circ C$.

Die externen Standards werden im Spektrum festgelegt (TFA auf -72 ppm, Hexafluorbenzen auf -162 ppm), die anderen Peaks im Spektrum relativ dazu beurteilt.

2.5.10.1 Standardsubstanzen

Bei unseren Messungen verwendeten wir für die 1H -Spektroskopie als internen Standard TSP (Natrium-3-trimethylsilylpropionat-2,2,3,3- d_4), sowie für die ^{19}F -Spektroskopien TFA (Trifluoressigsäure) oder Hexafluorbenzen (HF bzw. C_6F_6) als externen Standard. Der interne Standard wurde der Probe direkt mit dem Deuteriumoxid zugesetzt. 100 μl des externen Standards befanden sich in einer Kapillarröhre, die in die NMR-Röhre, die die Probe enthielt, gesetzt wurde (Abb. 2-5). Es handelt sich dabei um eine NMR-Röhre der Firma Wilmad Glass (Buena, NJ, USA).

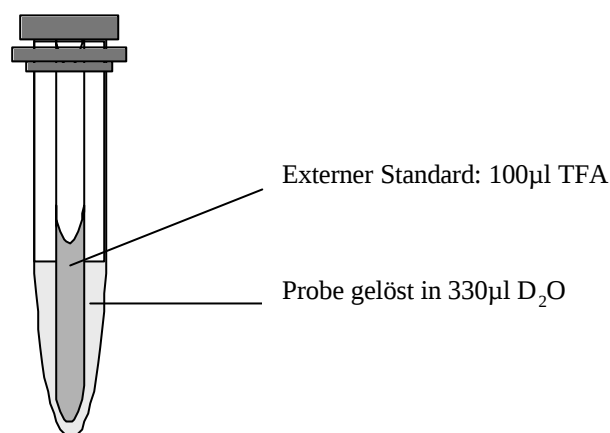


Abb. 2-5: Probengefäß mit Kapillarröhre zur ^{19}F -NMR-Spektroskopie

Wir wählten die TFA-Konzentration von 66 µg/ml. Damit erhielten wir ein gutes Signal des Standards, anhand dessen die Quantifizierung der anderen Signale möglich war.

2.5.11 Ophthalmologische Anwendung

In der Augenheilkunde wird die NMR-Spektroskopie verwendet, um metabolische Veränderungen in einzelnen Kompartimenten des Auges zu analysieren und zu detektieren. Dazu war zunächst die Aufklärung der gesunden metabolischen Profile notwendig, die im Tierversuch und auch an humanem Material untersucht wurden (Brown et al., Greiner et al., Midelfart et al., Reddy et al.).

Besondere Aufmerksamkeit widmeten Greiner et al. in den 80er Jahren der Definition von Normalwerten für phosphatreiche Verbindungen in der humanen Hornhaut und Linse anhand von ^{31}P -NMR-Spektroskopien (Greiner et al. 1983, 1981). Ein Ansatz war zum Beispiel herauszufinden, ob die Eignung humaner Spenderhornhäute anhand ihres metabolischen Status mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie abzuschätzen ist (Greiner et al. 1984, 1985). Metabolische Störungen im Phosphathaushalt und des pH-Wertes der Hornhaut treten zum Beispiel nach Schädigungen der Endothels auf, dessen Zustand mit entscheidend für die Eignung einer Hornhaut als Transplantat ist (Greiner 1989). Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie eignet sich daher besonders für Studien mit dieser und ähnlicher Fragestellung, weil es mit ihr möglich ist, phosphatreiche Verbindungen, die eine metabolische Aktivität anzeigen, zu detektieren und zu identifizieren.

Auch die unterschiedliche metabolische Aktivität im Bereich der zentralen bzw. der peripheren (limbalen) Hornhaut kann mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie untersucht werden (Hayashi et al.). In dieser Studie wurde die Hornhaut zentral trepaniert, und die zwei Anteile der Hornhaut (zentral, peripher) wurden unabhängig voneinander einer Perchlorsäureextraktion (PCA) unterzogen und untersucht. Zusätzlich wurde die regenerative

Aktivität der Hornhaut nach Deepithelisierung untersucht und gefunden, dass der Phosphatspiegel unter regenerativen Bedingungen ansteigt.

Williams et al. griffen die ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie auf, um den Entstehungsmechanismus der Cataract und einen möglichen Zusammenhang mit dem Glucosestoffwechsel im Alter zu untersuchen.

Midelfart et al. haben mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie die Normwerte für Aminosäuren und andere Metabolite wie Glucose und Laktat in unterschiedlichen Kompartimenten des Auges bei verschiedenen Spezies untersucht. Hierbei standen Kammerwasser und Hornhaut im Vordergrund. In der weiteren Forschung steht nun die Detektion und Quantifizierung von fluorierten Medikamenten im Auge mit der ^{19}F -NMR-Spektroskopie im Zentrum des Interesses. Der Trondheimer Teil der vorliegenden Arbeit gehört als Teilprojekt zu dieser übergeordneten Studie, in deren Rahmen bereits Dexamethason und Dexamethasonphosphat mit Hilfe der ^{19}F -NMR-Spektroskopie untersucht wurden.

Die ^{19}F -NMR-Spektroskopie wird nun auch bei der Erforschung retinaler Pathologien verwendet (Berkowitz et al. 1995). Hierbei wird der retinale Glucosestoffwechsel anhand fluorierter Glucose untersucht, *in vivo* und ohne die Netzhaut invasiv angehen zu müssen. Vorausgegangen sind Analysen des Glucosestoffwechsels des Glaskörpers und des Metabolismus der fluorierten Glucose (Berkowitz et al. 1993, 1990).

2.6 EDXA (energy dispersive X-ray analysis)

2.6.1 Rasterelektronenmikroskop (REM)

Das REM-Bild diente in dieser Studie dem Auffinden der Meßorte im Querschnitt der Kaninchenhornhaut, was in besonderem Maße für die trepanierten Hornhäute von Bedeutung war. Wir konnten auf diese Weise die Trepanationen gut darstellen und für unsere Messungen einstellen. Außerdem konnten wir die Morphologie der Hornhaut beurteilen. Wir verwendeten ein Zeiss DSM 962 (Digital Scanning Microscope) als Elektronenmikroskop. Die EDX-Analyse wird im REM durchgeführt.

2.6.2 EDXA

Die Messungen zu der vorliegenden Arbeit wurden im Gemeinschaftsinstitut für Elektronenmikroskopie (GFE) der RWTH Aachen durchgeführt.

EDXA ist eine im Elektronenmikroskop durchführbare Röntgenspektroskopie. Sie beruht auf der Detektion der spezifischen Elektronenrückstrahlung eines Atoms. Das verwendete Gerät ist ein Oxford HP (High-Purity) Germanium-Detektor zur EDX-Analyse.

Für die EDXA werden Querschnitte der Hornhaut mit einer Dicke von 10 µm auf einen Kohlenstoffträger aufgebracht, im Lyophilisator getrocknet und mit spektralem Kohlenstoff bedampft.

Die Probe wird während der Messung einem Elektronenbeschuß ausgesetzt. Dadurch werden die Elektronen auf den äußeren Schalen eines Atoms in einen Zustand höherer Energie versetzt und steigen in der „Schalenhierarchie“ auf. Beim Zurückkehren auf ihre Ausgangsschale emittieren diese Elektronen eine für ihr Element typische Röntgenstrahlung, die von einem EDX-Detektor aufgefangen wird. In einem Rechner wird die Zählrate, die der EDX-Detektor erfaßt, in einem Diagramm über der Energie aufgetragen. Es resultiert eine Kurve in einem Diagramm, die bereits Rückschlüsse auf das Vorkommen verschiedener Elemente zuläßt. Jedes Element, das detektiert werden kann, erscheint in dem Spektrum an der Stelle mit einem Peak (Y-Achse = Zählrate), wo die X-Achse die spezifische Energie (keV) der Elementrückstrahlung anzeigt.

Der „Background“ ist eine im Spektrum über der Nulllinie verlaufende Linie, die die unspezifische Bremsstrahlung der Probe repräsentiert. Sie wird emittiert wenn Atomhüllen der Elemente durchlaufen werden und führt zu einem Hintergrundrauschen.

Die quantitative Bestimmung der Elemente erfolgt mit Hilfe eines Computerprogramms, das nachfolgend vorgestellt werden soll.

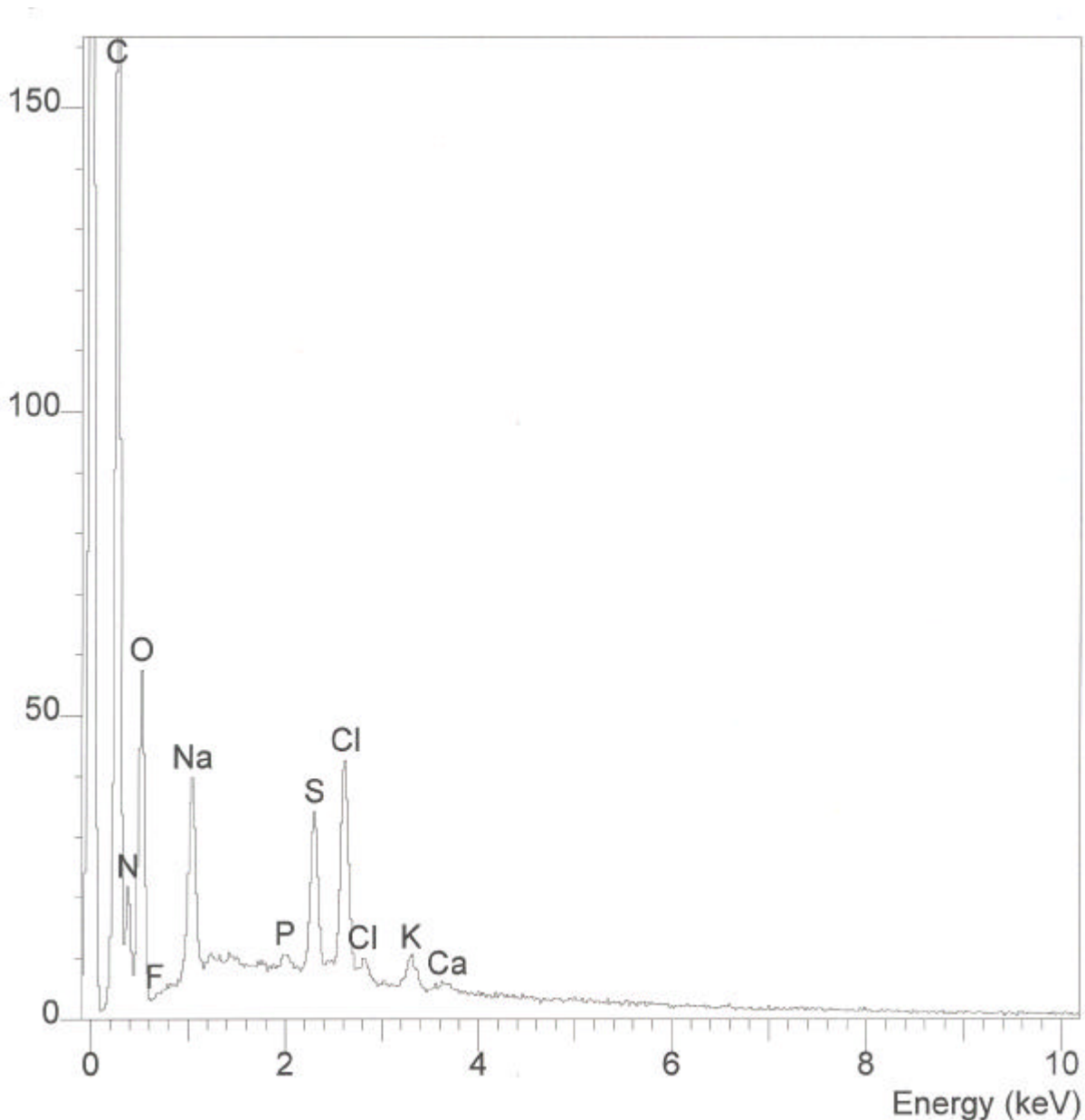


Abb. 2-6: EDXA-Spektrum einer Kaninchenhornhaut (Probennummer 466) **ohne** Jodapplikation. Es befindet sich kein meßbares Jod in der Hornhaut. Ordinate: cps (counts per second). Abszisse: Energy (keV). Die Elemente sind mit gängigen Abkürzungen benannt. Vergleiche Abb. 3-13.

2.6.2.1 Peak/Background-Quotient

Der Quotient zwischen Peak- und Background-Werten an einer Stelle des Diagramms stellt die eigentliche positive Zählrate des an dieser Stelle repräsentierten Elements dar. Da sich Peak und Background an einer Stelle immer proportional entsprechen, läßt sich durch die Bildung des Quotienten der beiden ein lokaler Meßfehler eliminieren (Boekestein et al.). Ein solcher Fehler könnte zum Beispiel durch eine Lageveränderung des Präparats oder eine Absorptionsveränderung zustande kommen. Die resultierende Zählrate (P/B-Quotient) ist

direkt proportional zu der in der Probe befindlichen Konzentration des dem Peak zugeordneten Elementes.

Als Grundlage für die weitere Quantifizierung wurde von Schrage ein Programm entwickelt, das, basierend auf dem lokalen P/B-Quotienten, die quantitative Analyse der vorhandenen Elemente ermöglicht (Schrage et al. 1994). Die endgültigen Konzentrationsangaben liegen in mol/kg TG (Trockengewicht) vor.

2.6.2.2 Standardisierung

Um die Quantifizierung erreichen zu können, müssen bei den Messungen bestimmte Standardisierungen vorgenommen werden. Das gilt sowohl für die Meßbedingungen wie Probenstrom, Beschleunigungsspannung und Meßzeit, als auch für die Elemente, die zunächst in gestaffelt konzentrierten Standardreihen unter Standardbedingungen gemessen werden.

2.6.2.2.1 Probenstandards

Wir haben mit vier verschiedenen Standardlösungen gearbeitet, die verschiedene Elemente in definierten Konzentrationen enthielten. In Gelatinepräparaten wurden Natrium, Kalium, Schwefel, Phosphor, Calcium, Magnesium, Silizium, Chlor, Fluor und Jod in gestaffelter Konzentration von 0% über 20%, 40%, 60%, 80% bis 100% gelöst, und wie die biologischen Proben für die Messungen präpariert (Schneiden am Kryotom bei -35°C in $10\text{ }\mu\text{m}$ dicke Querschnitte, Auftragen auf Kohlenstoffträger, Lyophilisieren, Bedampfen mit Spektralkohle).

Die Probenstandards wurden dann der EDX-Analyse unterzogen. Die Ergebnisse wurden nach dem Peak/Background-Prinzip ausgewertet. Sie dienten dann als Grundlage für die Quantifizierung der PB-Quotienten der biologischen Proben. Im Statistikprogramm InStat wurden die PB-Quotienten auf ihre lineare Regression hin überprüft. Es zeigte sich jeweils eine lineare Regression zwischen der in Gelatine eingewogenen Menge der Elemente und den Peak/Background-Werten aus den Messungen mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,84$ bis $r^2 = 0,95$. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass der Proteingehalt des Probenstandards keinen Einfluß auf die Korrelation hat, das heißt, dass der Proteingehalt des zu untersuchenden Gewebes (z.B. der Hornhaut) nicht im Standard simuliert werden muß, um korrekte Ergebnisse zu erzielen (Pels et al.).

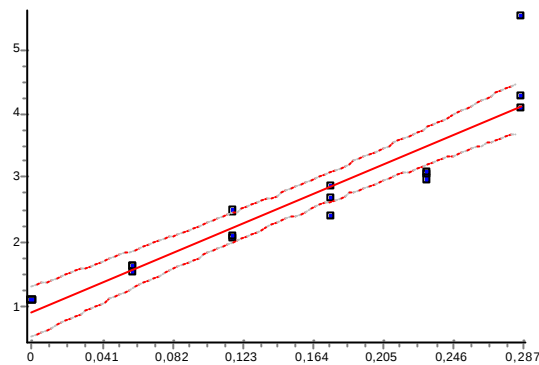


Abb. 2-7: Lineare Regression am Beispiel des Phosphatstandards. $r^2 = 0,8732$. r^2 ist hier durch den Ausreißerwert des 100% Standards bedingt. Ordinate: P/B-Werte des Probenstandards in Konzentrationen von 0-100%. Abszisse: Phosphat-Einwaage (mmol/g) in die Standardlösung (0-100%).

2.6.2.2.2 Meßstandards

Bei den Messungen zu diesem Versuchsaufbau und dieser Fragestellung kam dem Nachweis von Jod und Fluor eine besondere Bedeutung zu. Um für diese Elemente, die jeweils eine Sorte der von uns verwendeten Augentropfen repräsentieren, ideale Meßbedingungen zu haben, mußten wir die durch Schrage et al. bereits etablierten Meßstandards geringfügig modifizieren. Daraus resultierte ein zufriedenstellender Nachweis von Jod. Leider war es dennoch nicht möglich mit Hilfe der EDXA das Fluor der 1%igen Ciprofloxacinlösung nachzuweisen. Die zu erwartenden Konzentrationen lagen offenbar unter der Nachweisgrenze dieser Methode. Diese liegt bei 0,5% Fluor in der untersuchten Probe.

Die Nachweisgrenze für Jod wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Sie liegt bei Pels et al. bei 0,2 mg/ml Jod (2mg/ml PVP-Jod). Hall et al. geben die Nachweisgrenze für Jod bei 10^{-14} g an. Dieser Unterschied läßt sich möglicherweise dadurch erklären, dass das corneale Gewebe sich nicht ideal zur EDX-Analyse eignet, im Vergleich zu industriell gefertigten glatten Oberflächen.

Die Meßbedingungen sahen wie folgt aus:

- Probendicke 10 μm
- Auftragen der Probe auf einen Glaskohlenstoffträger der Firma CTI-Technik
- Definierter Meßabstand zur Probe im Elektronenmikroskop 25 mm
- Beschleunigungsspannung im Elektronenmikroskop 15 keV
- Probenstrom 6 nA
- Life time Meßzeit 50 Sekunden

2.6.2.3 Meßorte

Wir verwendeten ein Schema, das es ermöglichte, neben einem Überblick über die normale Elementverteilung in den verschiedenen Schichten der Hornhaut auch die besonders interessanten Bereiche rund um die Mikrotrepanationen einzubeziehen.

Dazu führten wir an zwei Orten der im Querschnitt vorliegenden Hornhaut vertikal untereinander fünf Messungen in folgenden Schichten und folgender Reihenfolge durch: 1. Descemet-Membran; 2. Vor-Descemet; 3. Stromamitte; 4. Subepithel; 5. Epithel. Bei trepanierten Hornhäuten wurden diese Messungen peripher von den Trepanationen vorgenommen, um die Penetration des Jods in die Peripherie beurteilen zu können.

Bei trepanierten Hornhäuten wurden zusätzlich drei Messungen in dem die Trepanationen umgebenden stromalen Gewebe vorgenommen: 1a. Trepan links; 2a. Trepan rechts; 3a. Trepan unten (Abb. 2-8).

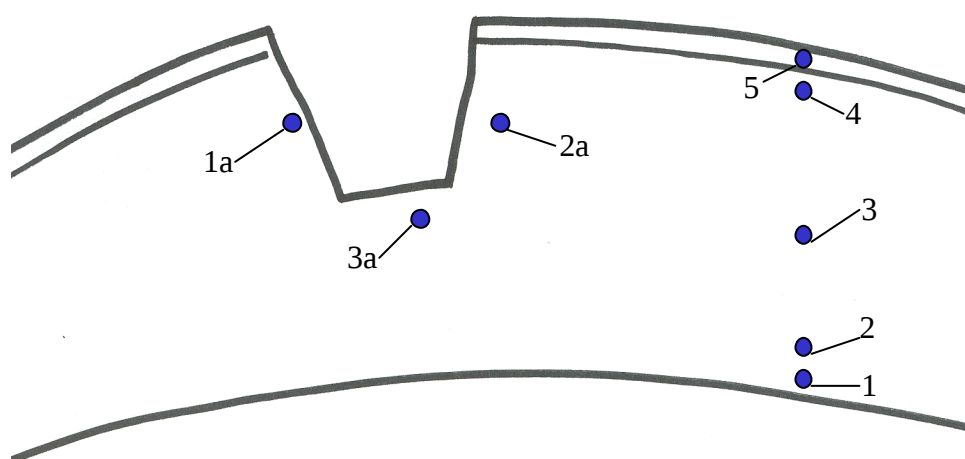


Abb. 2-8: Querschnitt der Hornhaut mit Meßpunkten der EDXA, schematisch

2.6.2.4 Ophthalmologische Anwendung

Die EDXA wird in der Ophthalmologie unter anderem zur Analyse des Tränenfilms bzw. des Tränenfarns verwendet, das entsteht, wenn Tränen eintrocknen (Pearce et al.). Auch hierbei wird die Möglichkeit genutzt, die Zusammensetzung des Tränenfilms an verschiedenen Lokalisationen genau zu analysieren, darüber hinaus kann Schwefel nachgewiesen werden, der auf Makromoleküle wie Muzine und Proteine hinweisen würde.

In Verbindung mit Jod wird die EDXA verwendet, um im Zusammenhang mit der Dekontamination von humanen Spenderaugen die Penetration von PVP-Jod in die Hornhaut zu analysieren (Pels et al.). In der genannten Studie wurden Querschnitte der Hornhaut bei 15 kV und einer Meßfeldgröße von 200 nm gemessen. An vier Orten des Querschnitts wurde jeweils gemessen (Basalmembran des Epithels, Bowman, anteriores Stroma, zentrales Stroma), und eine semiquantitative Analyse erfolgt anhand der P/B-Quotienten.

2.6.3 Mapping

Mappings dienen der visuellen Darstellung der Verteilung ausgewählter Elemente in einer Probe. Das Mapping ist eine Art von Kartierung des Meßfeldes im Elektronenmikroskop. In einem ausgewählten Meßfeld wird bei 150-facher Vergrößerung über eine Zeit von 90 Minuten selektiv das Signal eines Elementes (z.B. Jod) gesammelt. Die Signale der spezifischen Strahlung werden als Bildpunkte im Meßfeld abgebildet und ergeben eine visuelle Darstellung der Verteilung dieses Elementes im Meßfeld. Abhängig davon, wie hoch konzentriert das Element in den verschiedenen Schichten der Probe vorliegt, ist die Elementverteilung an der Abstufung der Grauwerte auf dem Bildausschnitt sichtbar.

In der Abb. 2-9 ist oben links das Sekundärelektronenbild (SE 255) dargestellt. Es werden alle emittierten Signale detektiert, und somit erhält man einen Überblick über das Meßfeld. Die Abkürzung Backgr. bezeichnet das Hintergrundsignal des Probenhalters. Die anderen Bilder zeigen eine selektive Detektion der angegebenen Stoffe (Phosphat, Schwefel, Jod). Die Zahlen hinter der Meßbezeichnung geben die Counts an, die die Anzahl von Signalen des gesuchten Elementes aus diesem Bereich bezeichnen.

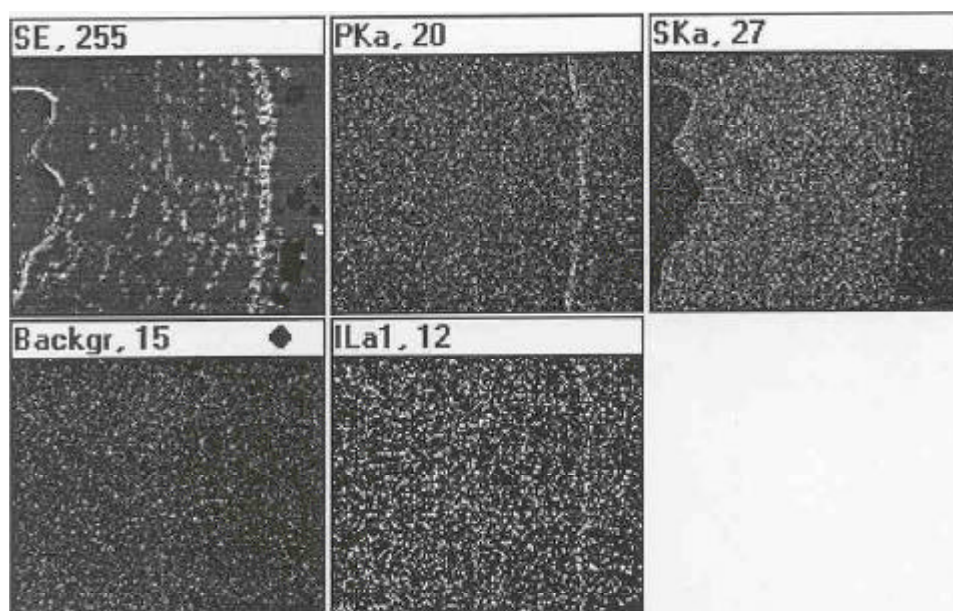


Abb. 2-9: Mapping der Probe 471. Das Epithel ist intakt, SE: Sekundärelektronenbild, PKa: Phosphatdetektion, SKa: Schwefeldetektion, ILa: Joddetektion

2.7 Versuchsaufbau

Die folgende Tabelle zeigt den Versuchsaufbau in beiden Teilen der Studie.

Versuchsteil Trondheim (NMR)			Versuchsteil Aachen (EDXA)			
12 Tiere			16 Tiere			
1. n = 8 0,3% Ciprofloxacin		2. n = 4 1% Ciprofloxacin	I. n = 8 11% PVP-Jod		II. n = 8 1% Ciprofloxacin	
1.1 n = 4 Epithel abradiert	1.2 n = 4 Hornhaut intakt	2.1 n = 4 Hornhaut intakt	I.1 n = 4 Hornhaut trepaniert	I.2 n = 4 Hornhaut intakt	II.1 n = 4 Hornhaut trepaniert	II.2 n = 4 Hornhaut intakt
Tropfschema: 50 µl alle 15 min. über 2 h Enukleation nach Versuchsende und Lagerung der Proben bei – 80° C						

Tab. 2-3: Versuchsaufbau des Tierversuchs an Kaninchen in beiden Teilen der Studie. n = 4: vier Kaninchenaugen / Gruppe

Wir haben im Trondheimer Versuchsteil auf die Unterteilung der Gruppe 2 verzichtet, weil bereits bei der Applikation von 0,3% Ciprofloxacin und abradiertem Hornhautepithel die Nachweisgrenze der NMR-Spektroskopie für Fluor sicher überschritten wurde. Da die therapeutische Dosierung der Augentropfen bei 0,3% liegt, erschien es uns nicht sinnvoll, bei

bereits gesichertem Stoffnachweis in den Tierversuch eine Gruppe mit höherer Dosierung einzuschließen.

2.7.1 Versuchsdurchführung

Der Tierversuch wurde in Übereinstimmung mit der ARVO Resolution zum Gebrauch von Tieren in der Forschung, mit dem deutschen Tierschutzgesetz (§8-1 Tierschutzgesetz) bzw. nach Zustimmung der zuständigen Ethikkommission durchgeführt.

Die Kaninchen der Rasse Chinchilla bastard (2-3 kg) wurden mit einer Lösung aus Ketamin, Rompun und NaCl (je 1 ml) narkotisiert. Sie erhielten initial 1,5 ml subcutan und wurden dann nach Bedarf mit 0,2-0,3 ml intravenös nachmediziert.

Bei den Gruppen I.1 und II.1 des Aachener Versuchsteils wurden unter Narkose vor Beginn der Tropfenapplikation Mikrotrepanationen in die Hornhaut gesetzt. Jede dieser Hornhäute wurde 10mal trepaniert. Die Entfernung des Epithels im Trondheimier Versuchsteil (Gruppe 1.1) erfolgte ebenfalls unter Narkose. Das Epithel wurde mit Hilfe einer Rasierklinge und Baumwollstäbchen entfernt.

Unmittelbar nach diesen vorbereitenden Maßnahmen wurde mit der Tropfbehandlung begonnen. Die Behandlung mit den Augentropfen stimmte in beiden Teilen der Studie überein. Die Tropfenapplikation erfolgte in allen Fällen über 2 Stunden. Es wurde alle 15 Minuten ein Tropfen (= 50 µl) der jeweiligen Augentropfen mit einer Eppendorfpipette in den unteren konjunktivalen Fornix appliziert. Dies entspricht einer Gesamtmenge von 400 µl für jedes behandelte Auge.

Der Versuchsablauf war unproblematisch. Die Kaninchen waren gut narkotisiert und ließen sich problemlos behandeln. Wir achteten darauf, dass während der zwei Stunden dauernden Tropftherapie die Hornhäute der Tiere nicht austrockneten, weil unter der Narkose der Lidschluß nicht immer vollständig war.

Zehn Minuten nach der letzten Tropfenapplikation wurden die Kaninchen mit einer Überdosis Narcoren (5 ml) eingeschläfert.

2.7.1.1 E nukleation und Lagerung der Präparate

Die E nukleation des Auges erfolgte nach der Feststellung des Todes. Das Kammerwasser wurde mit einer 27 Gauge Nadel aus dem Auge aspiriert und bei -80° C gelagert.

Bei den trepanierten Hornhäuten wurde die Ebene der Trepanierungen in der Hornhaut mit einer Fadenmarkierung gekennzeichnet, um das Wiederauffinden der Trepanationen beim Schneiden der Präparate zu erleichtern.

Die Hornhaut wurde ca. 2 mm außerhalb des Limbus herausgeschnitten und in flüssigem Stickstoff gestoppt. In der Aachener Klinik stehen hierzu zwei Stahlstempel zur Verfügung, die in flüssigem Stickstoff vorgekühlt werden. Durch den hohen Wärmeleitkoeffizienten von Stahl erfolgt die Kühlung der Präparate sehr schnell. Dadurch werden Leichenfrostphänomene am Präparat sicher verhindert, und darüber hinaus steht das Präparat in nahezu physiologischer Form zur morphologischen Beurteilung unter dem Elektronenmikroskop zur Verfügung.

Alle Hornhautpräparate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Linsen wurden im Trondheimer Versuchsteil mit einer Linsenschlinge entfernt. Die Zonulae wurden mit einer Schere vorsichtig gelöst. Anschließend wurden die Proben gewogen, in flüssigem Stickstoff gestoppt und bei -80°C gelagert.

2.7.2 Vom Präparat zur Probe

2.7.2.1 NMR-Spektroskopie

2.7.2.1.1 Kammerwasser

Kammerwasser wird vorbereitend für die NMR Analyse gefriergetrocknet, in 0,3 ml Deuteriumoxid (D_2O) gelöst und ein zweites Mal gefriergetrocknet. Dieses Vorgehen dient der Minimierung des Wassersignals bei der ^1H -NMR-Spektroskopie. Direkt vor den Messungen wird die Probe in 0,5 ml D_2O gelöst. Der Lösung wird für die ^1H -NMR-Spektroskopie Natrium-3'-trimethylsilylpropionat-2,2,3,3- d_4 (TSP; 0,05 mM) als interner Standard zugesetzt. Für die ^{19}F -NMR-Spektroskopie verwendeten wir als externen Standard Trifluoressigsäure (TFA) oder Hexafluorbenzen (HF).

2.7.2.1.2 Hornhaut und Linse

Perchlorsäureextraktion (PCA-Extraktion):

Die Methode ähnelt der von Greiner et al. Hornhaut und Linse besitzen einen hohen Proteinanteil. Die Perchlorsäureextraktion bewirkt die Elimination dieser Proteine. Sie könnten sonst ebenfalls, wie auch das Wasser, durch zu dominante Signale die Interpretation des ^1H -Spektrums erschweren. Im Kammerwasser ist der Proteinanteil so gering, dass die Protonenspektroskopie nicht gestört wird, und somit eine vorherige PCA-Extraktion nicht erforderlich ist.

Das Präparat wird in einem Mörser, der zuvor mit flüssigem Stickstoff abgekühlt wird, zerkleinert und mit 0,5 ml 7%-iger Perchlorsäure (PCA) mit einem Teflonspatel vermischt,

bis sich das Gemisch dem Schmelzpunkt nähert. Es folgt eine erste Zentrifugation von zehn Minuten bei 4000 U/min. Der Überstand wird mit 10 M (M = molar) und 1 M Kaliumhydroxid auf pH 6,9 neutralisiert. Nachdem die Probe ein weiteres Mal, sieben Minuten bei 4000 U/min, zentrifugiert worden ist, kann der Überstand abgenommen werden. Zurück bleibt als Pulver Kaliumpermanganat (KClO_4). Der Überstand wird gefriergetrocknet, in 0,3 ml D_2O gelöst und wiederum gefriergetrocknet. Anschließend wird die Probe bei -80°C bis zur Spektroskopie gelagert.

Unmittelbar vor der NMR-Spektroskopie wird die Probe in D_2O gelöst, der pH-Wert auf 6,9 reguliert und zentrifugiert. Entsprechend den Anforderungen der Messung wird der Standard ausgewählt.

2.7.2.2 EDXA

Um Hornhautpräparate für die EDXA meßbereit zu machen, werden sie auf einem Kryomikrotom der Firma Leitz (Leitz 1700 Digital Cryostat) geschnitten. Das Gerät arbeitet bei einer Temperatur von -35°C . Die Hornhäute werden in zwei Hälften geteilt und eine Hälfte wird in einem Einbettmedium auf die Schneideoberfläche aufgebracht. Dann werden Querschnitte der Hornhaut angefertigt und auf einen Objektträger aufgetragen.

Um Anschnitte der Trepanationen für die Messungen zur Verfügung zu haben, werden Kontrollschnitte von $20\text{ }\mu\text{m}$ Dicke auf Glasobjektträger aufgebracht und mit HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) gefärbt. Sie werden unter dem Mikroskop nach Trepanationen durchgesehen. Wir wählten eine Schnittdicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ für die Glasobjektträger, die für die histologische Auswertung vorgesehen waren, und ebenfalls $10\text{ }\mu\text{m}$ für die Schnitte, die auf Glaskohlenstoffträger zur EDX-Analyse aufgebracht wurden.

Anschließend werden die Proben auf den Glaskohlenstoffträgern lyophilisiert, im Vakuum aufbewahrt und unmittelbar vor der EDXA-Messung mit Spektralkohle bedampft.

2.7.3 Feuchtgewicht (FG), Trockengewicht (TG), Osmolarität

Einige der Hornhauthälften wurden zur Feststellung des Feucht- und Trockengewichts und der Hydratation verwendet. Wir verwendeten eine Satorius Automatik Waage (S2000) mit einer Präzision von $0,005\text{ mg}$. Die Waage wurde mit Hilfe eines Schlauchsystems, das gasförmigen Stickstoff (-150°C) in die Waage einleitete, vorgekühlt. Der Stickstoffflow wurde so reguliert, dass der Meßaufbau stabile Meßwerte lieferte und nicht durch Bildung von Eiskristallen irritiert wurde.

2.7.3.1 Feuchtgewicht (FG), Trockengewicht (TG)

Zur Feststellung des Feuchtgewichtes werden bei -80°C gefrorene Hornhauthälften, die nicht zur EDX-Analyse verwendet werden, gewogen. Anschließend werden die Proben über 48 Stunden lyophilisiert und mit der gleichen Meßmethode wie beim Feuchtgewicht wird das Trockengewicht der Proben ermittelt.

2.7.3.2 Hydratation

Die Hydratation gibt Aufschluß über den Wassergehalt der Proben und damit über eventuelle Quellung oder Austrocknung der Präparate. Sie ergibt sich aus der Formel: $(\text{FG}-\text{TG})/\text{FG}$.

2.7.3.3 Osmolarität

Nachdem das Trockengewicht festgestellt worden ist, werden die Proben rehydriert, und zwar exakt mit der Menge Wasser, die ihnen beim Gefriertrocknen entzogen worden ist. Mit einem Osmometer der Firma Gonotec (Cryoscopic Osmometer, Osmomat 030) wird die Osmolarität der Proben ermittelt. Hiermit kann man Aufschluß über den Quellungszustand der Proben bekommen. Außerdem dient sie der Kontrolle der EDXA.

2.7.4 Makroskopische Beurteilung

Unter dem Versuch wurden die Kaninchenaugen nach ihrem makroskopischen Aspekt beurteilt, zum einen, um Austrocknungen der Hornhaut vorzubeugen, zum anderen, um Veränderungen, die durch die Augentropfen bedingt sein könnten, zu erkennen.

2.7.5 Histologie

Da es sich in diesem Versuch um gesunde Kaninchenhornhäute handelte, bot sich die Histologie vor allem zur Dokumentation der Trepanationen an. Es konnten mit Hilfe der HE-Färbung Größe und Form der Bohrlöcher beurteilt und vermessen werden. Außerdem konnten wir prüfen, ob sich mikroskopisch auffällige Veränderungen in der Morphologie der Hornhaut (Dicke, Flüssigkeitsgehalt der Zellen) ergeben haben, etwa infolge des Einflusses der Augentropfen.

Die Masson-Goldner-Färbung läßt eine besonders gute Differenzierung zwischen Epithel und darunterliegendem Stroma zu, da sich das zellreiche Epithel rot anfärbt, während die kollagenen Fasern des Stromas grün imponieren.

Eine Anfärbung von Jod in den mit PVP-Jod betropften Hornhäuten mit Hilfe der Umkehrung der Jod-Stärke-Reaktion gelang nicht, da vermutlich die Jodkonzentrationen in den $10\text{ }\mu\text{m}$ dünnen Schnitten zu gering für eine deutliche Farbreaktion waren.

3 Ergebnisse

3.1 NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance)

3.1.1 Ciprofloxacin-Spektren

Es wurden zunächst ein ^1H -Spektrum, ein ^{13}C -Spektrum und ein zweidimensionales ^1H - ^{13}C -Spektrum von reinem Ciprofloxacin, gelöst in D_2O , angefertigt.

Ziel war die Lokalisation von Ciprofloxacin in einem Spektrum neben dem Signal eines Standards, so dass bei weiteren Analysen ein gezieltes Suchen nach Signalen des Moleküls im Spektrum möglich war.

Die Zuordnung der einzelnen Peaks zu den entsprechenden H- und C-Atomen im Molekül erfolgte nach dem IUPAC Schema (International Union of Pure and Applied Chemistry), in Zusammenarbeit mit Prof. Norbert Müller, Institut für Chemie, Johannes Kepler Universität Linz.

3.1.1.1 Proton-Spektrum

Als interner Standard wurde TSP (Natrium-3-Trimethylsilylpropionat) verwendet. Das Signal des TSP ist auf σ 0,0 ppm festgelegt. HOD (Wasser, Deuterium) gibt ein starkes Signal bei 4,78 ppm.

Im Spektrum zeigt sich eine Hochfrequenzregion im Bereich von 0-5 ppm. Die großen Triplets bei σ 3,54 ppm und 3,64 ppm sind $2',6'\text{-CH}_2$ bzw. $3',5'\text{-CH}_2$ des Piperazinringes zuzuordnen. Mit in diesem Komplex befindet sich auch das Signal des $1''\text{-CH}$ der Cyclopropylgruppe. Es liegt bei σ 3,69 ppm. Die anderen Protonen der Cyclopropylgruppe geben zwei Duplettsignale. Es handelt sich dabei um das trans- bzw. cis-Signal von $2'',3''\text{-CH}$ bei σ 1,45 ppm bzw. 1,19 ppm.

Die aromatische Region des Spektrums beginnt bei σ 7,38 ppm mit einem Duplett von 5-CH und einem von 8-CH bei σ 7,48 ppm. Bei σ 8,58 ppm liegt ein Singlett, das dem 2-CH zuzuschreiben ist. Die genauen Werte der chemischen Verschiebung finden sich in Tab. 3-1. Zwischen den zwei übergeordneten Regionen (3,8 ppm-7,3 ppm) befindet sich ein signalarmer Abschnitt, in dem wir nur das Wassersignal bei σ 4,8 ppm finden.

Kohlenstoff-Nummer	¹ H-Nummer	¹ H-Signal: δ (ppm)
Cyclopropylgruppe	H-1''	3,69
	H-2'', H-3'' - cis	1,19
	H-2'', H-3'' - trans	1,45
C2	H-2	8,58
C5	H-5	7,38
C8	H-8	7,48
Piperazingruppe	H2-2', H2-6'	3,64
	H2-3', H2-5'	3,54

Tab. 3-1: ¹H-Signale von Ciprofloxacin (gelöst in D₂O, δ in ppm relativ zu TSP bei 0,0 ppm)

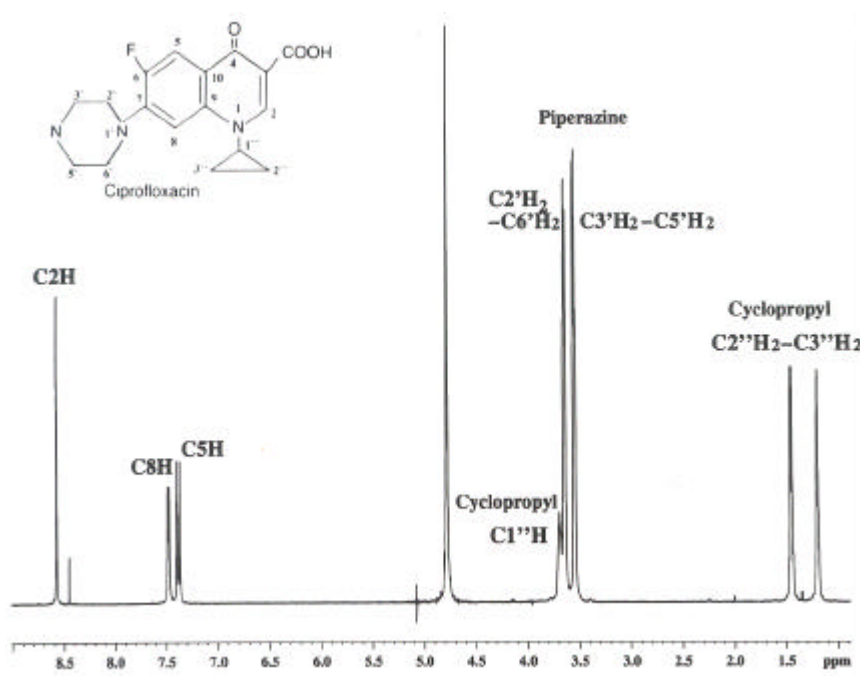


Abb. 3-1: Eindimensionales ¹H NMR-Spektrum von Ciprofloxacin, gelöst in D₂O. Beschriftet sind die chemischen Verschiebungen. Eingefügt ist die Strukturformel von Ciprofloxacin.

3.1.1.2 Carbon-Spektrum

Das eindimensionale ¹³C-Spektrum stellt die Peaks der im Ciprofloxacinmolekül vorhandenen Kohlenstoffatome dar.

Ciprofloxacin zeigt hier ein Singlett bei σ 10,402 ppm, das dem C2'',C3'' der Cyclopropylgruppe zuzuordnen ist. Ein Singlett von C1'' findet sich bei σ 39,005 ppm.

Die Signale des Piperazinringes sind in ein Singlett von C3',C5' bei σ 46,114 ppm und ein doppeltes Signal von C2',C6' bei σ 49,207 ppm und 49,165 ppm einzuteilen. Es besteht eine Vierbindungskopplungskonstante JFC = 5 Hz zwischen dem F-Atom und den C-Atomen von C2', C6'. Weitere Kopplungskonstanten sind auch zwischen dem Fluoratom und anderen Kohlenstoffatomen zu finden.

Mit C4a (bei σ 121,25 ppm und 121,31 ppm) besteht eine Dreibindungskopplungskonstante von 7 Hz, mit C5 (bei σ 113,25 ppm und 113,42 ppm) eine Zweibindungskopplungskonstante von 23 Hz, mit C6 (bei σ 155,06 ppm und 157,06 ppm) eine Einbindungskopplungskonstante von 250 Hz und mit C7 (bei σ 147,38 ppm und 147,46 ppm) eine Zweibindungskopplungskonstante von 10 Hz.

Das Signal des C2-Atoms liegt bei σ 150,86 ppm, während C3 und 3-COOH bei σ 108,50 ppm bzw. bei 171,45 ppm zu finden sind. C4 präsentiert sich bei σ 178,33 ppm und C8 bzw. C8a liegen bei σ 109,27 ppm bzw. 141,64 ppm. Die genauen Werte der chemischen Verschiebungen werden auch noch einmal in Tab. 3-2 wiedergegeben.

Kohlenstoff-Nummer	¹³ C-Signal: σ (ppm)
C1''	39,0
C2'', C3''	10,40
C2	150,86
C3	108,50
3-COOH	171,45
C4	178,33
C4a	121,25 121,31 3 JFC=7 Hz*
C5	113,25 113,43 2 JFC=23 Hz*
C6	155,06 157,06 1 JFC=250 Hz*
C7	147,38 147,46 2 JFC=10 Hz*
C8	109,27
C8a	141,64
C2', C6'	49,17 49,21 4 JFC=5 Hz*
C3', C5'	46,1

Tab. 3-2: ¹³C-Signale von Ciprofloxacin (gelöst in D₂O, σ in ppm)

*Die Schreibweise 2 JFC bedeutet: Zweibindungskopplungskonstante zwischen F und C.

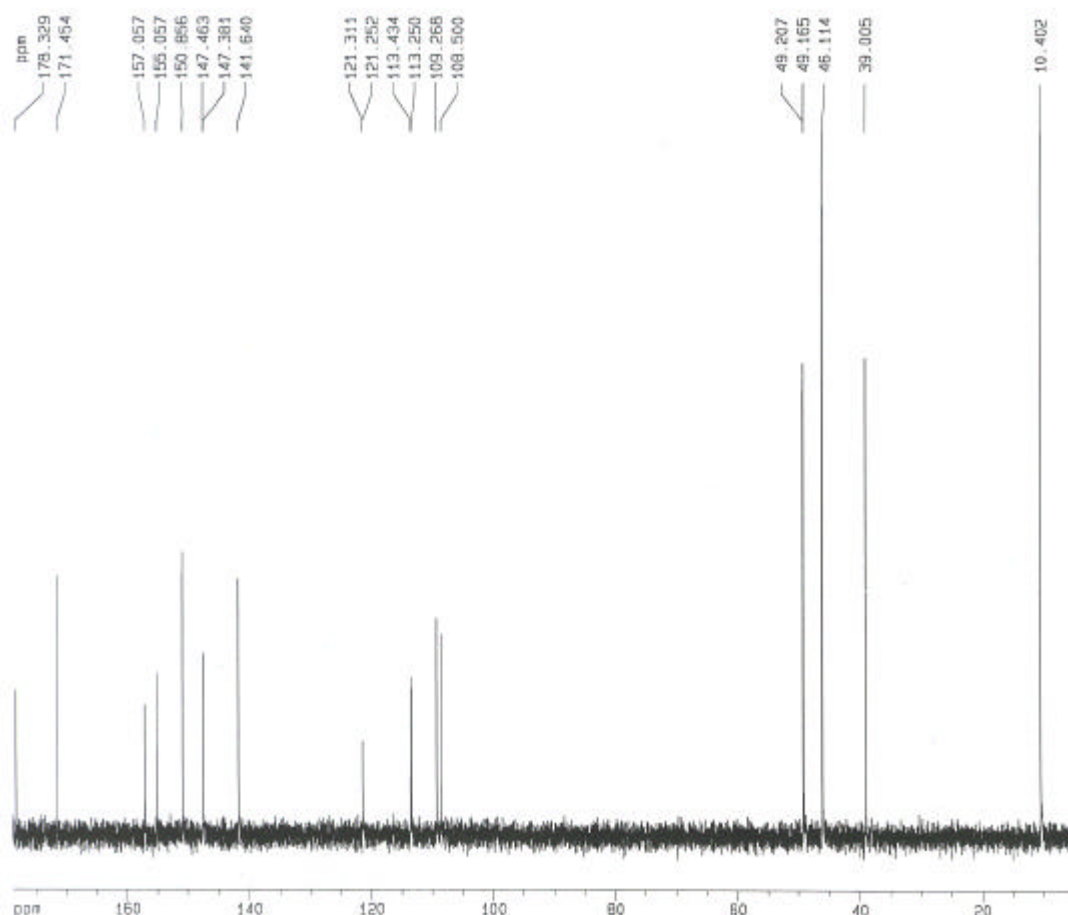


Abb. 3-2: ^{13}C -NMR-Spektrum von Ciprofloxacin in D_2O . Die Zuordnungen der Peaks können der Tab. 3-2 entnommen werden.

3.1.1.3 Zweidimensionales ^1H - ^{13}C -Spektrum

Wir verwendeten eine zweidimensionale Spektroskopie-Technik (2D), um weiteren Aufschluß über Kopplungen zwischen Kernen und sich überlappende Singalen zu erhalten. Es handelt sich dabei um die COSY-Technik (homonuclear chemical shift correlated technique) (Aue et al.). Das zweidimensionale Spektrum gibt die oben beschriebenen Verhältnisse noch einmal in nun kombinierter Form wieder (Abb. 3-3). Es enthält die Signale derjenigen Protonen und Kohlenstoffatome, die gleichzeitig sowohl im ^1H - als auch im ^{13}C -Spektrum repräsentiert sind. Dadurch können Überlappungen entzerrt werden.

Wir sehen dabei die cis- und trans- Signale von 2'',3''-CH der Cyclopropylgruppe, das 1''-CH der gleichen Gruppe, die Signale des Piperazinylringes 2',6'-CH₂ und 3',5'-CH₂ sowie die Signale von 2-CH, 5-CH und 8-CH (s. Tab. 3-1 und Tab. 3-2).

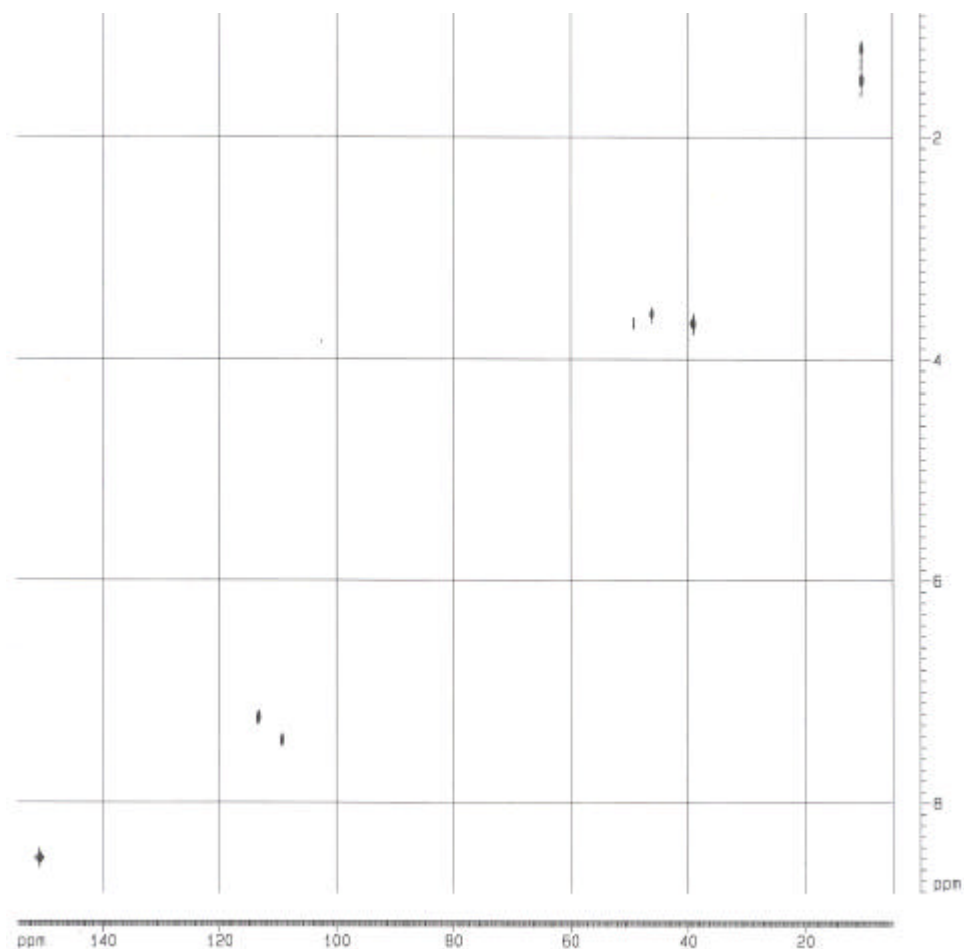


Abb. 3-3: Zweidimensionales COSY-Spektrum von Ciprofloxacin. 1-9 ppm = ¹H-NMR; 10 – 150 ppm = ¹³C-NMR

3.1.1.4 ¹⁹F-NMR-Spektroskopie von 1%-Ciprofloxacin

In einem Spektrum mit Spinkopplungen präsentiert sich das Molekül als doppeltes Duplett, infolge der Kopplungen des Fluoratoms mit C5 und C8 (Abb. 3-4, A). In einem entkoppelten Spektrum zeigt sich ein einzelnes Signal von Ciprofloxacin bei -118,55 ppm, relativ zu TFA bei -72 ppm (Abb. 3-4, B).

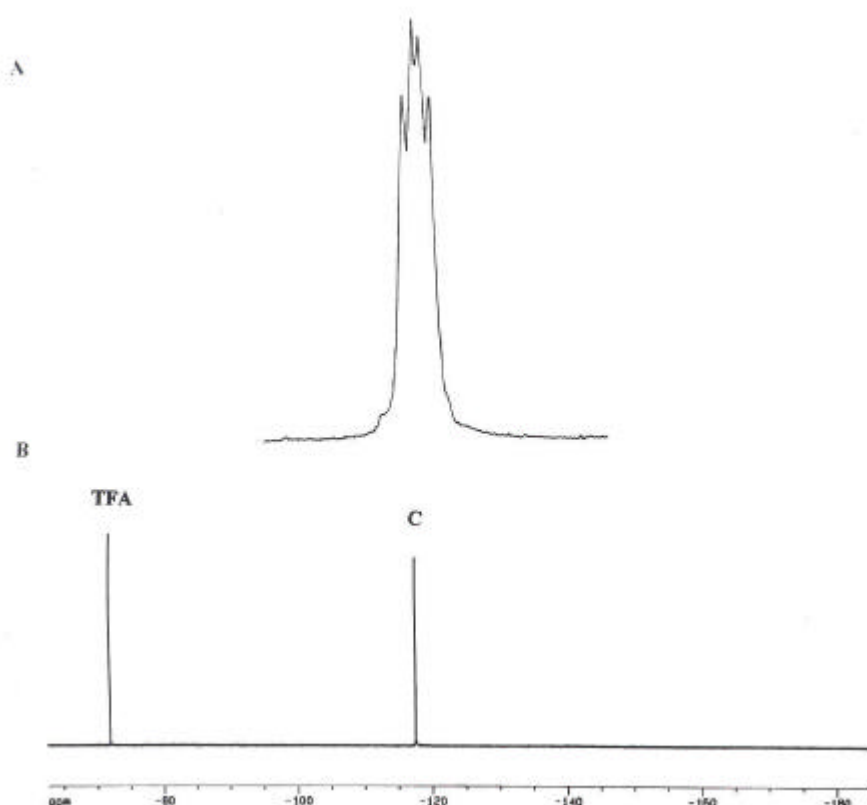


Abb. 3-4: ^{19}F -NMR-Spektroskopie vom Ciprofloxacin

3.1.2 NMR-Spektroskopie der Kaninchenaugen

3.1.2.1 ^1H -NMR-Spektroskopie

Wir fertigten zunächst ^1H -Spektren des Kammerwassers und der Hornhaut an. Die Proben entstammen den mit 1% Ciprofloxacin behandelten Kaninchenaugen mit intaktem Hornhaut-Epithel.

In beiden Spektren lassen sich ungefähr 20 endogene Metabolite identifizieren. Wir richten uns hierbei nach früheren Veröffentlichungen (Midelfart et al. 1996a; Midelfart et al. 1996b, Gribbestad et al.). Es fällt auf, dass im ^1H -Spektrum der mit Ciprofloxacin behandelten Augen nur ein geringes (Hornhaut) oder gar kein Signal (Kammerwasser) von Format zu erkennen ist, während dieser Metabolit bei früheren Messungen unbehandelter Hornhäute deutlich stärker zu identifizieren war.

Die Detektion von Ciprofloxacin, wir kennen die Resonanzfrequenzen aus dem Proton-Spektrum von reinem Ciprofloxacin in D_2O , gelingt in diesen Spektren nicht oder nicht sicher, da die erwarteten Resonanzen in sehr signalreichen Regionen liegen und somit infolge zu starker Überlappungen von endogenen Metaboliten verdeckt werden. Außerdem ist die

Konzentration der Substanz für diesen Nachweis möglicherweise sehr gering. Wir verzichten deshalb im weiteren Verlauf auf ^1H -Spektren.

3.1.2.2 Kammerwasser ^1H -NMR-Spektroskopie

Metaboliten	Chemical shift, ^1H -Signal, s (ppm) s=Singlett, d=Duplett, q=Quartett, m=Multipllett, t=Triplet,
Alanin (Ala)	1,47 (d); 3,76 (q)
Glycin (Gly)	3,56 (s)
Histidin (His)	7,11 (s); 7,89(s); 4,00; 3,25; 3,15
Phenylalanin (Phe)	7,31(m); 7,44 (m); 3,13; 3,24
Taurin (Tau)	3,26 (t); 3,42 (t)
Threonin (Thr)	1,34 (d); 3,58(d); 4,25(m)
Tyrosin (Tyr)	6,88 (d); 7,18 (d); 3,05; 3,15; 3,93
Valin (Val)	0,98 (d); 1,05(d); 2,26(m); 3,55(d)
Laktat (Lac)	1,33 (d); 4,1 (q)
Acetat (Ac)	1,92 (s)
Pyruvat/Succinat (Pyr/Suc)	2,41 (s)
Citrat (Cit)	ca. 2,65
Phosphokreatin/Kreatin (PCr/Cr)	3,05 / 3,04 , 3,94 / 3,93
Inositol (Ino)	4,05 (t); 3,27; 3,53; 3,61
Glucose (Glc)	α : 4,64 (d); β : 5,22 (d)

Tab. 3-3: Metaboliten im Kammerwasser des Kaninchens.

s=Singlett, d=Duplett, q=Quartett, m=Multipllett, t=Triplet

Die Tab. 3-3 zeigt die im Kammerwasser befindlichen Metabolite mit der zugehörigen chemischen Verschiebung, nach einer nach früheren Untersuchungen angefertigten Tabelle (Midelfart et al.). Die fettgedruckten Zahlen bezeichnen die Peaks, die wir in unserem Spektrum sicher identifizieren können.

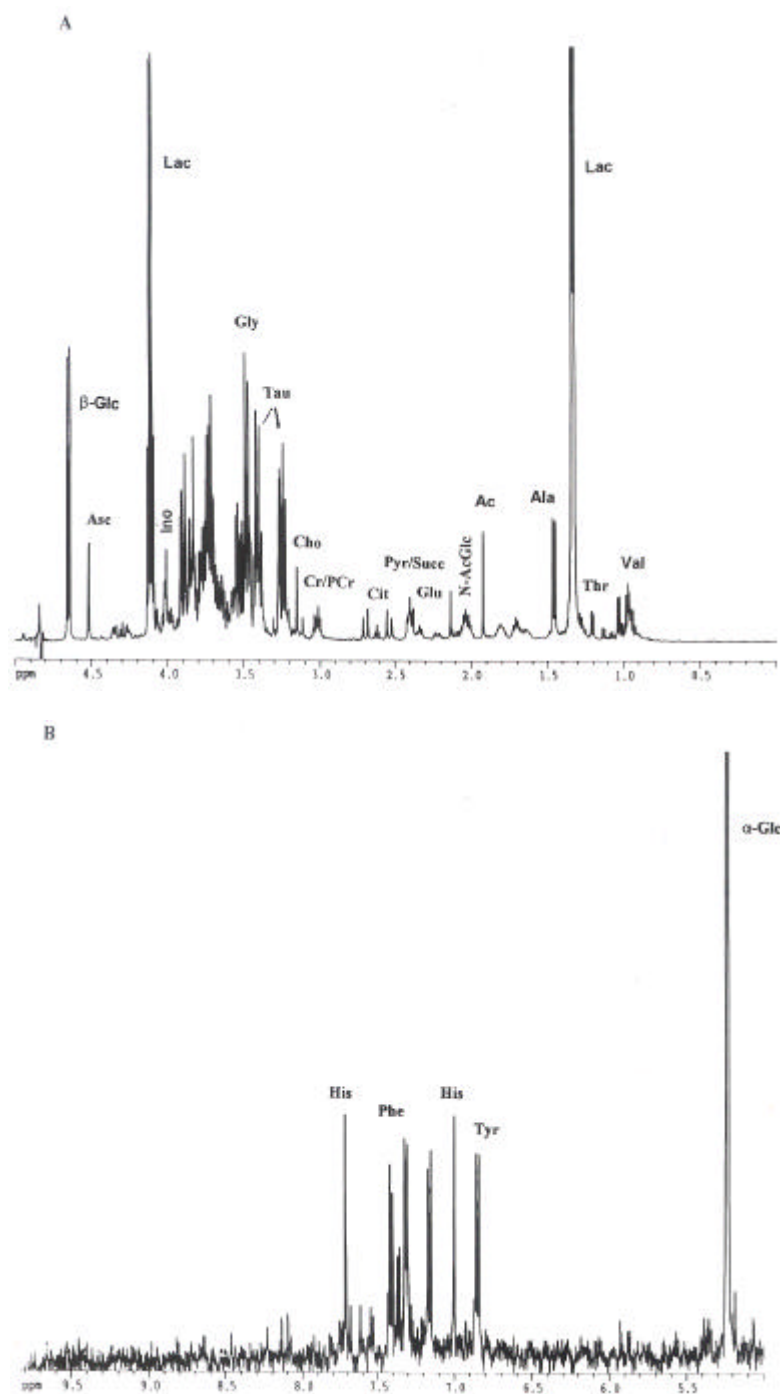


Abb. 3-5: ¹H-NMR-Spektrum des Kammerwassers eines Kaninchenauges mit intaktem Hornhautepithel, behandelt mit 1% Ciprofloxacin. A: ppm-Bereich 0- 5,0; B: ppm-Bereich 5,0 - 10,0

3.1.2.3 Hornhaut ¹H-NMR-Spektroskopie

Das TSP-Signal bei 0 ppm gilt als Bezugspunkt für die chemische Verschiebung der Protonen. Es wurde eine Wassersignalsuppression durchgeführt. Das verbliebene Wassersignal (HOD) ist bei 4,78 ppm zu finden. Das Spektrum zeigt Signale der Metaboliten,

die sich in der Hornhaut des Kaninchens befinden. Ich orientiere mich auch hier an früheren Messungen und möchte auf die entsprechende Literatur (Midelfart et al. 1996) verweisen.

Gut zuzuordnen sind Laktat bei 1,33 ppm, Alanin bei 1,47 ppm und Acetat bei 1,92 ppm. In dieser Probe sieht man auch ein deutlicheres, wenngleich vergleichsweise schwaches Formatsignal bei 8,46 ppm, als in der Kammerwasserprobe.

Eine hohe Signaldichte von Metaboliten findet sich zwischen 3,2 ppm und 4,11 ppm; ein weiteres Laktatsignal schließt diesen Abschnitt ab.

3.1.2.4 ^{19}F -NMR-Spektroskopie Kaninchen - Hornhaut, Kammerwasser, Linse

Wir verwendeten als externen Standard 66 $\mu\text{g/ml}$ TFA (Trifluoressigsäure) oder HF (Hexafluorbenzen, C_6F_6). Neben dem Signal des Standards findet sich das Signal von Ciprofloxacin bei -118,55 ppm (relativ zu TFA bei -72 ppm und C_6F_6 bei -162 ppm). Das gilt für alle untersuchten Gewebe (Kammerwasser, Hornhaut, Linse). In der Hornhaut findet sich neben dem bekannten und deutlichen Signal für Ciprofloxacin, bei -121,5 ppm ein zwar quantitativ geringes, aber dennoch deutliches zusätzliches Fluorsignal. Das Signal ist auch im Spektrum des Kammerwassers zu finden, wenn auch in deutlich schwächerer Ausprägung.

In der Linse sind mit der ^{19}F -NMR-Spektroskopie Spuren von Ciprofloxacin nachzuweisen. Nach Behandlung mit 0,3% Ciprofloxacin und bei abradertem Epithel ist das Fluorsignal nachweisbar.

Die Quantifizierung der Fluorsignale ergibt für die Hornhaut eine Ciprofloxacinkonzentration von $132 \pm 18 \mu\text{g/g}$ ($n=2$). Für die Kammerwasserprobe ist das Ergebnis $42 \mu\text{g/ml}$. Die zur Quantifizierung herangezogenen Proben entstammen den Augen mit intaktem Epithel, die mit 1% Ciprofloxacin behandelt wurden.

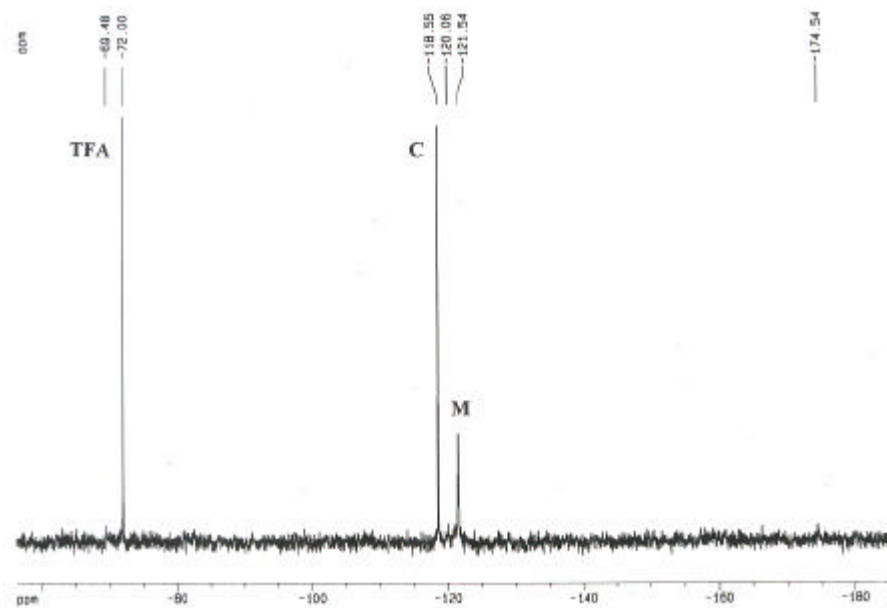


Abb. 3-6: ^{19}F -NMR-Spektrum der Hornhaut eines Kaninchens mit intaktem Hornhautepithel, behandelt mit 1% Ciprofloxacin (C), TFA: externer Standard, M= möglicherweise Metabolit des Ciprofloxacin.

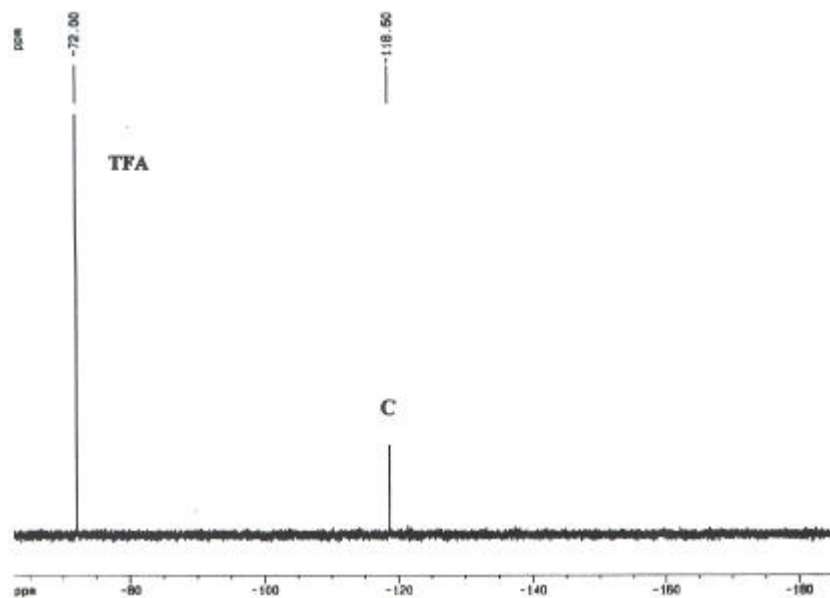


Abb. 3-7: ^{19}F -NMR-Spektrum einer Kammerwasserprobe eines intakten Kaninchenauges, behandelt mit 1% Ciprofloxacin (C); TFA: externer Standard.

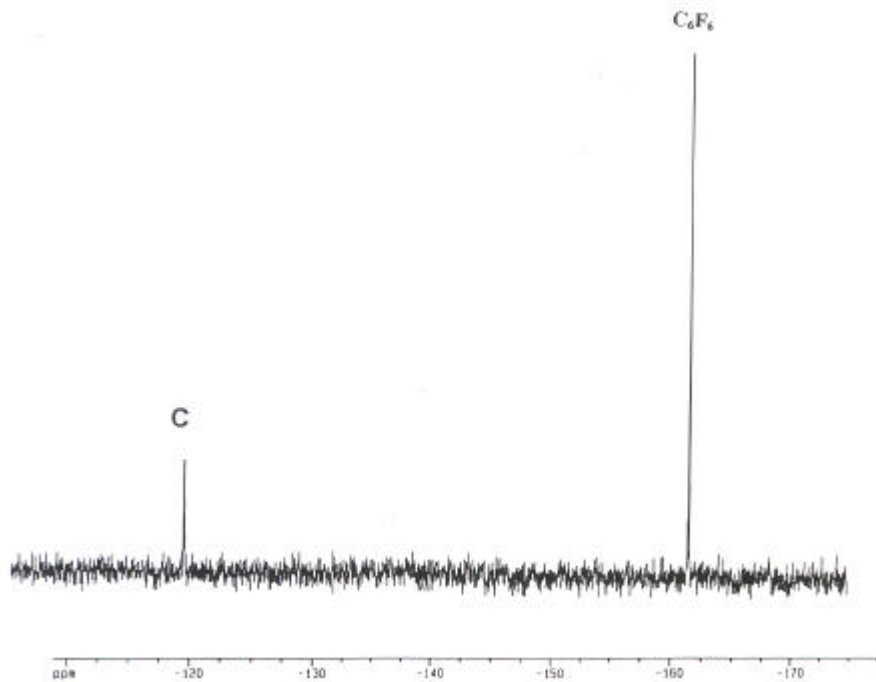


Abb. 3-8: ^{19}F -NMR-Spektrum der Linse eines Kaninchenauges mit abradiertem Hornhautepithel, behandelt mit 0,3% Ciprofloxacin (C), C₆F₆ = Hexafluorbenzen.

3.2 EDXA

Bei der statistischen Auswertung der folgenden Ergebnisse stellt sich zum Teil das Problem relativ kleiner Stückzahlen der Werte, die in die statistischen Berechnungen eingehen. Dies muß man bedenken, wenn statistische Signifikanzen angegeben werden, denn bereits moderate Schwankungen der Werte können bei einem kleinen Kollektiv zu wiederum signifikanten Änderungen der statistischen Ergebnisse führen. Zur statistischen Auswertung wurden aus dem Statistikprogramm Instat nonparametrische Tests verwendet. Zum Vergleich der Verteilung eines Elementes in den verschiedenen Schichten der Hornhaut wurde „Dunn’s multiple comparison test“ herangezogen. Zum Vergleich eines Elementes innerhalb zweier Schichten wurde ein ungepaarter T-Test mit Welch-Korrektur durchgeführt.

Wenn man die Konzentrationen der natürlich in der Hornhaut vorkommenden Elemente mit Normalwerten vergleicht (Schrage et al. 1996, de Azavedo et al., Midelfart et al. 1996a), entsprechen unsere in dieser Studie gemessenen Werte relativ, was das Konzentrationsverhältnis der Hornhautschichten zueinander angeht, den Normwerten. Ich habe hier zwei Elemente (Phosphat und Chlor) exemplarisch ausgewertet, da es in dieser Studie nicht schwerpunktmäßig um die Normalverteilung der Elemente in der Hornhaut geht. Zudem sind absolute Werte nicht sicher vergleichbar, da die Meßstandards angepaßt werden mußten. Wichtig war uns, zu wissen, dass die vorherigen Ergebnisse reproduzierbar sind, und unsere Werte im Bereich normaler, gesunder Kaninchenhornhäute liegen. Die Tabellen der

Ergebnisse zu allen gemessenen Elementen befinden sich im Anhang. Ich möchte außerdem, bei entsprechender Fragestellung, auf die oben genannten Quellen verweisen.

3.2.1 Phosphatkonzentrationen im Vergleich

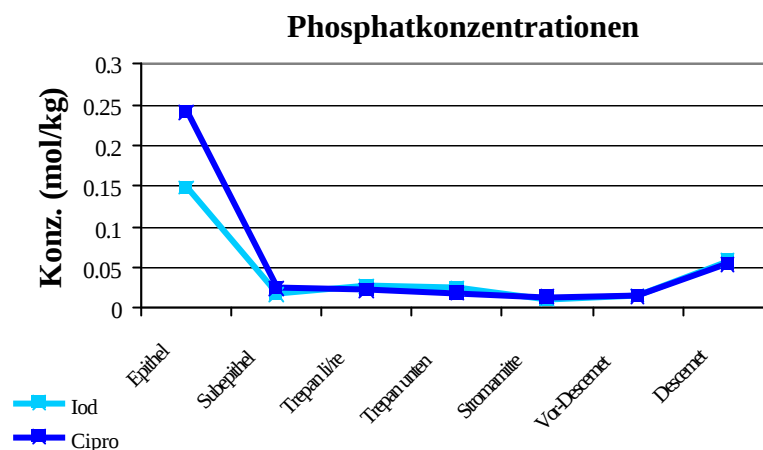


Abb. 3-9: Phosphatkonzentrationen in den Schichten der Hornhaut im Vergleich: Jod- bzw. Ciprofloxacin-Behandlung

Mol/kg	Epithel	Sub-Epithel	Trepan li/re	Trepan unten	Stroma-mitte	Vor-Descemet	Descemet
Jod	0,1482	0,0164	0,0274	0,0245	0,0111	0,0151	0,0579
Cipro	0,2405	0,0241	0,0219	0,0178	0,0135	0,0144	0,0535

Tab. 3-4: Werte zur obigen Abbildung

Signifikanzen:

Jod/Jod	Subepithel	Trepan	Stromamitte	Vor-Desc.	Descemet
Epithel	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑ (e>d)
Subepithel		n.s.	n.s.	n.s.	↑↑↑ (d>se)
Trepan			↑	n.s.	↑↑ (d>tr)
Stromami.				n.s.	↑↑↑ (d>s)
Vor-Desc.					↑↑↑ (d>vd)

Tab. 3-5: Statistischer Vergleich zwischen den Schichten der Hornhaut innerhalb der Gruppen. Signifikanzen für Phosphat. Fettgedruckt sind die konzentrationsstärksten Schichten.

Cipro/Cipro	Subepithel	Trepan	Stromamitte	Vor-Desc.	Descemet
Epithel	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑ (e>d)
Subepithel		n.s.	↑	↑	n.s.
Trepan			n.s.	n.s.	n.s.
Stromami				n.s.	↑ (d>s)
Vor-Desc.					↑ (d>vd)

Tab. 3-6: Statistischer Vergleich zwischen den Schichten der Hornhaut innerhalb der Gruppen. Signifikanzen für Phosphat. Fettgedruckt sind die konzentrationsstärksten Schichten.

- - - = höchstsignifikant

- - = hochsignifikant

- = signifikant

n.s. = nicht signifikant

e = Epithel

se = Subepithel

tr = Trepan

s = Stromamitte

vd = Vor-Descemet

d = Descemet

Im Vergleich der Phosphatkonzentrationen innerhalb der Hornhautschichten ist Phosphat im Epithel der Hornhäute am höchsten konzentriert.

Im Subepithel liegt im Vergleich zur Stromamitte eine erhöhte Phosphatkonzentration vor. Dieser Unterschied ist bei den mit Ciprofloxacin (Gruppe II) behandelten Tieren signifikant, bei den mit PVP-Jod (Gruppe I) behandelten Tieren nicht. Die Phosphatdifferenz zwischen Stromamitte und Vor-Descemet ist jeweils nicht signifikant. In der Descemet'schen Membran liegt der Phosphatgehalt höher als in den anderen stromalen Schichten.

Weiterhin liegen die Phosphatkonzentrationen rund um die Trepanationen leicht über denen der Stromamitte. In der PVP-Jod-Gruppe ist dieser Unterschied signifikant, in der Ciprofloxacin-Gruppe nicht. Zwischen Trepanationsrand und subepithelialer Schicht besteht kein signifikanter Unterschied in der Phosphatkonzentration.

Die Differenz zwischen dem Phosphatgehalt des Epithels und der subepithelialen Schicht ergibt bei der statistischen Auswertung für PVP-Jod einen Epithel/Subepithel-Quotienten von 5,24, für Ciprofloxacin von 11,01; das ist in beiden Fällen höchst signifikant.

Zwischen den Kaninchenaugen, die mit PVP-Jod bzw. mit 1%iger Ciprofloxacinlösung behandelt wurden, zeigt sich im Epithel ein höchst signifikanter Unterschied in der Phosphatkonzentration. Bei den mit Ciprofloxacin behandelten Augen liegt die Phosphatkonzentration im Mittelwert um 0,0923 mol/kg über der PVP-Jod-Gruppe.

Die zellreichen Schichten der Hornhaut enthalten viel Phosphat, weil hier energiereiche Phosphate, Phospholipide und Nucleinsäuren zu finden sind. Es besteht eine höhere Dichte an Membranen, Kernen und Ribosomen. PVP-Jod enthält Phosphat in Form von Natriummonohydrogenphosphat. Fraglich ist, warum die absolute Phosphatkonzentration im Epithel in der Ciprofloxacingruppe über der PVP-Jodgruppe liegt.

3.2.2 Chlorkonzentrationen im Vergleich

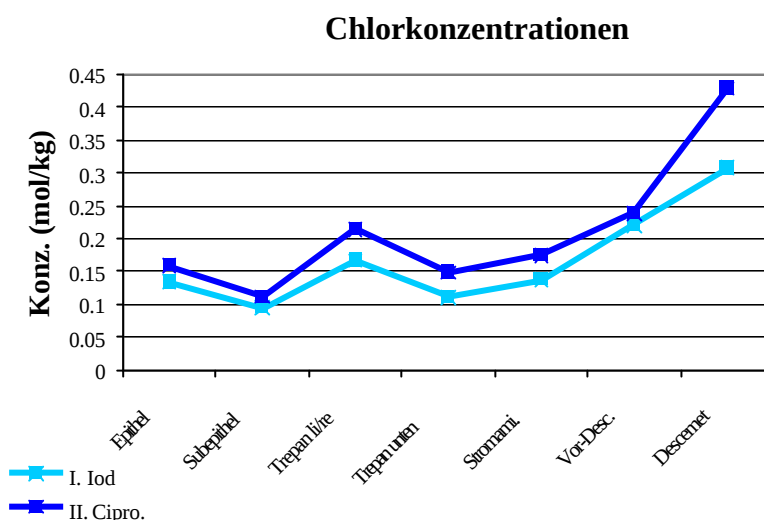


Abb. 3-10: Chlorkonzentrationen in den Schichten der Hornhaut im Vergleich: Jod- bzw. Ciprofloxacin-Applikation.

Mol/kg	Epithel	Sub-epithel	Trepan li/re	Trepan unten	Stroma-mitte	Vor-Desc.	Descemet
Jod	0,1333	0,0947	0,1665	0,1102	0,1366	0,2196	0,3067
Cipro	0,1584	0,1109	0,2139	0,1478	0,1741	0,2382	0,4283

Tab. 3-7: Werte zur Abbildung

Signifikanzen:

Jod/Jod	Subepithel	Trepan	Stromamitte	Vor-Desc.	Descemet
Epithel	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑↑↑
Subepithel		n.s.	n.s.	↑ vd>se	↑↑↑
Trepan			n.s.	n.s.	↑↑↑
Stromamitte				n.s.	↑↑↑
Vor-Desc.					n.s.

Tab. 3-8: Statistischer Vergleich zwischen den Schichten der Hornhaut innerhalb der Gruppen, Signifikanzen für Chlor. Fettgedruckt sind die konzentrationsstärksten Schichten.

Cipro/Cipro	Subepithel	Trepan	Stromamitte	Vor-Desc.	Descemet
Epithel	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑↑↑
Subepithel		n.s.	n.s.	n.s.	↑↑↑
Trepan			n.s.	n.s.	↑
Stromamitte				n.s.	↑↑↑
Vor-Desc.					↑↑

Tab. 3-9: Statistischer Vergleich zwischen den Schichten der Hornhaut innerhalb der Gruppen, Signifikanzen für Chlor. Fettgedruckt sind die konzentrationsstärksten Schichten.

- - - = höchstsignifikant

- - = hochsignifikant

- = signifikant

n.s. = nicht signifikant

e = Epithel

se = Subepithel

tr = Trepan

s = Stromamitte

vd = Vor-Descemet

d = Descemet

Die höchsten Chlorkonzentrationen finden sich innerhalb der Hornhaut in der Descemet'schen Membran. Am wenigsten Chlor kommt in der subepithelialen Schicht vor. Im Epithel ist die Chlorkonzentration demgegenüber wieder höher.

Seitlich der Trepanationen liegt die Chlorkonzentration über den Werten des Epithels und der Stromamitte. Unter der Trepanation liegen die Werte zwischen denen im Subepithel und Epithel. Diese Angaben gelten für Gruppe I und II gleichermaßen.

Im Vergleich der Augentropfen fällt auf, dass die Werte für Chlor bei den mit Ciprofloxacin behandelten Hornhäuten durchweg höher liegen, als bei den mit PVP-Jod behandelten. Die Kurvenverlauf des Diagramms, das die Chlorverteilung in den Schichten darstellt, ist aber für beide Gruppen annähernd parallel. Die Unterschiede in der Höhe der Chlorkonzentrationen zwischen den Gruppen sind statistisch nicht signifikant.

Im Vergleich der stromalen Schichten ergeben sich in beiden Gruppen signifikante Unterschiede nur im Vergleich der anderen Schichten mit der Descemet'schen Membran. Diese erhält die höchsten Chlorkonzentrationen. Ansonsten ist einzig bei den mit PVP-Jod behandelten Hornhäuten die Differenz zwischen Stromamitte und Vor-Descemet statistisch signifikant.

3.2.3 Jodkonzentrationen

Diese Untersuchung betrifft nur die Gruppen I (Jod).

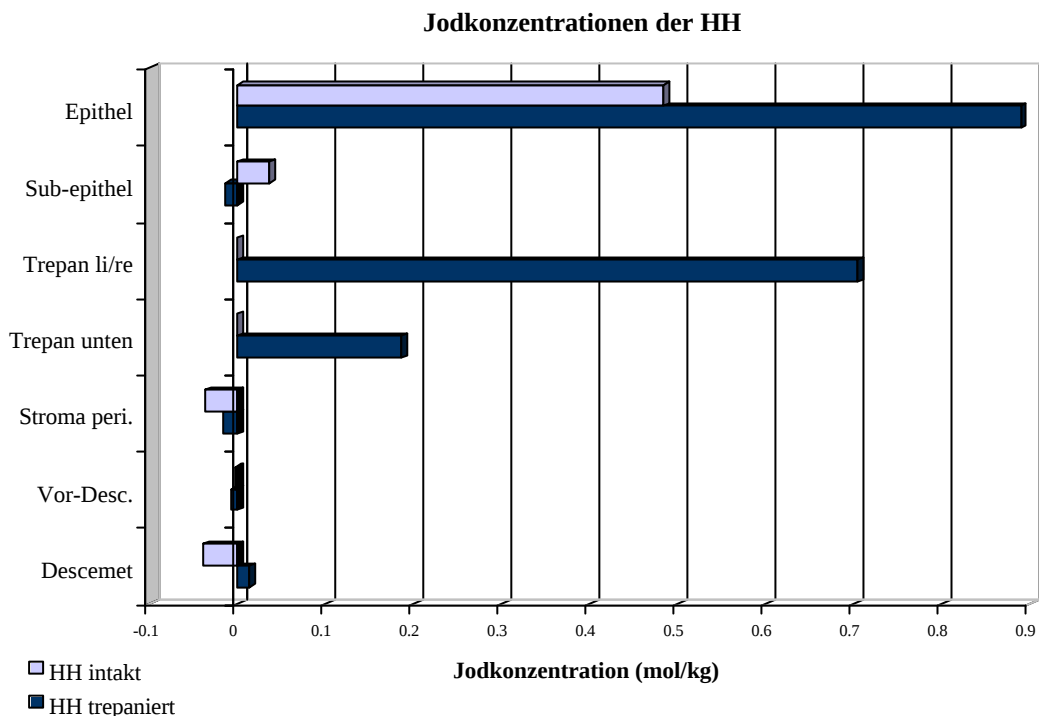


Abb. 3-11: Jodverteilung in allen gemessenen Schichten der HH. Epithel, Subepithel, Trepan li/re, Trepan unten, Stromamitte peripher, Vor-Descemet, Descemet.

Jod mol/kg	Epithel	Sub-Epithel	Trepan links/rechts	Trepan unten	Stromamitte peripher	Vor-Descemet	Descemet
HH trepaniert	0,88984	-0,01330	0,70511	0,18570	-0,01705	-0,00682	0,01364
HH intakt	0,48356	0,03598	Ø	Ø	-0,03709	-0,00334	-0,03836

Tab. 3-10: Werte zur obigen Abbildung

Signifikanzen:

Jod Trepan	Subepithel	Trepan	Stromamitte	Vor-Descemet	Descemet
Epithel	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Subepithel		↑↑↑	n.s.	n.s.	n.s.
Trepan			↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Stromami.				n.s.	n.s.
Vor-Desc.					n.s.

Tab. 3-11: Statistischer Vergleich zwischen den HH-Schichten, Signifikanzen für Jod, HH trepaniert. Fettgedruckt sind die konzentrationsstärksten Schichten.

Jod HH intakt	Subepithel	Stromamitte	Vor-Descemet.	Descemet
Epithel	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Subepithel		n.s.	n.s.	n.s.
Stromami.			n.s.	n.s.
Vor-Desc.				n.s.

Tab. 3-12: Statistischer Vergleich zwischen den HH-Schichten, Signifikanzen für Jod, HH-Epithel intakt. Fettgedruckt sind die konzentrationsstärksten Schichten.

- - -	=	höchstsignifikant	e =	Epithel
- -	=	hochsignifikant	se =	Subepithel
-	=	signifikant	tr =	Trepan
n.s.	=	nicht signifikant	s =	Stromamitte
			vd =	Vor-Descemet
			d =	Descemet

Die Jodverteilung ist Folge der PVP-Jod-Applikation im Versuch; physiologisch kommt Jod in der Hornhaut in allenfalls nicht meßbaren Konzentrationen vor (s. Abb. 2-6, Abb. 3-13).

Im Epithel ist die Konzentration, wegen der topischen Applikation, am höchsten und beträgt bei intaktem Hornhautepithel $0,486 \pm 0,372$ mol/kg, sowie bei trepanierten Hornhäuten $0,889 \pm 0,437$ mol/kg.

Schon im Subepithel ist bei intaktem Hornhautepithel kein Jod mehr meßbar. Entlang der Trepanationen zeigt sich jedoch im Vergleich dazu ein deutlicher Anstieg des Jodgehalts auf beinahe epitheliale Werte (seitlich $0,705 \pm 0,517$ mol/kg, unten $0,186 \pm 0,448$ mol/kg). In den tieferen peripher-stromalen Schichten ist der Nachweis von Jod wiederum nicht möglich.

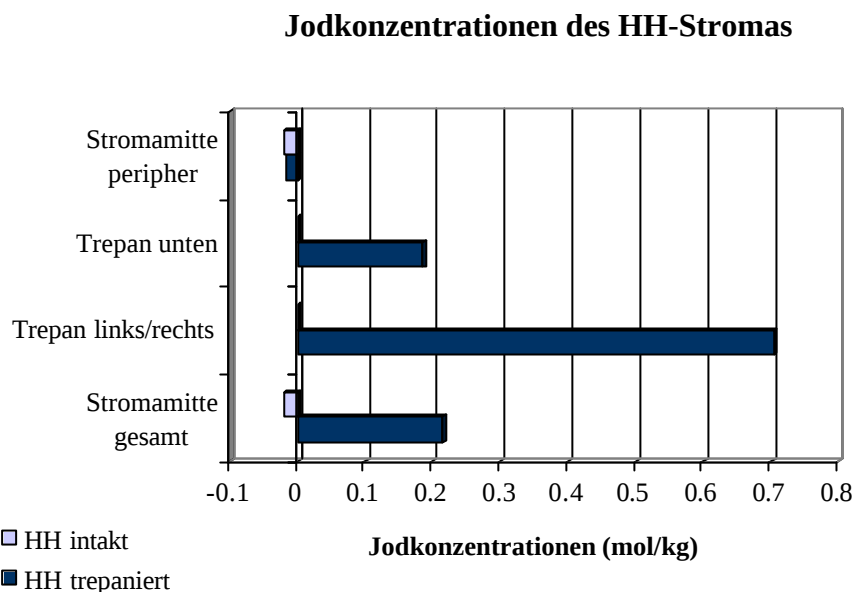


Abb. 3-12: Jodverteilung in der Stromamitte der Hornhaut. Diese wird unterteilt in die am Rande der Trepanationen gemessenen Werte und die in der Stromalen Peripherie gemessenen Werte.

Jod (mol/kg)	Stromamitte gesamt	Trepan links/rechts	Trepan unten	Stromamitte peripher
HH trepaniert	0,21511	0,70511	0,18570	-0,01518
HH intakt	-0,01882	0	0	-0,01882

Tab. 3-13: Werte zur obigen Abbildung

Bei den trepanierten Hornhäuten wurden im Bereich der Stromamitte zwei Messungen entlang der Trepanationen (Trepan li/re; Trepan unten), und zum anderen Messungen an von den Trepanationen peripher gelegenen Meßorten vorgenommen. Wenn das Gesamtergebnis für die Stromamitte angegeben wird, läßt sich der lokal starke Einfluß der Trepanationen herausrechnen, indem nur die peripheren Stromamessungen in die Rechnung mit einbezogen werden (= Stromamitte peripher).

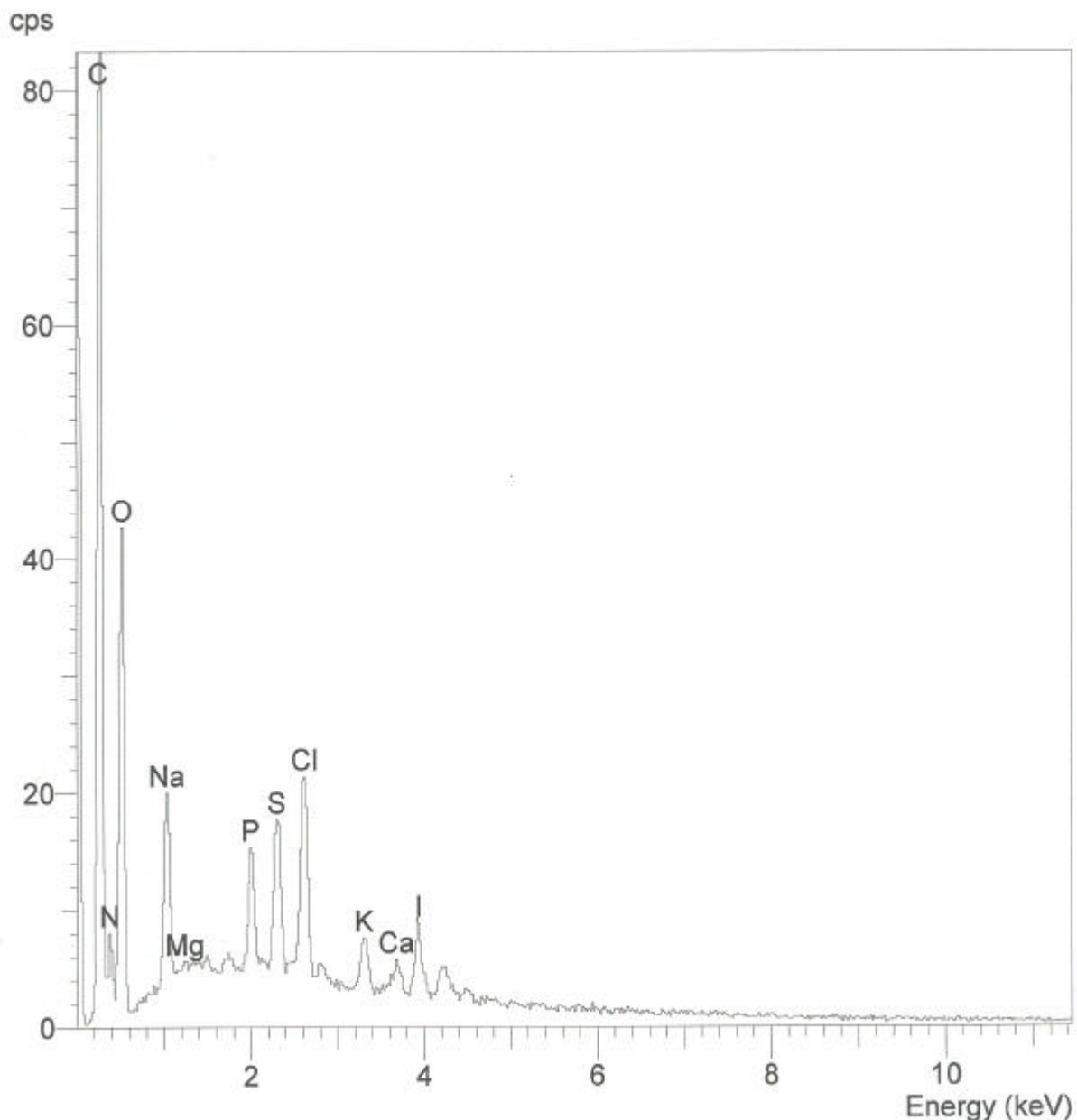
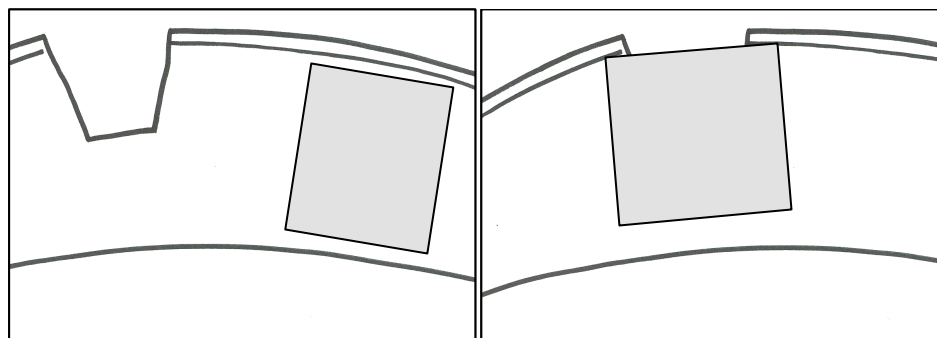


Abb. 3-13: EDXA-Spektrum der Probennummer 468, Messung aus dem Epithel: Kaninchenhornhaut mit Mikrotrepanationen, mit **11% PVP-Jod** behandelt. Messung aus dem Epithel. Die Elemente sind mit den gängigen Abkürzungen bezeichnet.

Das gilt genauso für den Gesamtjodgehalt der Hornhaut. Er beträgt für intakte Hornhäute $0,101 \pm 0,20$ mol/kg. Bei trepanierten Hornhäuten beträgt er $0,253 \pm 0,46$ mol/kg, wenn die lokale Wirkung der Trepanationen berücksichtigt wird, und $0,183 \pm 0,42$ mol/kg, wenn man den lokalen Einfluß herausrechnet und somit die Penetration des Jods in die Peripherie der Hornhaut betrachtet. Es muß allerdings deshalb als kritisch angesehen werden, die Gesamtjodkonzentration der Hornhaut anzugeben, weil sich diese in beiden Gruppen vorwiegend aus lokalisiert sehr hohen Jodkonzentrationen und nicht aus einer tiefen Jodpenetration zusammensetzt. Zum einen ist im Epithel Jod nachzuweisen, zum anderen in dem die Trepanationen umgebenden Stroma. Daraus einen Gesamtgehalt der Hornhaut

abzuleiten lässt außer acht, dass eine Penetration in die Peripherie der Hornhaut nicht stattfindet, weder durch das intakte Epithel, noch von den Trepanationen ausgehend.



Stromamitte peripher

Stromamitte mit Trepanation

Abb. 3-14: EDXA-Meßorte in der Stromamitte: links peripher, rechts unter Berücksichtigung der Trepanation

Die Jodverteilung zeigt, dass die Trepanation der Hornhaut, wie sie für diagnostische Zwecke durchgeführt wird, eine deutliche Verbesserung der lokalen Penetration eines topisch applizierten Medikamentes ermöglicht. In stromalen Schichten, in denen unter einem intakten Epithel keine Penetration nachgewiesen werden kann, besteht durch die Trepanation eine lokal hochsignifikant erhöhte Konzentration des applizierten Stoffes. Das Medikament kann damit wesentlich schneller und in höherer Wirkkonzentration seinen Wirkort im Hornhautstroma erreichen.

3.3 Mapping

Es liegen uns Jod-Mappings von folgenden Proben vor:

Gruppe I. (Jod):

Gruppe I.1. Probennr.	Nr. 468 (10 min)	Nr. 464b	Nr. 465c	Nr. 468b	Nr. 469a
Counts	15	19	15	23	22

Gruppe I.2. Probennr.	Nr. 470	Nr. 471	Nr. 471b	Nr. 71
Counts	18	12	17	23

Tab. 3-14: Ergebnisse des Mappings. Probennummern und die detektierten Jod-Counts.

Mappings liegen uns nicht aus der Gruppe II vor, da sie für die mit Ciprofloxacin behandelten Hornhäute aufgrund des fehlenden Fluornachweises nicht in Frage kamen.

Anhand der Probe 468 suchten wir nach einem möglichst maximalen Jodnachweis unter verschiedenen Einstellungen. Das beste Ergebnis erzielten wir zunächst mit einem Probenstrom von $6 \cdot 10^{-9}$, einer Beschleunigungsspannung von 15 kV und einer Meßzeit von 10 Minuten. Es wurde mit dieser Einstellung eine Zählrate für Jod von 15 Counts erreicht. Auf der Abb. 3-15 erkennt man am Epithel deutlich eine Anreicherung von Jod, die sich auch in das Trepanloch hinein verfolgen läßt. Bei den anderen Proben haben wir bei sonst unveränderten Meßbedingungen die Meßzeit auf 45 (90) Minuten erhöht und damit eine erhöhte Zählrate für Jod von maximal 23 Counts erreicht. Wiederum zeigen die Bilder eine deutliche Jodanreicherung in Epithel und Subepithel, sowie im Stroma entlang der Trepanationen.

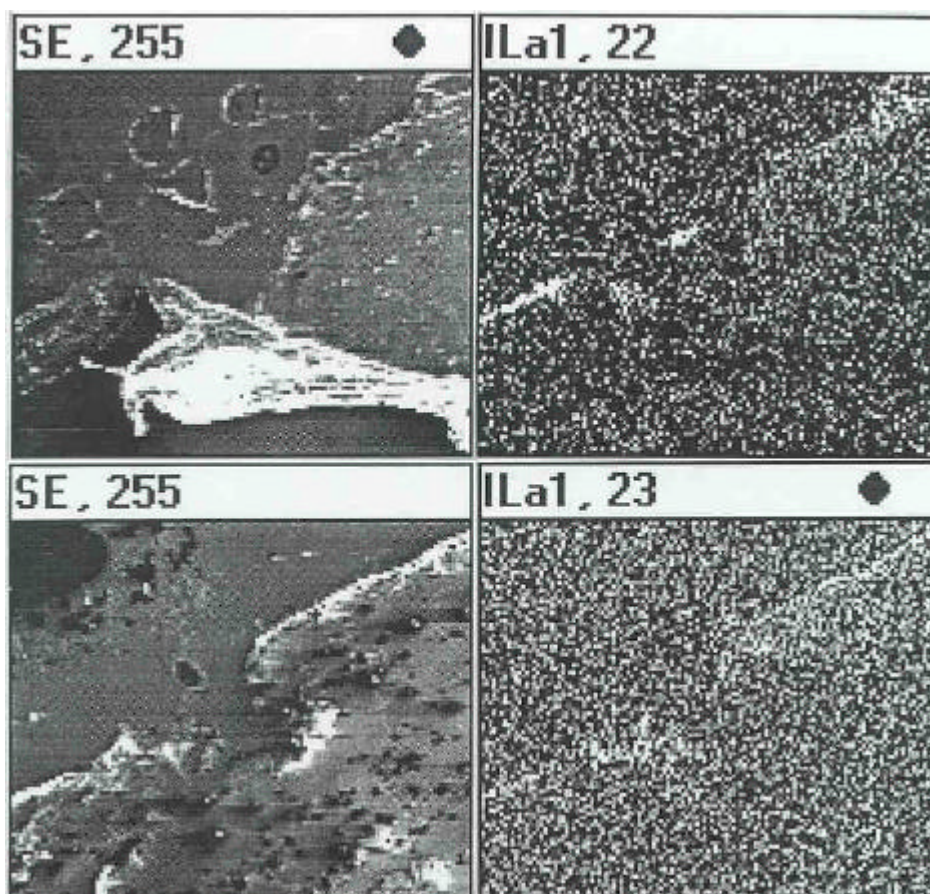


Abb. 3-15: Jodmapping

Das Mapping der epithelintakten Hornhäute zeigt die gute und intakte Barrierefunktion des Epithels in Form einer scharf abgegrenzten Linie von Jodsignalen. Bei trepanierten Hornhäuten imponiert eine aufgeweichte Linie im Bereich des Stromas. In der Tiefe der

Trepanationen erscheint die Linie verbreitert und zeigt damit eine Jodpenetration in das direkt angrenzende tiefe Stroma an.

Zum Vergleich und zur Kontrolle haben wir bei einigen Mappings zusätzlich zu Jod auch Schwefel und Phosphat detektiert. Für Schwefel erhielten wir Zählraten zwischen 20 und 56 Counts (Mittelwert 37 Counts), wobei sich bei hohen Zählraten deutlich das Epithel als zellreiche und somit verstärkt schwefelhaltige Schicht abhebt (Abb. 3-16). Bei der Detektion von Phosphat ist diese deutliche Abgrenzung des Epithels gegenüber dem Stroma schon bei einer Zählrate von 20 Counts ausgeprägt.

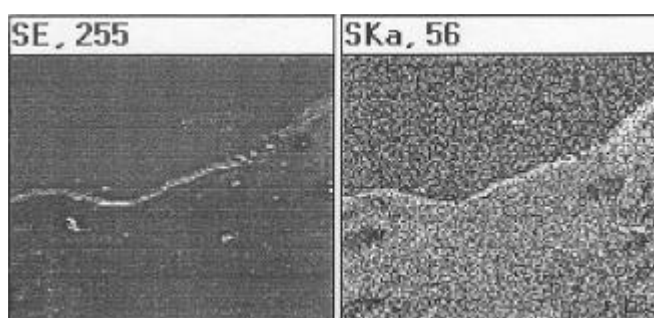


Abb. 3-16: Mapping. Links: Sekundärelektronenbild, rechts: Schwefeldetektion

3.4 FG, TG, Osmolarität

3.4.1 Feuchtgewicht, Trockengewicht, Hydratation, Osmolarität

Die folgende Tabelle gibt die Werte für die gemessenen Hornhauthälften wider. Bei der Probe Nummer 463 war die Messung der Osmolarität aufgrund wiederholter, spontaner Kristallisation im Osmometer und dadurch bedingter Fehlmessungen nicht möglich.

Probennummer	FG (g)	TG (g)	Differenz FG-TG (g)	Hydratation (FG-TG)/TG	Osmolarität (Osmol/kg)
464 mT/B	0,0695	0,0104	0,0591	5,6827	0,3030
465 mT/B	0,0766	0,0116	0,0650	5,6034	0,2870
471 oT/B	0,0636	0,0092	0,0544	5,9130	0,3300
71 oT/B	0,0866	0,0125	0,0741	5,9280	0,3260
473 oT/C	0,0574	0,0074	0,0500	6,7568	0,2710
614oT/C	0,0502	0,0112	0,0390	3,4821	0,2370
463mT/C	0,0434	0,0086	0,0348	4,0465	
Mittelwert Ges.			0,0538	5,3447	0,2923
Mittelwert Jod			0,0632	5,7818	0,3115
Mittelwert Cipro			0,0413	4,7618	0,2540

Tab. 3-15: Auflistung der Proben und der entsprechenden Werte für Feuchtgewicht (FG), Trockengewicht (TG), Hydratation und Osmolarität

mT/B: mit Trepanation, PVP-Jod (Betasisodona) als Augentropfen

oT/B: ohne Trepanation, PVP-Jod (Betasisodona) als Augentropfen

mT/C: mit Trepanation, Ciprofloxacin als Augentropfen

oT/B: ohne Trepanation, Ciprofloxacin als Augentropfen

Die Osmolarität der mit PVP-Jod behandelten Hornhäute liegt über der Osmolarität der mit Ciprofloxacin behandelten. Innerhalb der PVP-Jod-Gruppe besteht, im Vergleich der Proben mit bzw. ohne Mikrotrepanationen, bezüglich der Osmolarität kein signifikanter Unterschied.

Die Hydratation unterscheidet sich zwischen den mit PVP-Jod bzw. Ciprofloxacin behandelten Hornhäuten nicht signifikant, obwohl PVP Jod ein eher dehydrierender Effekt auf die Hornhaut zugeschrieben wird (Pels et al.).

3.5 Makroskopische Beurteilung

3.5.1 Präzipitation von Ciprofloxacin

Die mit Ciprofloxacin behandelten Augen entwickelten im Verlauf des Versuchs weißlich-kristalline Auflagerungen. Wir haben diese weißlichen Präzipitationen in Grade zwischen 0 und 3 eingestuft, wobei Grad 3 die stärkste Ausprägung repräsentiert. Die Einteilung in die Grade 0-3 ist eine subjektive, dimensionslose Gradierung, die sich nach den makroskopischen Beobachtungen im Versuch richtet.

Von den acht mit Ciprofloxacin behandelten Kaninchenaugen entwickelten alle diesen Belag, von den mit PVP-Jod behandelten Tieren keines.

Die Tabelle zeigt wie stark ausgeprägt die Präzipitationen jeweils waren. Zwischen den trepanierten und den nicht trepanierten Augen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied, die Ausprägung ist jedoch bei mikrotrepanierten Augen klinisch stärker.

Probennr.	462 TC	463 TC	466 TC	467 TC	472 C	473 C	614 C	615 C
Präzipitation	2	2	2	3	2	3	1	0,5

Tab. 3-16: Präzipitationen bei mit Ciprofloxacin behandelten Hornhäuten während des Versuchs. Einteilung in relative Werte mit Stufen von 0 bis 3.

TC: Trepanierte Hornhaut, mit Ciprofloxacin behandelt.

C: Intakte Hornhaut, mit Ciprofloxacin behandelt.

3.6 Histologie

Bei der Auswertung der histologischen Schnitte haben wir die Größe von Trepanationen und die Dicke der Hornhäute vermessen. Die Trepanationen haben eine Breite zwischen 120 und 350 μm , sowie eine Tiefe zwischen 100 und 260 μm (Abb. 3-17, Tab. 3-17). Die Schwankungen sind darauf zurückzuführen, dass die Trepanationen beim Schneiden auf dem Kryotom nicht immer auf der gleichen Höhe angeschnitten werden konnten, so dass am Rande angeschnittene und mittig angeschnittene Trepanationen für die weite Streuung der Werte sorgen. Es sind exemplarisch einige Trepanationen der entsprechenden Hornhäute vermessen worden.

Wenn ein Wert eine extreme Breite des Trepanloches anzeigt, so ist es ebenso möglich, dass dies auf eine erhöhte Abnutzung des Trepans zurückzuführen ist, so dass es in der Tiefe der Trepanation oder im Epithelbereich zu Ausreißungen des Gewebes gekommen sein kann. Es ist auch denkbar, dass ein unterschiedliches Aufsetzen des Mikrotrepans für diese Abweichungen sorgen kann.

Probennr.	Breite x Tiefe (µm)
462 TC	150*130
463 TC	220*200
466 TC	160*260
467 TC	200*130
464 TB	200*140
465 TB	200*120
468 TB	160*240
469 TB	170*200
Mittelwert Breite (µm)	183,5 ± 25,495
Mittelwert Tiefe (µm)	177,5 ± 54,707

Tab. 3-17: Größe der Mikrotrepanationen in der histologischen Auswertung. HE-Färbung

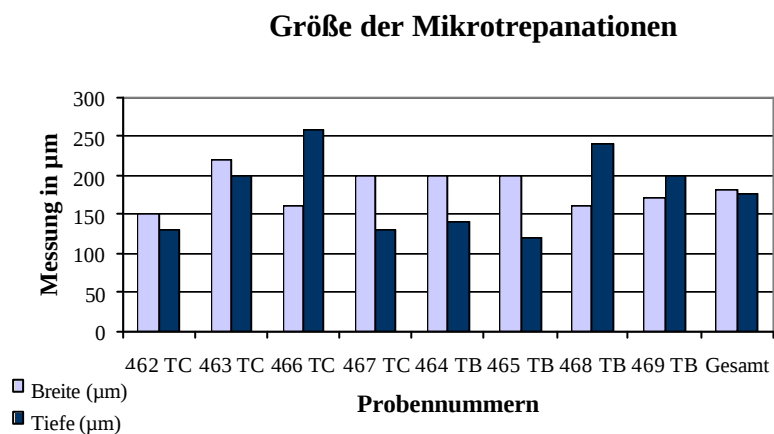


Abb. 3-17: Histologische Auswertung der Größe der Mikrotrepanationen.

TC: mit Trepanation und mit Ciprofloxacin behandelt

TB: mit Trepanation und mit PVP-Jod behandelt.

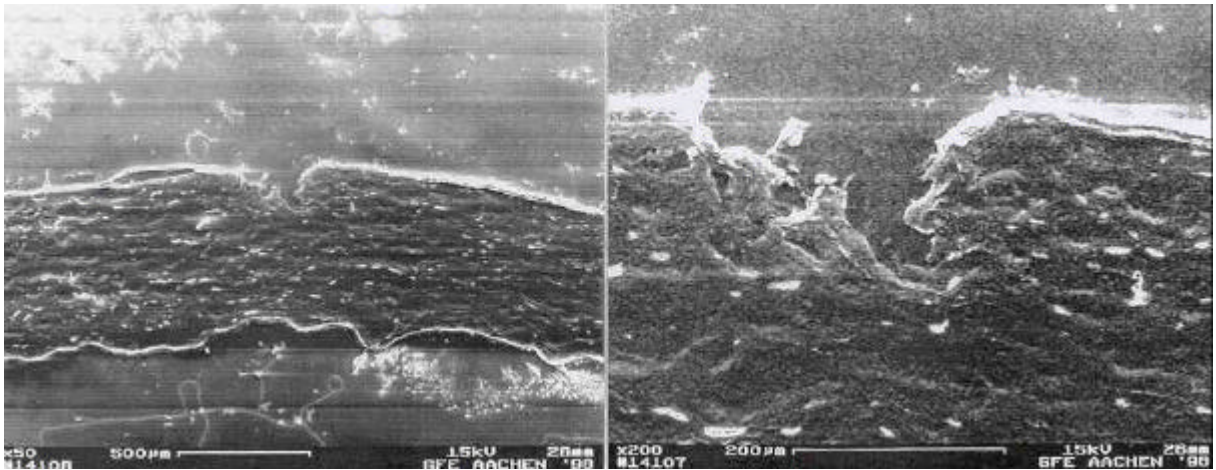


Abb. 3-18: Probennummer 468: Mikrotrepanation im elektronenmikroskopischen Bild.

Links: 50x Vergrößerung.

Rechts: 200x Vergrößerung.

4 Diskussion

4.1 NMR-Spektroskopie

4.1.1 Methodik

Die NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, die Verteilung von fluorierten Medikamenten unter Berücksichtigung der metabolischen Veränderungen, sowohl endogener Art, als auch in Bezug auf das Medikament selbst, zu messen (Malet-Martino et al.). Dazu nutzten wir die ^1H -NMR-Spektroskopie in Kombination mit der ^{19}F -NMR-Spektroskopie. Der Vorteil ist, dass diese Methode die gleichzeitige Detektion von mehreren Metaboliten ermöglicht, ohne dabei die vorherige Isolierung des gesuchten Stoffes vorauszusetzen, wie es z.B. bei der Chromatographie der Fall ist (Awni et al.). Durch solche Bedingungen könnten Informationen, z.B. über nicht erwartete Metabolite, verloren gehen. Darüber hinaus stehen die Proben nach der NMR-Spektroskopie unverändert für weitere Analysen zu Verfügung (Midelfart et al.).

Allerdings besteht, verglichen mit anderen spektroskopischen und chromatographischen Methoden, eine relativ geringe Sensitivität, und deshalb ist die Methode für die Analyse besonders gering konzentrierter Metabolite nicht ideal geeignet (Midelfart et al.).

Bei der Betrachtung fluorierter Medikamente mit der ^{19}F -NMR-Spektroskopie wird das Signal des Wirkstoffs und seiner Metabolite nicht durch endogene Metabolite des Auges überdeckt, da Fluor dort nur in vernachlässigbaren Mengen vorhanden ist. Umgekehrt kann es aber bei der ^1H Spektroskopie eines Gewebes zur Überlagerung der Wirkstoffsignale durch höher konzentrierte endogene Metabolite kommen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit - oder auch die Notwendigkeit, durch NMR-Spektroskopien mit verschiedenen Kernen, die Informationen über den endogenen und medikamentösen Metabolismus nacheinander, sozusagen in Reihe und nicht simultan, „abzurufen“. Dadurch wird das „Informationsspektrum“ nicht nur erweitert, sondern auch präzisiert.

4.1.2 Ciprofloxacin-NMR-Spektroskopie

Die Ergebnisse aus den Protonen- und Kohlenstoff-Spektren geben uns Aufschlüsse über die Struktur des Ciprofloxacin-Moleküls.

4.1.2.1 ^1H -Spektrum

Aus dem Protonen-Spektrum von reinem Ciprofloxacin in D_2O erhält man Aufschluß über die Resonanzfrequenzen der im Molekül enthaltenen Wasserstoffatome. Man könnte anhand

dessen in einem Proton-Spektrum einer Gewebeprobe gezielt nach Signalen des Medikamentes suchen.

Im Molekül benachbart oder einander gegenüberliegende Atome erscheinen auch im Spektrum in „energetischer Nähe“. So verhält es sich mit den 2``-3``-CH-Gruppen, die als eng beieinanderliegende Dupletts imponieren. Solche Formationen kommen zustande, weil die Wasserstoffatome benachbart liegender Kohlenstoffatome miteinander Kopplungen eingehen (Spin-Kopplung).

Hinzu kommt eine Aufspaltung in ein cis-Duplett und ein trans-Duplett. Diese entsteht durch die Anregung der Kerne im Bereich der cis-trans-Umwandlung.

Die Piperazingruppe zeigt sich als Komplex von zwei Triplettsignalen bei 3,54 und 3,64 ppm. Dabei befinden sich die jeweils einander gegenüberliegenden CH₂-Gruppen in einem Triplet (2``-6``-CH₂ bzw. 3``-5``-CH₂). Die Erklärung liegt in der Anzahl der H-Atome an jedem C-Atom begründet. Hier binden an jedes C-Atom zwei H-Atome, mit Kernen, die im ganzen 3 verschiedene Energiezustände annehmen können: „2 Spins aufwärts“, „1 Spin auf und 1 Spin ab“, „2 Spins abwärts“ (nach aufsteigendem Energielevel geordnet). Der energetisch am wenigsten aufwendige Zustand ist naturgemäß am häufigsten zu erwarten; entsprechend ist die unterschiedliche Höhe der Triplettspitzen zu deuten. Infolge von C-C-Kopplungen gibt es im Spektrum in diesem Fall nur jeweils ein Triplet für zwei Atome (Zeek).

5-CH und 8-CH tragen jeweils ein H-Atom. Jedes H-Atom kann sich in einem magnetischen Feld in zwei Varianten ausrichten: „Spin aufwärts“ oder „Spin abwärts“. Die „Spin abwärts“-Variante ist die energetisch aufwendigere und wird deswegen etwas seltener vorkommen, als die „Spin aufwärts“-Variante.

Zwischen dem Signal der 1``-CH-Gruppe, das von den Signalen der Piperazin- und der Cyclopropylgruppe die höchste Resonanzfrequenz hat, und den Signalen der aromatischen, bityklischen Ringstruktur befindet sich eine signalfreie Lücke von 3,7 ppm Breite.

4.1.2.2 ¹³C-Spektrum

Beim ¹³C-Spektrum sehen wir, zusätzlich zu den bereits besprochenen, die Kohlenstoffatome, die keine Bindung zu einem Wasserstoffatom haben, weil sie, bedingt durch eine aromatische Ringstruktur, keine Bindungskapazitäten mehr haben. Sie liegen im Spektrum ebenfalls etwas „abseits“ der Signale der Piperazin- bzw. der Cyclopropylgruppe, im aromatischen Bereich zwischen 108,5 und 178,33 ppm. Die Signale der Piperazin- und Cyclopropylgruppe erscheinen dagegen im Bereich zwischen 10 und 50 ppm.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die dreidimensionale Struktur des Ciprofloxacinmoleküls eine räumlich Nähe der Piperazin- und der Cyclopropylgruppe bedingt. Die Wechselwirkungen mit den Atomen der bizyklischen Ringstruktur (Naphthalin-Grundstruktur) scheinen durch die jeweils an der Verknüpfung beteiligten Stickstoffatome behindert.

Zwischen dem Fluoratom in Position 6 und verschiedenen C-Atomen des Ciprofloxacinmoleküls kommt es ebenfalls zu Spin-Kopplungen. Wir sehen dies an den oben beschriebenen Ergebnissen. Es fällt auf, dass die betroffenen C-Atome im Spektrum als Dupletts vorliegen. Die Frequenz der Kopplungskonstanten JFC (Hz) verhält sich umgekehrt proportional zu der Zahl der Bindungen, die das F-Atom von dem C-Atom trennen, d.h. die Einbindungskopplungskonstante hat die höchste Frequenz mit 250 Hz, die Vierbindungskopplungskonstante die niedrigste mit 5 Hz.

Spin-Spin-Kopplungen entstehen also sowohl zwischen den H-Atomen eines C-Atoms (z.B. 5-CH des Proton-Spektrums), als auch zwischen den H-Atomen verschiedener C-Atome (z.B. 3',5'-CH₂) und zwischen dem F-Atom und verschiedenen C-Atomen.

In der Verteilung der Signale in den beiden Einzelspektren ist eine deutliche Übereinstimmung erkennbar: ganz rechts die Cyclopropylgruppe, daneben die Piperazingruppe zusammen mit dem C1'' der erstgenannten, dann eine Lücke von fast 60 ppm Breite im ¹³C-Spektrum, bzw. 3,7 ppm Breite im ¹H-Spektrum. Ganz links im Spektrum liegen dann die Atome der bizyklischen aromatischen Naphthalin-Grundstruktur des Moleküls.

4.1.2.3 2D-COSY-Spektrum

Bei der Analyse des zweidimensionalen COSY-Spektrums (¹H-¹³C) bestätigt sich dieser Trend noch einmal in Form einer Diagonalen, die sich durch die „Resonanzpunkte“ legen lässt. Hier kann man nun ablesen, welche Peaks aus den zwei verschiedenen Spektren „zusammengehören“ (Abb. 3-3). Es lassen sich zwei Rechtecke, die Resonanzfrequenzen enthalten, einzeichnen, eines in der rechten oberen Ecke (mit den jeweils niedrigen ppm-Werten der Cyclopropyl- und der Piperazingruppe), und eines in der linken unteren Ecke (mit den jeweils hohen ppm-Werten der Atome aus der bizyklischen Ringstruktur).

Hier kann man besonders gut erkennen, dass die Differenzierung der cis-trans-Isomerie bei der 2'',3''-CH-Gruppe nur über die Proton-Spektroskopie möglich ist. Im Carbonspektrum gibt es dafür nur einen Peak.

4.1.3 NMR-Spektroskopie der Kaninchenaugen

4.1.3.1 ^1H -NMR-Spektroskopie des Kaninchen-Kammerwassers

Wir finden in unseren Spektren eine gute Übereinstimmung zu den bereits durch Midelfart et al. gemessenen Metaboliten im Kammerwasser von Kaninchen. In diesem Teil der Studie steht aber nicht die Quantifizierung der endogenen Metaboliten im Vordergrund, weswegen wir darauf verzichtet haben.

4.1.3.2 ^1H -NMR-Spektroskopie der Kaninchen-Hornhaut

Hier gilt gleiches wie für die Kammerwasserproben. Die endogenen Metaboliten der Hornhaut ließen sich wie bei früheren Messungen wiederfinden. Eine Quantifizierung erfolgte jedoch nicht. Auffällig ist die geringe Konzentration von Format in den Hornhäuten, die mit Ciprofloxacin behandelt wurden (abzulesen an der geringen Amplitude des Formatpeaks im Spektrum). In der Kammerwasserprobe liegt der Formatgehalt sogar vollständig unter der Nachweisgrenze.

4.1.3.3 ^{19}F -Spektroskopie verschiedener Kompartimente des Kaninchenauges

Das Fluoratom macht aufgrund seiner Atommasse 5,79% des Ciprofloxacinmoleküls aus. Bei einer applizierten Gesamtmenge pro Auge von 400 μl 1%iger Ciprofloxacinlösung werden 4 μl reines Ciprofloxacin appliziert. Verschiedene Faktoren spielen bei einer rechnerischen Vorhersage cornealer Ciprofloxacinkonzentrationen eine einschränkende Rolle. Erstens verteilen sich topisch applizierte Augentropfen über die gesamte vordere Oberfläche des Bulbus und nicht nur über die Hornhaut. Zweitens wird die Penetration der Augentropfen in die Hornhaut durch das bei unserem Versuch in den Gruppen 1.2 und 2.1 intakte Hornhautepithel behindert. Drittens penetriert ein Teil des Wirkstoffs durch die Hornhaut hindurch in die Vorderkammer und ist dann im Kammerwasser nachzuweisen. Offensichtlich spielt auch ein, wenn auch quantitativ geringer, Metabolismus des Ausgangswirkstoffs eine Rolle.

Unsere Quantifizierung bezieht sich auf die Proben der Hornhaut und des Kammerwassers der mit 1% Ciprofloxacin behandelten Kaninchenaugen mit intaktem Epithel.

Wir konnten mit der ^{19}F -Spektroskopie sowohl in der Hornhaut als auch im Kammerwasser und der Linse Ciprofloxacin nachweisen. Der Fluorpeak im Kammerwasser hat bei gleichen Meßbedingungen eine deutlich geringere Amplitude als der in der Hornhaut. Das zeigt, dass die höchste Ciprofloxacinkonzentration nach einer intensivierten Tropfbehandlung über zwei Stunden in der Hornhaut zu finden ist.

Der Nachweis der Ciprofloxacinpenetration in die Linse wurde in der vorliegenden Untersuchung erstmals geführt. Das Signal in der Linse ist noch einmal deutlich schwächer als das im Kammerwasser und nur bei der Behandlung mit abradiertem Epithel (0,3% Ciprofloxacin) zu detektieren.

4.1.4 Metabolite des Ciprofloxacin unter topischer Therapie?

Bei der ^{19}F -NMR-Spektroskopie der Kaninchenhornhaut und des Kammerwassers gelang die zusätzliche Detektion eines Fluorsignals bei 121,5 ppm. In der Hornhaut war dieses Signal deutlich abzugrenzen, in den Kammerwasserproben war es vorhanden, jedoch bisweilen schwierig vom Hintergrundrauschen der Probe zu unterscheiden. Wir nehmen an, dass es sich hierbei um einen Metaboliten des Ciprofloxacins handelt. Die Tatsache, dass in diesen Proben bei der ^1H -Spektroskopie das Fehlen oder geringe Vorhandensein von Formate auffiel, legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Metaboliten um Formylciprofloxacin handeln könnte.

Bisher sind keine Metabolite von Ciprofloxacin bei der Therapie am und im Auge beschrieben worden. Wir kennen die Anteile der verschiedenen Metabolite von Ciprofloxacin im Blut (Bacrachewa et al., Beermann et al.). Auf die Sonderstellung des Auges im Organismus und die dort herrschenden anderen metabolischen Bedingungen ist bereits hingewiesen worden. Es ist denkbar, dass Ciprofloxacin bereits in der cornealen Phase der Penetration durch das Auge metabolisiert wird, und das wir hier einen Grund für das Fehlen bzw. das gering konzentrierte Format finden können.

Zur Klärung dieser Zusammenhänge müssten die Metabolite von Ciprofloxacin NMR-spektroskopisch identifiziert werden, und es sind longitudinale Messungen mit dem Vergleich von Formatabnahme und Metabolitenzunahme in der ^1H - bzw. ^{19}F -NMR-Spektroskopie erforderlich. Wären die nicht-destruktiven NMR-Messungen, die von Greiner et al. für die ^{31}P -NMR-Spektroskopie und Berkowitz et al. für die ^{19}F -NMR-Spektroskopie vorgestellt wurden, auf unsere Fragestellung anwendbar, könnte dies ein Ansatz für Verlaufsbeobachtungen sein. Es ist aber zu bedenken, dass Berkowitz zwar *in vivo* detektiert hat, dass aber die markierte Glucose im Stoffwechsel der Netzhaut vermutlich in höherer Konzentration vorliegt, als es für Metabolite des Ciprofloxacin nach topischer Applikation der Fall sein würde.

4.1.5 Tropfschema für Ciprofloxacin – Auswirkungen auf die Ergebnisse

Aus der Literatur ergibt sich, dass das intensivierte Tropfschema mit einer Applikation alle 15 Minuten von 0,3% Ciprofloxacin eine gute Penetration von Ciprofloxacin in die Hornhaut bewirkt (Price et al.), die jedoch signifikant verbessert wird, wenn das Epithel nicht intakt, sondern abradiert ist. In dieser Studie von Price et al. zeigt sich ein Unterschied zwischen den

Werten mit intaktem ($166,2 \pm 336,9 \mu\text{g/ml}$) bzw. abradiertem ($938,3 \pm 1081,51 \mu\text{g/ml}$) Epithel um den Faktor 5,6. Auffällig ist hier die sehr breite Streuung der Werte. Price verwendete zwar eine geringer konzentrierte Tropflösung als wir, führte die Behandlung aber über 4 Stunden durch. Dadurch könnten die ähnlichen Ergebnisse der Konzentrationen in der Hornhaut erklärt werden (zum Vergleich: $132 \pm 18 \mu\text{g/g}$ in der vorliegenden Studie).

Inhaltlich ähnliche Ergebnisse erzielt auch O'Brien et al., der die Konzentration von 0,3% Ciloxan im Kammerwasser nach topischer Applikation mit intaktem und abradiertem Hornhautepithel beobachtet hat. Danach erzielt man mit einem dort verwendeten Tropfschema von $24 \times 50 \mu\text{l}$ innerhalb von 12 Stunden im Kammerwasser Ciprofloxacin-konzentrationen von $4,82 \pm 2,15 \mu\text{g/ml}$. Bei abradiertem Epithel liegen die Konzentrationen um den Faktor 3 über denen für intaktes Epithel. Alle Werte befinden sich über der MIC_{90} für die gängigen Erreger im Auge.

In beiden oben angeführten Studien wurde HPLC (high pressure liquid chromatography) als Meßmethode verwendet.

Diese Werte liegen deutlich unter den von uns detektierten für das Kammerwasser. Abgesehen von der geringeren Konzentration der Augentropfen, könnte das ein Hinweis darauf sein, dass die von uns gewählte intensivierete Tropftherapie, mit Applikationen alle 15 Minuten, für eine stärkere Akkumulation des Wirkstoffs im Auge sorgt. O'Brien nimmt für Ciprofloxacin im Kammerwasser eine Halbwertszeit von 1-2 Stunden an (gegenüber 3-4 Stunden im Serum). Er begründet dies mit dem hohen Durchfluss des Kammerwassers in der Vorderkammer. Dies könnte dafür verantwortlich sein, dass bei größeren Zeitintervallen zwischen den Tropfenapplikationen der Wirkstofflevel im Kammerwasser signifikant abfällt.

Bei Reidy et al. finden wir schließlich eine annähernde Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen. Dort wurde bei einer Tropfbehandlung mit 0,75% Ciprofloxacin und einer Applikation alle 15 min für 2 Stunden, sowie nachfolgend alle 30 min für 3 Stunden, eine Ciprofloxacin-konzentration im Kammerwasser von $30,5 \mu\text{g/ml}$ gefunden (zum Vergleich: $42 \mu\text{g/ml}$ in der vorliegenden Studie). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von Bioassays.

Die Diskrepanzen der unterschiedlichen Studien bezüglich der Ciprofloxacin-konzentrationen, die mit verschiedenen Methoden ermittelt wurden, könnten durch Metabolite des Ursprungsstoffes bedingt sein, die mehr oder weniger mikrobiologisch aktiv sein könnten, und somit in einem Bioassay anders ins Gewicht fallen würden, als bei der HPLC (Joos et al., White).

4.2 EDXA

4.2.1 EDXA in der Ophthalmologie

4.2.1.1 Ansätze der Nutzung

Die EDX-Analyse ist inzwischen auch von anderen Arbeitsgruppen als wertvolle Methode für gezielte Analysen im Bereich der Ophthalmologie etabliert worden (Pearce et al., Pels et al.). An diesen Beispielen werden die Vorteile der EDX-Analyse anschaulich. Grundsätzlich bieten sich zwei unterschiedliche Ansätze an.

Zum einen erscheint es sinnvoll, bei krankhaften Prozessen im Auge Abweichungen von der Norm bezüglich der Zusammensetzung von Geweben zu untersuchen. Pearce interessierte die genaue Zusammensetzung des Tränenfarns, und zwar auch unter dem Aspekt der Lokalisation z.B. von Makromolekülen wie Proteinen und Muzinen, die sich durch eine erhöhte Schwefelkonzentration auszeichnen. In dem gleichen Labor der Aachener Klinik, in dem auch die vorliegende Studie erarbeitet wurde, hat von Fischern et al. die Veränderungen der mineralischen Zusammensetzung der verätzten Hornhaut untersucht.

Zum anderen eignet sich die EDX-Analyse zum Nachweis nicht natürlicherweise im Auge vorkommender Elemente, wie z.B. Jod oder Fluor. Auf diese Weise läßt sich die Penetration von Medikamenten untersuchen. Pels nähert sich unserem Ansatz, der schichten-differenzierten Quantifizierung applizierter Stoffe bei der Dekontamination von Spenderaugen. In der genannten Studie wird ebenfalls PVP-Jod verwendet, so dass naheliegt, Vergleiche bezüglich der Handhabung der EDX-Analyse anzustellen.

Der nächste, beide Ansätze verbindende Schritt, wäre dann die Untersuchung der elementaren oder strukturellen Veränderungen, die durch Medikamente in okulären Geweben bedingt werden. Dies würde möglicherweise Rückschlüsse auf die Toxizität von Medikamenten zulassen.

4.2.1.2 Ist die absolute Quantifizierung sinnvoll?

Pels et al. verwendet in ihrer Studie den P/B-Quotienten als einzige quantitative Darstellung, weil sie die Variabilität der P/B-Quotienten innerhalb der Hornhaut als zu groß für eine absolute Quantifizierung ansieht.

Der Wert der absoluten Quantifizierung ist bei der genaueren Analyse einer Antibiotikatherapie zu sehen. Dann nämlich sind genaue Wirkkonzentrationen wichtig, die Vergleiche zwischen klinischem Bild und Gewebekonzentrationen zulassen. In Verbindung damit kann

die in Zellkultur untersuchte Toxizität auf z.B. corneale Zellen, mit Konzentrationen im Gewebe in Beziehung gesetzt werden.

4.2.1.3 EDXA: Perspektiven

Die EDXA der Biopsiezylinder ist möglich und nützlich, weil die Schichtung der Hornhaut im bioptischen Präparat erhalten ist. Um die Erweiterung der Anwendung der EDXA in der Klinik zu erreichen, müssen diagnostische Standards definiert werden. Beispielsweise könnten Stoffwechselstörungen, wie Speicherkrankheiten, charakteristische EDXA-Ergebnisse liefern, die diagnostisch genutzt werden könnten. Am Beispiel der Verätzungen ist bereits gezeigt worden, dass ein Krankheitsprozeß eine Veränderung in der mineralischen Zusammensetzung der Hornhaut bewirken kann. Unabhängig von der ophthalmologischen Anwendung, erscheint die Einbeziehung von Umwelttoxinen wie Nikotin, Blei oder Asbest möglich. Proben aus der Hornhaut mit Hilfe einer Hornhautbiopsie sind jedoch immer invasiv, deshalb erscheint diese Probennahme für Routineuntersuchungen zunächst nicht sinnvoll. Hautproben, Urin- oder Blutproben sind gängiger und können eine Exposition nachweisen. Die Indikation für die Hornhautbiopsie bei entsprechender Fragestellung, etwa einer expositionsbedingten Erkrankung des Auges, ist zu prüfen.

4.2.1.4 Gegenüberstellung der Methoden: Vorteile / Nachteile

Wie erwähnt bietet die EDXA die Möglichkeit, Gewebeschichten einzeln zu analysieren und Elemente mit der P/B-Methode zu quantifizieren. Durch die Messung im Elektronenmikroskop ist zusätzlich eine morphologische Beurteilung des Präparates möglich. Als nützlich hat sich dies bei der Beurteilung der Mikrotrepanationen erwiesen.

Demgegenüber bietet die NMR-Spektroskopie die Möglichkeit der Betrachtung molekularer Wechselwirkungen. Sie erfordert jedoch häufig die Homogenisierung des Präparates, das dadurch seine strukturelle Integrität verliert. Die Sensitivität der NMR-Spektroskopie für Fluor ist im Vergleich zur EDXA hoch, so dass eine Quantifizierung des Fluor und somit eine Beurteilung der Penetration des Ciprofloxacin in die Hornhaut und das Kammerwasser möglich ist. Infolge des homogenisierten Präparates ist es jedoch nicht möglich zu eruieren, ob sich die Fluorkonzentration vielleicht auch aus überwiegend epithelialer Akkumulation erklärt oder ob tatsächlich, auch durch intaktes Epithel hindurch, eine Penetration des Ciprofloxacin in stromale Schichten erfolgt. Bei abradiertem Epithel handelt es sich dagegen sicher um stromale Konzentrationen.

Beide Methoden bieten für unsere Fragestellungen nicht die Möglichkeit der *in vivo*-Untersuchung, wobei dies für die NMR-Spektroskopie als langfristiges Ziel anzusehen ist.

Die EDX-Analyse bietet den Vorteil, dass auch sehr kleine Proben, wie z.B. Biopsiezylinder des Mikrotrepan, untersucht werden können.

4.3 Mikrotrepan

4.3.1 Hornhautbiopsie in der ophthalmologischen Diagnostik

Es existieren unterschiedliche Methoden zur Hornhautbiopsie bzw. zur Gewinnung von Hornhautgewebe (Hwang, Friedländer et al., Lee et al., Newton et al.). Die Wahl der geeigneten Methode richtet sich nach der Indikation und dem klinischen Befund. Die Hornhautbiopsie durch den Mikrotrepan empfiehlt sich bei oberflächlichen bis tiefen Hornhautprozessen, bei denen die Strukturhaltung der Hornhautschichten im Biopsiezylinder angestrebt wird. Sowohl bei lokalisierten als auch bei diffusen Prozessen ist es sinnvoll, mehrfach zu biopsieren. Hier kann natürlich mit einem erhöhten Risiko infolge des wiederholten Eingriffs für eine Methode argumentiert werden, die in einem Arbeitsschritt eine größere Materialentnahme ermöglicht (Newton, Hwang). Andererseits ist die Mikrotrepanation wenig komplikationsbehaftet (Kompa et al. 1999) und deswegen auch bei mehrfacher Trepanation als sicherer als ein chirurgischer Eingriff mit nachfolgender Hornhautnaht anzusehen. Abgesehen davon beeinträchtigt die Mikrotrepanation die optische Achse nur wenig und ermöglicht auch bei zentraler Trepanation einen, nach Abheilung unbeeinträchtigten, Visus ohne irregulären Astigmatismus (Kompa et al. 2000).

4.3.2 Der Mikrotrepan in der Therapie

4.3.2.1 Indikation

Die Biopsierung der Hornhaut ist bisher nicht als therapeutischer Ansatz beschrieben worden. Ihre Indikation ist dann zu sehen, wenn sich konservative Maßnahmen, etwa die topische Therapie einer Keratitis mit Antibiotika oder Virustatika, als nicht effektiv erweisen. Als Therapie der ersten Linie ist diese Maßnahme zunächst zu invasiv. Weiter einschränkend ist zu sehen, dass die ideale Indikation für einen lokalisierten stromalen Prozeß besteht, nicht für eine diffuse Keratitis. Allerdings sind es oft gerade diese lokalisierten, abgekapselten Infektionen, die sich als besonders therapieresistent erweisen und langfristig als infektiöser Fokus mit der Gefahr der Einschmelzung angesehen werden müssen. Sie können sich im tiefen Stroma unter intaktem Hornhautepithel befinden. In solchen Fällen handelt es sich häufig um Residuen einer Staphylokokkeninfektion oder einer Herpeskeratitis.

Ist die Indikation gestellt, steht mit der Hornhautbiopsie durch den Mikrotrepan eine sichere, die strukturelle Integrität der Hornhaut nur wenig beeinträchtigende und ambulant, unter lokaler Tropfenanästhesie, durchführbare Methode zur Verfügung.

4.3.2.2 Ziel der therapeutischen Mikrotrepanation

Neben der diagnostischen Abklärung, die immer in Verbindung mit der Trepanation eines entzündlichen Prozesses erfolgen sollte, und die zum sinnvollen Einsatz der therapeutischen Trepanation dazugehört, erfolgt durch die Entnahme der Biopsiezylinder unmittelbar eine Reduktion des infektiösen Agens. Durch bis zu sechs Entnahmen im Bereich eines lokalisierten Prozesses kann das infektiöse Material klinisch signifikant reduziert werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass darüber hinaus eine Verbesserung der lokalen Therapie erreicht werden kann, die sich aus der Eröffnung des Hornhautstromas mit dem Zugang zum Zielort der Therapie erklärt. Die unmittelbar und Stunden bis Tage nach der Mikrotrepanation topisch applizierten Augentropfen können verstärkt in das die Trepanation umgebende Hornhautstroma penetrieren, wie am Beispiel von PVP-Jod anhand der quantitativen Ergebnisse der EDX-Analyse und der visuellen Darstellung in den Mappings gezeigt wurde. Somit gelangt der Wirkstoff direkt an den Ort, der zuvor aufgrund der Krankheitssituation nicht erreichbar war. Dies schafft eine Beschleunigung der Therapie in zweierlei Hinsicht. Zum einen ist der Ausgangspunkt für eine lokale medikamentöse Therapie wesentlich verbessert worden, indem der Prozeß infolge der Mikrotrepanation nicht mehr unter „schützendem“, intaktem Epithel liegt, das eine wirkungsvolle Therapie durch Antibiotika vereitelt. Somit entfällt die Penetrationszeit durch Epithel und anteriores Stroma und ein Teil des Erregerreservoirs wird durch die Stanze entfernt. Zum anderen erreicht der Wirkstoff in höherer Konzentration den Wirkort, so dass schneller effektiv behandelt und bakterizide Konzentrationen erreicht werden können.

4.3.2.3 „Therapeutisches Fenster“

In dieser Studie wird ein therapeutischer Kurzzeiteffekt genutzt, nämlich die Tatsache, dass die Trepanation unmittelbar und für begrenzte Zeit nach der Intervention mit dem Mikrotrepan das tiefe, von der Infektion betroffene Stroma für eine topische Therapie zugänglich macht. Hierbei ist zu beachten, dass dieser Effekt mit fortschreitender Heilung der Läsion schnell abnimmt, dass die Applikation also während der ersten Stunden bis Tage erfolgen muß. Danach richtet sich auch die Wahl der zu applizierenden Augentropfen. Bei der Entscheidung, ob PVP-Jod oder ein Breitspektrumantibiotikum zu wählen ist, sind individuelle Faktoren des jeweiligen Falls abzuwägen, denn oft sind die Patienten schon intensiv antibiotisch vorbehandelt. Für PVP-Jod spricht sein breites Wirkspektrum, seine gute Wirkung gegen Staphylokokken (Melki et al.), seine viruzide Wirkung (Michalova et al.), und dass bisher keine Resistenzen bekannt sind (Pels et al.). Vor allem der letzte Punkt empfiehlt eine zurückhaltende Anwendung „blinder“ Antibiotikatherapie. Es sind zum Beispiel gegen Ciprofloxacin in den letzten Jahren zunehmend Resistenzen aufgefallen (Yamagishi et al., Garg et al., Goldstein et al., Kunitomo et al.). Dies würde den therapeutischen Vorsprung, den

man durch die Mikrobiopsie gewinnen kann, zunichte machen. Nur bei einer schnellen Diagnose, z.B. anhand von Färbungen (grampositive / gramnegative Keime), kann es sich als sinnvoll erweisen, gezielt Antibiotika einzusetzen (Steinert et al., Parks et al., O'Brien et al., Melki et al., Limberg).

Das zeitlich begrenzte therapeutische Fenster bedeutet eine Chance für die Therapie, die überlegt, aber schnell genutzt werden muß.

4.3.2.4 Welchen Wirkstoff als „Akuttherapie“?

Wir haben in dieser Studie PVP-Jod und Ciprofloxacin als Akuttherapeutika nach Mikrotrepanation gewählt.

PVP-Jod hat sich als Antiseptikum und auch bei der Therapie bakterieller Keratitiden bewährt. Es muß allerdings seine Toxizität gegenüber cornealen Fibroblasten berücksichtigt werden, die es in der hier verwendeten Konzentration von 11% als nicht optimal erscheinen lassen. Wenn man aber bedenkt, dass geringere Konzentrationen, etwa 0,5%, ohnehin als effektiver eingestuft werden, könnte diese PVP-Jodkonzentration als Augentropfen nach Mikrotrepanation erwogen werden. Wir haben uns bei der Wahl der PVP-Jodkonzentration von der Idee leiten lassen, das Jod mit Hilfe der EDX-Analyse in der Hornhaut nachzuweisen. Diese Überlegungen standen gegenüber klinischen Erwägungen zur optimalen Wirkkonzentration im Vordergrund.

Die topische Applikation von Augentropfen, speziell 11% PVP-Jod vor und nach der Hornhautbiopsie, dient zunächst der prä- und postoperativen Antisepsis, dem klassischen Anwendungsfeld von PVP-Jod in dieser Konzentration.

4.4 PVP-Jod

4.4.1 Effektivität und Toxizität

Bei der Frage, welche Konzentration von PVP-Jod bei der hier dargestellten Anwendung sinnvoll ist, muß die Toxizität neben der Effektivität mit betrachtet werden. Übereinstimmend fanden Isenberg, Reimer, Melki und Pels Konzentrationen bis 5% PVP-Jod effektiv mikrobiozid. Teilweise lagen die verwendeten Konzentrationen auch noch deutlich darunter. So zeigt Melki, dass auch 0,5% PVP-Jod einen signifikanten bakteriziden Effekt bei der Behandlung der experimentellen Staphylokokkenkeratitis hat. Es ist dabei aber 0,3% Ofloxacin unterlegen. Da Melki aber Penetrationsprobleme des PVP-Jod eher als mangelnde antimikrobielle Potenz für den Unterschied verantwortlich macht, wäre es möglich, dass PVP-Jod bei der verbesserten Penetration, die durch die Mikrotrepanation ermöglicht wird, Ofloxacin gleichwertig wäre.

Die Verdünnung des PVP-Jod bedingt eine Schwächung der Jodbindung zum Trägermolekül und führt über einen erhöhten Anteil freien Jods zu einer verbesserten antimikrobiellen Wirkung (Berkelman et al.). So ist zu erklären, dass niedrige Konzentrationen (0,5%, 2,5%) von PVP-Jod bei der antimikrobiellen Therapie hohen Konzentrationen (11%) deutlich überlegen sind.

Bei der bekanntermaßen breiten Verwendung von PVP-Jod als präoperatives Antiseptikum und nun eben auch als antibakterielles Therapeutikum, muß die okuläre Toxizität überprüft werden. Eine Toxizität des PVP-Jod gegen das Hornhautepithel ist bisher nicht beobachtet worden (MacRae et al.). Somit ist eine Verwendung als äußerliches Antiseptikum zunächst unbedenklich. Nach Untersuchungen am cornealen Endothel (Alp et al.) und cornealen Fibroblasten (Pels et al.) besteht aber eine erhebliche Toxizität in Konzentrationen über 5% (Endothelschäden mit Vakuolenbildung, Alp) bzw. 0,25% (Fibroblasten verlieren ihre mitochondriale Aktivität, Pels). Wille et al. fand hingegen bei der Verwendung von PVP-Jod zur Desinfektion der Konjunktiva vor Cataractextraktion keine Endothelschädigung. Im Unterschied zur Studie von Alp et al. erfolgte jedoch keine Instillation in die Vorderkammer, sondern das Endothel wurde nach routinemäßigem Operationsablauf beurteilt.

Es ist also schwierig, die für unsere Fragestellung ideale PVP-Jodkonzentration zu finden, da bei mikrobioziden Konzentrationen Schädigungen der cornealen Fibroblasten in Kauf genommen werden müssen. Die klinische Relevanz der Fibroblastenschädigung bei einer PVP-Jodkonzentration von 0,5% wäre zu überprüfen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass für die klinisch-therapeutische Anwendung bei eröffnetem Hornhautstroma nach Mikrotrepanation ein deutlich geringer konzentriertes als das von uns verwendete 11% PVP-Jod sinnvoll erscheint.

4.4.2 Penetration und Nachweisgrenze

Wir können die Nachweisgrenze für Jod in der EDXA nicht genau definieren, weil sich auch in der am geringsten konzentrierten Standardlösung, die wir verwendeten, Jod sicher nachweisen ließ. Diese Menge liegt auch hoch über der von Pels angegebenen Nachweisgrenze von 0,2 mg/ml Jod und erst recht über der von Hall angegebenen 10^{-14} g. Pels macht mögliche, nicht optimale Meßbedingungen in biologischen Proben für diese Diskrepanz verantwortlich. Es bleibt aber die Frage, warum in der vorliegenden Studie der Nachweis von Jod im cornealen Stroma ausbleibt, obwohl Pels für Konzentrationen von 100 mg/ml (10%) PVP-Jod und eine Einwirkzeit von 5 Minuten stromale Konzentrationen mit der EDXA nachweisen konnte. Eine denkbare Erklärung ist, dass Pels von einer kontinuierlichen Einwirkung im Überfluß der Lösung während 5 Minuten ausging (Bad der humanen Spenderaugen in PVP-Jodlösung). Zudem ist die Barrierefunktion des Epithels post

mortem reduziert. Wir haben in unserer Versuchsanordnung einzelne Tropfen appliziert, die durch den Tränenfilm und die relativ große Verteilungsfläche rasch verteilt worden sein können. Bezüglich der Toxizität ist es aber bei unserer Zielsetzung als Vorteil anzusehen, wenn in das nicht betroffene Stroma kein Wirkstoff eintritt. Es ist somit eine gezieltere Therapie unter Vermeidung unnötiger toxischer Einflüsse auf das Hornhautstroma möglich.

Für den ausgebliebenen Ciprofloxacinnachweis gilt: nach den Ergebnissen von Donnenfeld et al. (1994, 1997) und den Ergebnissen der vorliegenden Studie, ist bei der angewendeten Versuchsanordnung von einer Penetration von Ciprofloxacin in das Hornhautstroma auszugehen. Es ist ebenso anzunehmen, dass die Penetration von Ciprofloxacin dem Schema, das sich bei der Penetration von PVP-Jod an der Mikrotrepanation der Hornhaut gezeigt hat, ähnelt. Wir können also für Medikamente, deren toxische Wirkung auf die Hornhaut erforscht ist, und deren Wirksamkeit bei den in Frage kommenden Erregern gezeigt ist, ein neues Modell zur Therapie bei den vorgestellten Indikationen vorlegen.

4.5 Mapping

Mappings dienen der visuellen Darstellung der Verteilung ausgewählter Elemente in einer Probe.

Die Bilder unserer Proben geben uns Aufschluß über die Verteilung von Jod im Bereich des Epithels und der Trepanationen der Hornhaut, nach der topischen Applikation von 11% PVP-Jod. Deutlich wird, dass sich Jod verstärkt im Epithel, sowie im stromalen Gewebe unter und an den Seiten der Trepanationen anreichert. Aussagen über die Verteilung im peripheren und tieferen Stroma sind aufgrund dieser Aufnahmen nicht möglich, da sich die Jodsignale dort kaum vom Hintergrundrauschen abheben.

Der Ausgangspunkt für eine Penetration des Wirkstoffs in das Stroma ist in den Trepanlöchern günstig, weil hier die Barriere, die das Epithel sonst darstellt, entfällt. Das Epithel ist auf den Jod-Mappings als scharfe Linie zu erkennen, die deutlich die Barrierefunktion dieser Zellschicht widerspiegelt. In den Trepanationen weicht diese Linie auf, wird breiter und diffuser und deutet auf den erleichterten Übertritt der applizierten Substanz in das Hornhautstroma hin. Die Ergebnisse des Mappings unterstreichen die Aussagen, die wir anhand der quantitativen EDX-Analyse getroffen haben.

4.6 Makroskopie und Histologie

4.6.1 FG, TG, Hydratation, Osmolarität

Der Wassergehalt der Proben liegt im Mittel bei 85,25% für die mit PVP-Jod behandelten Hornhäute und 81,98% für die mit Ciprofloxacin behandelten Hornhäute. Er liegt somit signifikant höher als der in der Literatur angegebene von 75% für die menschliche Hornhaut (de Azavedo et al.) und 76,2% für die Hornhaut des Rindes (Midelfart et al. 1987). Dieses Ergebnis sehen wir, in Verbindung mit der, im Vergleich zu Normwerten, leicht erniedrigten Osmolarität, als Folge einer Quellung der Hornhäute unter der Tropfentherapie. Dies kann jedoch auch artefiziell entstanden sein, denn PVP-Jod wird eigentlich eine entquellende Wirkung zugeschrieben (Pels et al.). Für die dehydrierende Wirkung von PVP-Jod würde die im Vergleich zur Ciprofloxacin-Gruppe erhöhte Osmolarität sprechen. Mit dem Wassergehalt der Hornhaut verhält es sich jedoch genau entgegengesetzt. Wegen der geringen Probenzahl, die wir für diese Messungen herangezogen haben, ist eine eindeutige Aussage in dieser Frage nicht zu treffen.

4.6.2 Präzipitation von Ciprofloxacin

Die Präzipitation von Ciprofloxacin ist nach Essepian et al. auf die im Augenmilieu veränderte Löslichkeit des Medikamentes zurückzuführen. Eine 0,3%ige Ciprofloxacinlösung (Ciloxan der Firma Alcon) hat einen pH von 4,5. Die Löslichkeit von Ciprofloxacin sinkt bei physiologischem Tränenfilm-pH, der bei 7,4 (7,3-7,7) liegt. Essepian beschreibt in einem *in vitro* Versuch, wie ein Tropfen 0,3% Ciprofloxacin bei topischer Applikation zunächst den pH-Wert des Tränenfilms auf 4,7 reduziert. Der Wert reguliert sich mit dem Turnover des Tränenfilms, bleibt jedoch tendentiell saurer als im Ausgangspunkt. Ab einem Tränen-pH von 5,8 und darüber, sinkt die Löslichkeit von Ciprofloxacin signifikant, die Lösung wird trübe. Essepian fand diese Beobachtungen im Tierversuch bestätigt, sowohl makroskopisch, als auch mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie.

Bei dem Vergleich der Löslichkeit von Ciprofloxacin in Flüssigkeiten mit unterschiedlichem pH zeigt sich, dass sie mit steigendem pH absinkt. Am höchsten ist sie in Succinat (0,05 M) mit einem pH von 4,13. Hierbei beträgt die Löslichkeit von Ciprofloxacinhydrochlorid 32,5 mg/ml. Zum Vergleich: in einer 0,05 M Phosphatlösung mit pH 6,66 beträgt die Löslichkeit nur noch 0,1 mg/ml.

Die beschriebenen weißen Ablagerungen auf der Hornhaut traten in der vorliegenden Studie bei allen mit Ciprofloxacin behandelten Augen auf, stärker jedoch in der Gruppe der trepanierten Hornhäute. Dieses Phänomen wird bei Leibowitz für ulcerierte Hornhäute mit bakterieller Keratitis beschrieben. Hier werden bei Ulzerationen stärker ausgeprägte, weiß-

kristalline Beläge beschrieben, als bei nicht ulzerierten Hornhäuten. Analytisch zeigte sich, dass es sich bei dem Präzipitat um Ciprofloxacin handelt.

Kanellopoulos et al. beschreiben den Fall einer 83jährigen Patientin mit Hornhautulkus, die nach mehrtägiger topischer Applikation von Ciprofloxacin Augentropfen ein weißliches, am Ulkus adhärentes Präzipitat entwickelte.

4.7 Histologie

Es fiel uns eine Verdickung der Hornhäute gegenüber den Normalwerten auf (Dissertationsschrift von Frau Tatjana von Fischern). Nach Stevens et al. kann Ciprofloxacin, möglicherweise über eine Wechselwirkung mit den cornealen Endothelzellen, zu einem Stromaödem führen. Er macht diese Beobachtung bei intravitreal bzw. intracameral injiziertem Ciprofloxacin. Jod hingegen soll nach Pels einen dehydrierenden Effekt auf die Hornhaut ausüben. Es ist somit fraglich, warum es besonders in der Jodgruppe zu einer Quellung der Präparate gekommen ist. Möglicherweise handelt es sich um Artefakte, die im Verlauf der Präparation entstanden sind.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die NMR-Spektroskopie hat sich in dieser Studie als sensible Nachweismethode für fluoridierte Medikamente im Auge erwiesen. Die Frage nach Metaboliten von Ciprofloxacin im Auge weist den Weg für weitere Untersuchungen an der Struktur dieser Moleküle, um eine Identifizierung zu ermöglichen. Die weitere Erforschung der Aktivität der Metabolite könnte Aufschlüsse zur Pharmakokinetik speziell im Auge ergeben. Die Sensitivität der Methode lässt eine *in vivo* Detektion von fluoridierten Medikamenten im Auge dennoch zunächst nicht zu. Die Modifizierung und Verbesserung der dies beeinflussenden Faktoren wird Gegenstand weiterer Forschung sein.

Wir haben durch unsere Versuche die Barrierefunktion des Hornhautepithels zum einen mit der schichtendifferenzierten Quantifizierung der EDX-Analyse und zum anderen mit der Visualisierung der Jodverteilung in den Mappings zeigen können. Durch die Trepanation der Hornhaut kann ein starker lokal-therapeutischer Effekt in der Hornhaut erzielt werden, der sich darin äußert, dass die Jodkonzentrationen am Rande der Trepanationen im Hornhautstroma sehr weit über den Jodkonzentrationen an gleicher Stelle unter intaktem Hornhautepithel liegen.

Nach einer Mikrotrepanation befindet sich im Trepanationszylinder ein Gewebestück, das bei der diagnostischen Indikation für die histologische Untersuchung zur Verfügung steht. Im Falle einer lokal-stromalen Infektion könnten mit der Mikrotrepanation aus dem infektiösen Herd zwei Ziele verfolgt werden. Zunächst wird mechanisch eine Keimreduktion erreicht, da sich im biopsierten Gewebestück Bakterienmassen befinden. Hier wäre bereits der erste Teil des therapeutischen Ansatzes zu sehen. Gleichzeitig steht das biopsierte Material aber auch für die genaue mikrobiologische Analyse der Keime zur Verfügung. Im folgenden Schritt können nun PVP-Jod oder ein Antibiotikum topisch appliziert werden. Die Trepanation gewährleistet eine gute und schnelle Penetration des Wirkstoffs an den Ort der Entzündung. Die diagnostische Mikrotrepanation kann also einen quantitativen, qualitativen und zeitlichen Fortschritt bei der Behandlung von stromalen Keratitiden bringen.

Wir haben in dieser Studie gesunde Kaninchenhornhäute untersucht. Für die Zukunft wäre denkbar, zur Optimierung der Therapie den Verlauf einer experimentellen Keratitis nach Mikrotrepanation und lokaler Therapie zu untersuchen.

6 Literatur

ALEXANDER NM: Reaction of povidone-iodine with aminoacids and other important biological compounds. In: Degenes G, ed. Proceedings of the International Symposium on Povidone. Lexington KY: University of Kentucky, 1983: 274-88

ALEXANDRAKIS G, Alfonso E, Miller D: Shifting trends in bacterial keratitis in South Florida and emerging resistance to fluoroquinolones. *Ophthalmology* 2000; 107(8): 1497-1502

ALP B, Elibol O, Sargon M: The effect of povidone iodine on the corneal endothelium. *Cornea* 2000; 19(4): 546-550

AUE WP, Bartholdi E, Ernst RR: Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J Chem Phys* 1976; 64: 2229-46

AWNI WM, Clarkson J, Guay DR: Determination of Ciprofloxacin and its 7-ethylenediamine metabolite in human serum and urin by HPLC. *J Chromatogr Biomed* 1987; Appl.419: 414-420

AZAVEDO DE ML, De Jorge FB: Some mineral constituents of the normal human eye tissues. *Ophthalmologica* 1965; 149: 43-52

BACRACHEVA N, Scholl H, Gerova Z: The distribution of Ciprofloxacin and its metabolites in human plasma, pulmonary and bronchial tissues. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1991; 29(9): 352-356

BEERMANN D, Scholl H, Wingender W: Metabolism of ciprofloxacin in man. 1st International Ciprofloxacin Workshop 1985; 141-46

BERKELMAN RL, Holland BW, Anderson RL: Increased bactericidal activity of dilute preparations of povidone-iodine solutions. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 635-39

BERKOWITZ BA, Garner MH, Wilson CA: Nondestructive measurement of retinal glucose transport and consumption in vivo using NMR spectroscopy. *Journal of Neurochemistry* 1995; 64: 2325-31

BERKOWITZ BA, Moriyama T, Fales HM: In vivo metabolism of 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose. *J Biol Chem* 1990; 265: 12417-23

BERKOWITZ BA, Wilson CA: A direct method for investigating vitreous glucose turnover in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 1279

BOEKESTEIN A: Elektronensonde Röntgenmikroanalyse van biologische Preparaten Verbetering van aantal kwantificerings-procedures. Promotionsschrift katholieke Universiteit Nijmegen. 1984; 1-184

BROWN JCC, Sadler PJ, Spalton DJ: Analysis of human aqueous humour by high resolution ^1H NMR spectroscopy. *Exp Eye Res* 1986; 42: 357-62

CELEBI S, Ay S, Aykan U: Penetration of oral and topical Ciprofloxacin into human aqueous humor. *Acta Ophthalmol Scand* 1998; 76(6): 683-5

CHIN N, Neu H: Ciprofloxacin: a Quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1984; 319-326

COKINGTON C, Hyndiuk R: Insights from experimental data on Ciprofloxacin in the treatment of bacterial keratitis and ocular infections. *Am J Ophthalmol* 1991; 112: 25S-28S

CUTARELLI PE, Lass JH, Lazarus HM: Topical Fluoroquinolones: antimicrobial activity and in vitro corneal epithelial toxicity. *Curr Eye Res* 1991; 10: 557-63

DiGENIS GA, Rokem S, Eckert D: Studies on the association of 14 C Povidone and 131 I Iodine complex with red blood cells and bacterial membranes. In: Degenes G, ed. *Proceedings of the International Symposium on Povidone*. Lexington KY: University of Kentucky, 1983: 302-11

DONNENFELD E, Perry H, Synder R: Intracorneal, aqueous humor and vitreous humor penetration of topical and oral Ofloxacin. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 173-176

DONNENFELD ED, Schrier A, Perry HD: Penetration of topically applied Ciprofloxacin, Norfloxacin and Ofloxacin into the aqueous humor. *Ophthalmology* 1994; 902-5

ELLERHORST B, Golden B, Jarude N: Ocular penetration of topically applied Gentamicin. *Arch Ophthalmol* 1975; 93: 371-78

ESSEPIAN J, Rajpal R, O'Brien T: Tandem scanning confocal microscopic analysis of Ciprofloxacin corneal deposits in vivo. *Cornea* 1995; 14(4): 402-07

FAULKNER WM: *Basic MR Principles* (<http>) 1996

FISCHERN VON T, Burchard WG, Lorenz U, Burchard WG, Reim M, Schrage NF: Changes in mineral composition of rabbit corneas after alkali burn. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236: 553-58

FLEISCHER W, Reimer K: Povidone-Iodine in antisepsis – state of the art. *Dermatology* 1997; 197: Suppl.2, 3-9

FRIEDLÄNDER MH: Corneal biopsy. *Int Ophthalmol Clin* 1988; 28(2): 102

GARG P, Sharma S, Rao GN: Ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas* keratitis. *Ophthalmology* 1999; 106(7): 1319-23

GOLDSTEIN MH, Kowalski RP, Gordon YJ: Emerging Fluoroquinolone resistance in bacterial keratitis: a 5-year review. *Ophthalmology* 1999; 106(7): 1313-18

GOPINATHAN U, Reddy M, Nadkarni M: Antimicrobial effect of Ciprofloxacin, Povidone-Iodine and Gentamicin in the decontamination of human donor globes. *Cornea* 1998; 17(1): 57-61

GREINER JV, Braude LS, Glonek T: Distribution of phosphatic metabolites in the porcine cornea using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Exp Eye Res* 1985; 40(3): 335-42

GREINER JV, Kopp SJ, Gillette TE: Dynamic metabolism of the cornea: a phosphorus-31 nuclear magnetic spectroscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 535-42

GREINER JV, Kopp SJ, Glonek T: Nondestructive metabolic analysis of a cornea with the use of phosphorus nuclear magnetic resonance. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 770-71

GREINER JV, Kopp SJ, Sanders DR: Organophosphates of the crystalline lens: a nuclear magnetic resonance spectroscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 21: 700-13

GREINER JV, Lass JH, Glonek T: Noninvasive metabolic analysis of eye bank corneas: a magnetic resonance spectroscopic study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989; 227: 295-99

GRIBBESTAD I, Midelfart A: High-resolution ^1H NMR spectroscopy of aqueous humor from rabbits. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994; 232: 494-98

HAGENAH M, Winter R: Dekontamination menschlicher Spenderhornhäute während der Präparation und Konservierung. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1996; 209: 1-6

HALL TA: Biological X-ray microanalysis. *J Microsc* 1979; 117: 145-63

HAYASHI K, Cheng HM, Iwasaki M: Metabolic analysis of reepithelializing rabbit cornea using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1990; 228: 73-77

- HOBDEN JA, O`Callaghan R, Hill J: Ciprofloxacin and Prednisolone therapy for experimental *Pseudomonas* keratitis. *Current Eye Research* 1992; 11: 259-266
- HOOPER D, Wolfson J: Minireview: The Fluoroquinolones: pharmacology, clinical use and toxicities in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1985; 28(5): 716-21
- HWANG D: Lamellar flap corneal biopsy. *Ophthalmic Surgery* 1993; 24(8) 512-15
- ISENBERG SJ, Apt L, Yoshimori R, Pham C, Lam NK: Efficacy of topical povidone-iodine during the first week after ophthalmic surgery. *Am J Ophthalmol* 1997; 124 (1): 31-35
- ISHIBASHI Y, Kaufman HE: Corneal Biopsy in the diagnosis of Keratomycosis. *Am J Ophthalmol* 1986; 101: 288-93
- JANTHUR E, Blessing J, Ehrich W: Polivinyl-Pyrrolidon-Jod und Arginase: Einfluß auf Hornhaut-Regeneration und antivirale Wirkung. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1985; 186: 25-28
- JOOS B, Ledergerber B, Flepp M: Comparison of high pressure liquid chromatography and bioassay for determination of Ciprofloxacin in serum and urine. *Antmicrob Agents Chemother* 1985; Mar: 353-356
- KANELLOPOULOS A, Miller F, Wittpenn J: Deposition of topical Ciprofloxacin to prevent re-epithelialization of a corneal defect. *Am J Ophthalmol* 1994; 117(2): 258-59
- KOMPA S, Ehlert E, Reim M, Schrage NF: Microbiopsy in healthy rabbit corneas. A long term study. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 2000; 78: 411-15
- KOMPA S, Langefeld S, Kirchhof B, Schrage N: Corneal biopsy in keratitis performed with the microtrephine. *Graefe`s Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237: 915–19
- KOWALSKI R, Karenchak L, Gordon YJ: Comparison of Ciprofloxacin and Ofloxacin using human corneal susceptibility levels. *Cornea* 1998; 17(3): 282-87
- KUNIMOTO DY, Sharma S, Garg P: In vitro susceptibility of bacterial keratitis pathogens to Ciprofloxacin, emerging resistance. *Ophthalmology* 1999; 106: 80-85
- LEE P, Green R: Corneal Biopsy: Indications, techniques and a report of a series of 87 cases. *Ophthalmology* 1990; 97: 718-21
- LEIBOWITZ H: Antibacterial effectiveness of Ciprofloxacin 0,3% ophthalmic solution in the treatment of bacterial conjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1991; 112: 29S-33S

- LEIBOWITZ H: Clinical Evaluation of Ciprofloxacin 0,3% ophthalmic solution for treatment of bacterial keratitis. *Am J Ophthalmol* 1991; 112: 34S-47S
- LIMBERG M: A review of bacterial keratitis and bacterial conjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1991; 112: 2S-9S
- MACRAE SM, Brown B, Edelhauser HF: The corneal toxicity of presurgical skin antisepsis. *Am J Ophthalmol* 1984; 97: 221-32
- MADU A, Mayers M, Perkins R: Aqueous and vitreous penetration of Ciprofloxacin following different modes of systemic administration. *Exp Eye Res* 1996; 63: 129-36
- MALET-MARTINO MC, Martino R: MRS in experimental and clinical drug metabolism studies. In *Magnetic Resonance Spectroscopy in Biology and Medicine*. (De Certaines JD, Bovée WMMJ, Podo F) Pergamont Press: Oxford, New York, Seoul, Tokyo: 1992; 493-506
- MALET-MARTINO MC, Martino R: Uses and limitations of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokin* 1991; 20(5): 337-49
- MALET-MARTINO MC, Martino R: Magnetic resonance spectroscopy: a powerful tool for drug metabolism studies. *Biochimie* 1992; 74(9-10): 785-800
- MARCHESE A, Slana V, Holmes E: Toxicity and pharmacokinetics of Ciprofloxacin. *Journal of Ocular Pharmacology* 1993; 9: 69-76
- MARION D, Wüthrich K: Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113: 967-74
- MAURICE DM, Mishima S: Ocular pharmacokinetics. In *Sears ML: Pharmacology of the eye*. Springer Verlag, Berlin, Handbook of exp. Pharmacol., 1984; 69: 19-116
- MCDERMOTT M, Tran T, Cowden J: Corneal stromal penetration of topical Ciprofloxacin in humans. *Ophthalmology* 1993; 100: 197-200
- MELKI S, Safar A, Yaghouti F: Effect of topical Povidone-Iodine versus topical Ofloxacin on experimental *Staphylococcus* keratitis. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238: 459-62
- MICHALOVÁ K, Moyes A, Cameron S: Povidone-Iodine (Betadine) in the treatment of experimental *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Cornea* 1996; 15(5): 533-36

- MIDELFART A: The effect of Amiloride on Na, K and water in bovine corneal epithelium. *Exp Eye Res* 1987; 45(5): 751-62
- MIDELFART A, Dybdal A, Gribbestad I: Detection of different metabolites in the rabbit lens by high resolution ^1H NMR spectroscopy. *Curr Eye Res* 1996; 15: 1175-81
- MIDELFART A, Dybdal A, Gribbestad I: Metabolic analysis of the rabbit cornea by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Ophthalmic Research* 1996a; 28: 319-29
- MIDELFART A, Dybdahl A, Krane J: Detection of Dexamethasone in the cornea and lens by NMR spectroscopy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237: 415-23
- MIDELFART A, Dybdal A, Mueller N, Sitter B, Gribbestad IS, Krane J: Dexamethasone and Dexamethasone Phosphat detected by ^1H and ^{19}F NMR Spectroscopy in the aqueous humor. *Exp Eye Research* 1998; 66: 327-337
- MIDELFART A, Gribbestad I, Knutsen B, Jørgensen L: Detection of metabolites in aqueous humor from cod eye by High Resolution ^1H NMR Spectroscopy. *Comp Biochem Physiol* 1996b; 113B(3): 445-50
- SUHR H: Kernresonanzspektroskopie. In: Untersuchungsmethoden in der Chemie. Einführung in die moderne Analytik. Naumer H, Heller W; Georg Thieme Verlag 1990: 131-48
- NEU H: Ciprofloxacin: An overview and prospective appraisal. *Am J Med* 1987; 82: 395-404
- NEU H: The Quinolones. *Infectious disease clinics of North America* 1989; 3(3): 625-39
- NEU H: Microbiologic aspects of Fluoroquinolones. *Am J Ophthalmol* 1991; 112: 15S-24S
- NEWTON C, Moore MB, Kaufman HE: Corneal biopsy in chronic keratitis. *Arch Ophthalmol* 1987; 105: 577-78
- O'BRIEN T, Sawusch M: Topical Ciprofloxacin treatment of *Pseudomonas* keratitis in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1988; 106: 1444-46
- PARKS D, Abrams D, Sarfarazi F: Comparison of topical Ciprofloxacin to conventional antibiotic therapy in the treatment of ulcerative keratitis. *Am J Ophthalmol* 1993; 115: 471-77
- PEARCE E, Tomlinson A: Spatial location studies on the chemical composition of human tear ferns. *Ophthal Physiol Opt* 2000; 20(4): 306-13
- PELS E, Vrensen GFJM: Microbial decontamination of human donor eyes with povidone-iodine: penetration, toxicity and effectiveness. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 1019-26

- PRICE F, Whitson W, Collins K: Corneal tissue levels of topically applied Ciprofloxacin. *Cornea* 1995; 14(2): 152-56
- REDDY DVN, Kinsey VE: Composition of vitreous humour in relation to that of plasma and aqueous humors. *Arch Ophthalmol* 1960; 63: 715-20
- REIDY JJ, Hobden JA, Hill JM: The efficacy of topical Ciprofloxacin and Norfloxacin in the treatment of experimental *Pseudomonas keratitis*. *Cornea* 1991; 10(1): 235-38
- REIM M: *Augenheilkunde*, 5.Auflage, 1996, Ferdinand Enke Verlag
- REIMER K, Fleischer W, Brogmann B: Povidone-iodine liposomes – an overview. *Dermatology* 1997; 195 (2): S93-S99
- REVERDY ME, Surgot M, Fleurette J: Croissance de *staphylococcus aureus* Cowan I en presence de concentrations infrabactericides de polyvinylpyrrolidone iodeé. *J Pathol Biol* 1983; 31 : 551-54
- RIEGER G, Winkler R, Buchberger W: Iodine distribution in a porcine eye model following iontophoresis. *Ophthalmologica* 1995; 209: 84-87
- RUTHERFORD JM: Macromolecular aspects of the biocidal activity of povidone-iodine. In: Degenes G, ed. *Proceedings of the International Symposium on Povidone*. Lexington KY: University of Kentucky, 1983: 217-21
- SALIBI N, Brown MA: *Clinical MR Spectroscopy, First Principles*. Wiley-Liss Publication 1998
- SCHRAGE NF, Almkermann A, Salla S, Burchard WG, Reim M: Does the human cornea contain silicon? *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234: 106-09
- SCHRAGE NF, Benz K, Beaujean P, Burchard WG, Reim M: A simple empirical calibration of energy dispersive X-ray analysis (EDXA) on the cornea. *Scanning Microscop* 1993; 7(3): 881-88
- SCHRAGE NF, Flick S, Redbrake C, Reim M: Electrolytes in the cornea: a therapeutic challenge. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234: 761-64
- SCHRAGE NF, Lorenz U, Fischern von T, Reim M: The microtrephine, a new diagnostic tool for obtaining corneal biopsies. *Acta Ophthalmologica* 1994; 72: 384-87
- SMITH JT, Lewin CH: Chemistry and mechanism of action of the chinolone antimicrobials. In Andriole VT (ed): *The Quinolones*. London, Academic, 1988; 23-82

- SNYDER ME, Katz HR: Ciprofloxacin-resistant bacterial keratitis. *Am J Ophthalm* 1992; 114: 336-38
- STEINERT R: Current therapy for bacterial keratitis and bacterial conjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1991; 112: 10S-14S
- STEVENS S, Fouraker B, Jensen H: Intraocular safety of Ciprofloxacin. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1737-43
- TSUNODA A, Shibusawa M, Tsunoda Y: Implantation on the suture material and efficacy of povidone-iodine solution. *Eur Surg Res* 1997; 29(6): 473-80
- VRATSANOS SM: On the structure and function of the polyvinylpyrrolidone-iodine complex. In: Degenes G, ed. *Proceedings of the International Symposium on Povidone*. Lexington KY: University of Kentucky, 1983: 289-301
- WANG AG, Wu CC, Liu JH: Bacterial corneal ulcer: a multivariate study. *Ophthalmologica* 1998; 212: 126-32
- WHITE LO: Metabolism of 4-Quinolones. *Quinolones Bulletin* 1987; 1:1-4
- WILHELMUS KR, Hyndiuk RA, Caldwell DR: 0,3% Ciprofloxacin ophthalmic ointment in the treatment of bacterial keratitis. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 1210-18
- WILLE H: Assessment of possible toxic effects of Polyvinylpyrrolidone-Iodine upon the human eye in conjunction with cataract extraction. *Acta Ophthalmologica* 1982; 60: 955-60
- WILLIAMS WF, Austin CD, Farnsworth PN: Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopic studies on the relationship between transparency and glucose metabolism in the rabbit lens. *Exp Eye Res* 1988; 47: 97-112
- YAMAGISHI J, Frutani Y, Inoue S: New nalidixic acid resistance mutations related to desoxyribonucleic acid gyrase activity. *J Bacteriol* 1981; 148: 450-58
- ZAMORA JL: Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of Povidone-Iodine solutions. *Am J Surgery* 1986; 151: 400-06
- ZEECK A, Eick S, Krone B: *Chemie für Mediziner*, 2.Auflage Urban & Schwarzenberg 1992

7 Anhang

7.1 Feuchtgewicht, Trockengewicht, Osmolarität

Kaninchen der Gruppe 2

1% Ciprofloxacin

Auge 135 A

Kammerwasser: 0,23812 ml

Cornea: 0,97001 g

Linse: 1,97646 g

Auge 135 B

Kammerwasser: 0,27362 ml

Cornea: 0,96770 g

Linse: 1,96731 g

Kaninchen der Gruppen I und II

Feuchtgewicht, Trockengewicht, Osmolarität von Hornhauthälften einer Auswahl von Proben der Gruppen I und II:

Probennr.	FG (g)	TG (g)	Diff.FG-TG (g)	Hydratation	Osmo. (osmol/kg)
464 mT/B	0,0695	0,0104	0,0591	5,6827	0,303
465 mT/B	0,0766	0,0116	0,065	5,6034	0,287
471 oT/B	0,0636	0,0092	0,0544	5,9130	0,33
71 oT/B	0,0866	0,0125	0,0741	5,9280	0,326
473 oT/C	0,0574	0,0074	0,05	6,7568	0,271
614oT/C	0,0502	0,0112	0,039	3,4821	0,237
463mT/C	0,0434	0,0086	0,0348	4,0465	
Mittelwert ges.	0,0639		0,053771	5,3447	0,292333
Mittelwert Jod	0,07408		0,06315	5,7818	0,3115
Mittelwert Cipro	0,05033		0,041267	4,7618	0,254

7.2 Meßeinstellungen der NMR-Spektroskopie

Spektrum	RF-Puls: Winkel, Dauer	FID Anzahl Datenpunkte	Größe des Spektrums: sweep width	Aufnahmezeit = aquisition time	Wiederholungs- zeit = repetition time	Temperatur Kelvin (K)	Observations- frequenz
Cipro. 1H	90°, 11,2 µs	34998	5,00 kHz	3,49 sec	5 sec	300 K	500,13 MHz
Cipro. 13C	90°, 6,58µs	65536	25,252 kHz	1,29 sec	3 sec	297 K	125,77 MHz
COSY: 1H-13C	90°, 5µs	4096	25,252 kHz	0,081 sec	2 sec	297 K	125,77 MHz
Cipro. 19F	90°, 8,75	159014	61,162 kHz	1,29 sec	1,5 sec	292 K	470,53 MHz
KW/HH: 1H	90°, 11,2 sec	34998	5,00 kHz	3,49 sec	5 sec	305 K	500,13 MHz
KW/HH/L: 19F	90°, 8,75µs	159014	61,162 kHz	1,29 sec	1,5 sec	292 K	470,53 MHz

7.3 EDXA Standards und Ergebnisse

Aus Instat: Lineare Regression

Magnesium-Standard

Number of points = 21

Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval from to	
Slope	2.077	0.09101	1.887	2.268
Y intercept	1.083	0.07751	0.9204	1.245
X intercept	-0.5212			

Correlation coefficient (r) = 0.9822.

r squared = 0.9648

Standard deviation of residuals from line ($Sy.x$) = 0.2084

Test: Is the slope significantly different from zero?

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

This result was obtained from the following ANOVA table.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Linear regression (Model)	1	22.631	22.631
Deviations from linearity (Residual)	19	0.8255	0.04345
Total	20	23.457	

$F = 520.88$

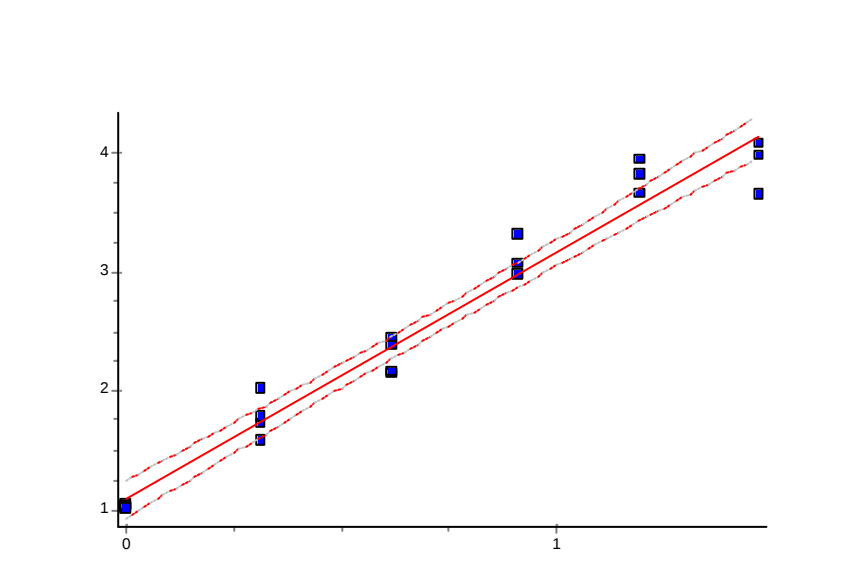


Abb. 7-1: Magnesium Standard zur EDXA. **Lineare Regression:** durchgezogene Linie; **95% Konfidenzintervall:** gepunktete Linie. Ordinate: P/B-Quotient des Mg-Standards. Abszisse: Einwaage Mg in den jeweiligen Standard (0-100%) in mmol/g

Chlorid-Standard

Number of points = 21

Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval	
			from	to
Slope	7.006	0.5165	5.925	8.087
Y intercept	3.285	1.426	0.3010	6.268
X intercept	0.4688			

Correlation coefficient (r) = 0.9521.

r squared = 0.9064

Standard deviation of residuals from line ($S_{y.x}$) = 3.833

Test: Is the slope significantly different from zero?

The P value is < 0.0001 , considered extremely significant.

This result was obtained from the following ANOVA table.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Linear regression (Model)	1	2704.0	2704.0
Deviations from linearity (Residual)	19	279.20	14.694
Total	20	2983.2	

$F = 184.02$

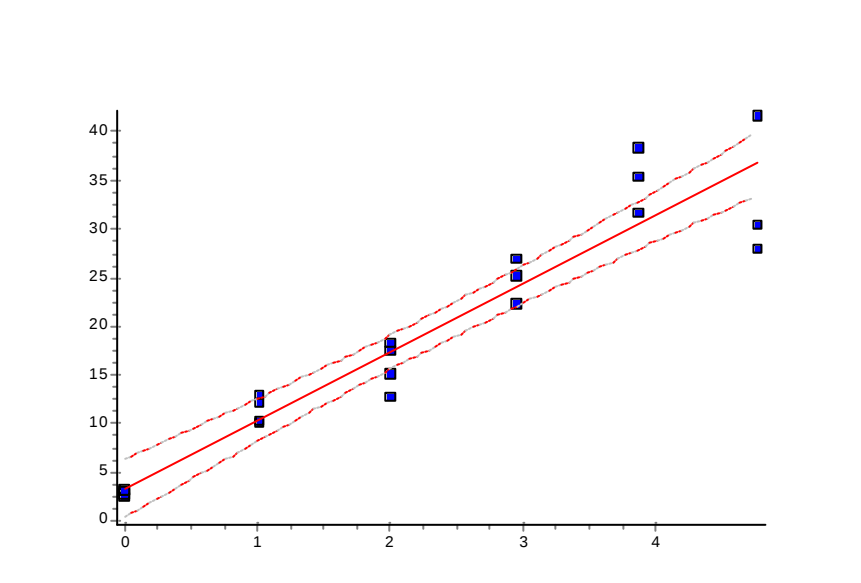


Abb. 7-2: Chlorid Standard zur EDXA. **Lineare Regression:** durchgezogene Linie; **95% Konfidenzintervall:** gepunktete Linie.

Kalium-Standard

Number of points = 18

Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval	
			from	to
Slope	14.839	1.182	12.333	17.345
Y intercept	0.9563	0.1029	0.7381	1.175
X intercept	-0.06445			

Correlation coefficient (r) = 0.9528.

r squared = 0.9078

Standard deviation of residuals from line ($Sy.x$) = 0.2440

Test: Is the slope significantly different from zero?

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

This result was obtained from the following ANOVA table.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Linear regression (Model)	1	9.386	9.386
Deviations from linearity (Residual)	16	0.9529	0.05956
Total	17	10.339	

$F = 157.61$

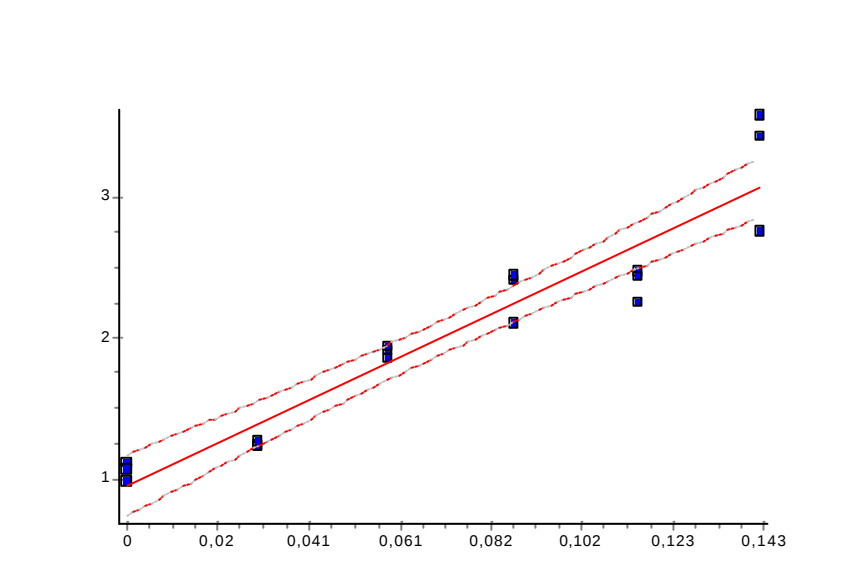


Abb. 7-3: Kalium Standard zur EDXA. **Lineare Regression:** durchgezogene Linie; **95% Konfidenzintervall:** gepunktete Linie. Ordinate: P/B-Quotient des Kalium-Standards. Abszisse: Kalium-Einwaage zur Standardlösung in mmol/g (0-100%).

Schwefel-Standard

Number of points = 18

Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval	
			from	to
Slope	12.769	1.264	10.090	15.449
Y intercept	1.667	0.4400	0.7345	2.600
X intercept	-0.1306			

Correlation coefficient (r) = 0.9298.

r squared = 0.8645

Standard deviation of residuals from line ($S_{y.x}$) = 1.043

Test: Is the slope significantly different from zero?

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

This result was obtained from the following ANOVA table.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Linear regression (Model)	1	111.09	111.09
Deviations from linearity (Residual)	16	17.411	1.088
Total	17	128.50	

F = 102.08

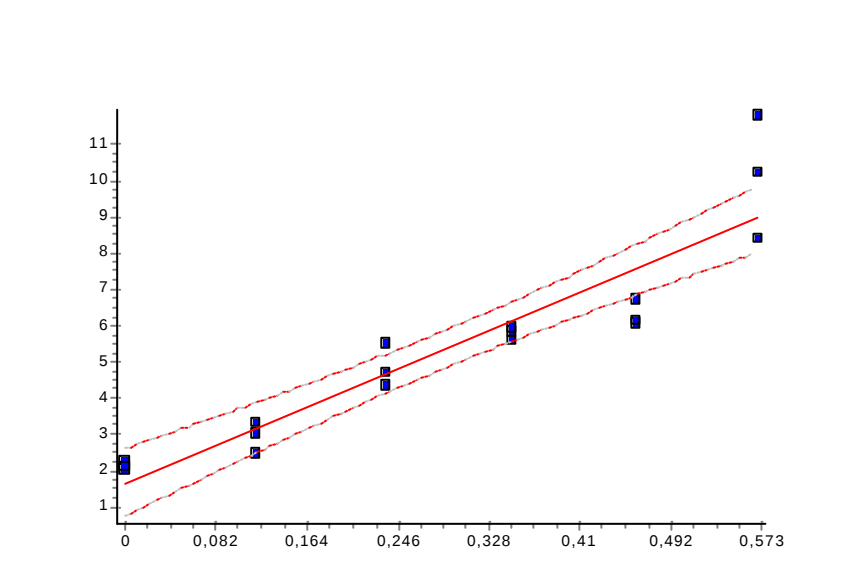


Abb. 7-4: Schwefel-Standard zur EDXA. **Lineare Regression:** durchgezogene Linie; **95% Konfidenzintervall:** gepunktete Linie. Ordinate: P/B-Quotient des Schwefel-Standards. Abszisse: Schwefel-Einwaage zur Standardlösung in mmol/g (0-100%).

Phosphat-Standard

Number of points = 18

Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval	
			from	to
Slope	11.228	1.070	8.960	13.495
Y intercept	0.9117	0.1862	0.5168	1.307
X intercept	-0.08120			

Correlation coefficient (r) = 0.9345.

r squared = 0.8732

Standard deviation of residuals from line ($Sy.x$) = 0.4416

Test: Is the slope significantly different from zero?

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

This result was obtained from the following ANOVA table.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Linear regression (Model)	1	21.486	21.486
Deviations from linearity (Residual)	16	3.120	0.1950
Total	17	24.606	

$F = 110.20$

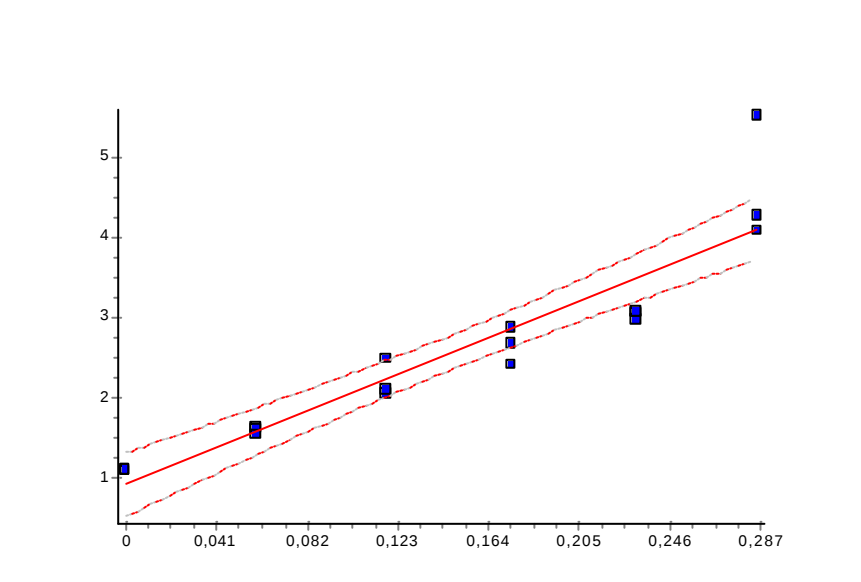


Abb. 7-5: Phosphat-Standard zur EDXA. **Lineare Regression:** durchgezogene Linie; **95% Konfidenzintervall:** gepunktete Linie. Ordinate: P/B-Quotient des Phosphat-Standards. Abszisse: Phosphat-Einwaage zur Standardlösung in mmol/g (0-100%).

Natrium-Standard

Number of points = 18

Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval from to	
Slope	3.860	0.4204	2.969	4.751
Y intercept	1.077	0.2564	0.5330	1.620
X intercept	-0.2789			

Correlation coefficient (r) = 0.9168.

r squared = 0.8405

Standard deviation of residuals from line ($S_{y.x}$) = 0.6078

Test: Is the slope significantly different from zero?

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

This result was obtained from the following ANOVA table.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Linear regression (Model)	1	31.143	31.143
Deviations from linearity (Residual)	16	5.911	0.3694
Total	17	37.054	

$F = 84.303$

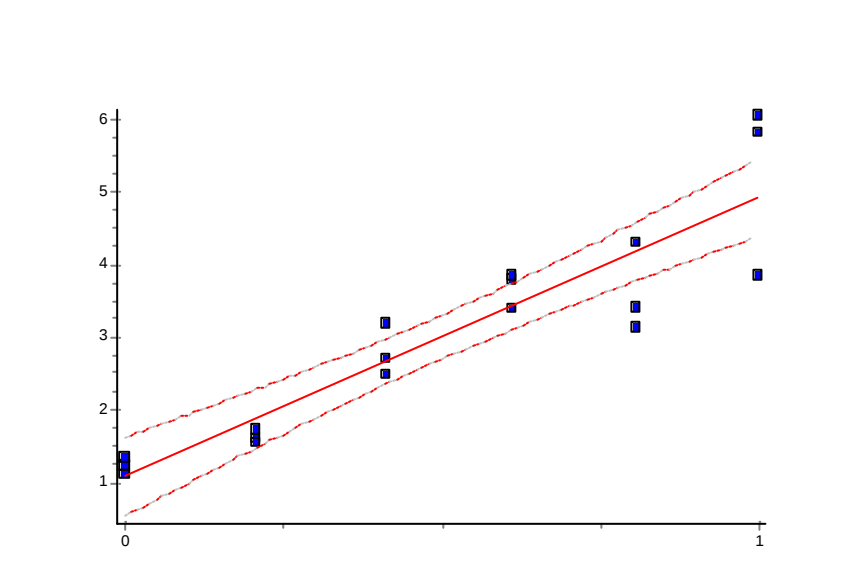


Abb. 7-6: Natrium-Standard zur EDXA. **Lineare Regression:** durchgezogene Linie; **95% Konfidenzintervall:** gepunktete Linie. Ordinate: P/B-Quotient des Natrium-Standards. Abszisse: Natrium-Einwaage zur Standardlösung in mmol/g (0-100%).

Calcium-Standard

Number of points = 21

Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval	
			from	to
Slope	9.319	0.5550	8.158	10.481
Y intercept	1.440	0.2933	0.8266	2.054
X intercept	-0.1546			

Correlation coefficient (r) = 0.9679.

r squared = 0.9369

Standard deviation of residuals from line ($Sy.x$) = 0.7886

Test: Is the slope significantly different from zero?

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

This result was obtained from the following ANOVA table.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Linear regression (Model)	1	175.33	175.33
Deviations from linearity (Residual)	19	11.817	0.6219
Total	20	187.15	

$F = 281.91$

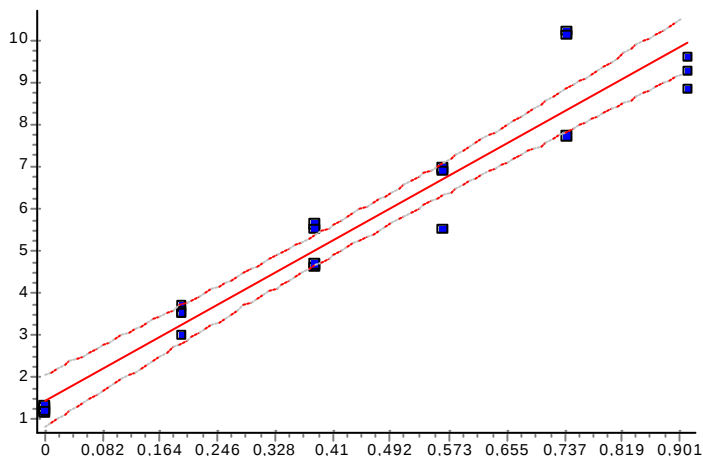


Abb. 7-7: Calcium-Standard zur EDXA. **Lineare Regression:** durchgezogene Linie; **95% Konfidenzintervall:** gepunktete Linie. Ordinate: P/B-Quotient des Calcium-Standards. Abszisse: Calcium-Einwaage in die Standardlösung in mmol/g (0-100%)

Jod-Standard

Number of points = 6

Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval from to	
Slope	0.8599	0.1999	0.3051	1.415
Y intercept	1.129	0.07731	0.9139	1.343
X intercept	-1.312			

Correlation coefficient (r) = 0.9068.

r squared = 0.8223

Standard deviation of residuals from line ($S_{y.x}$) = 0.1064

Test: Is the slope significantly different from zero?

The P value is 0.0126, considered significant.

This result was obtained from the following ANOVA table.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Linear regression (Model)	1	0.2096	0.2096
Deviations from linearity (Residual)	4	0.04528	0.01132
Total	5	0.2548	

$F = 18.510$

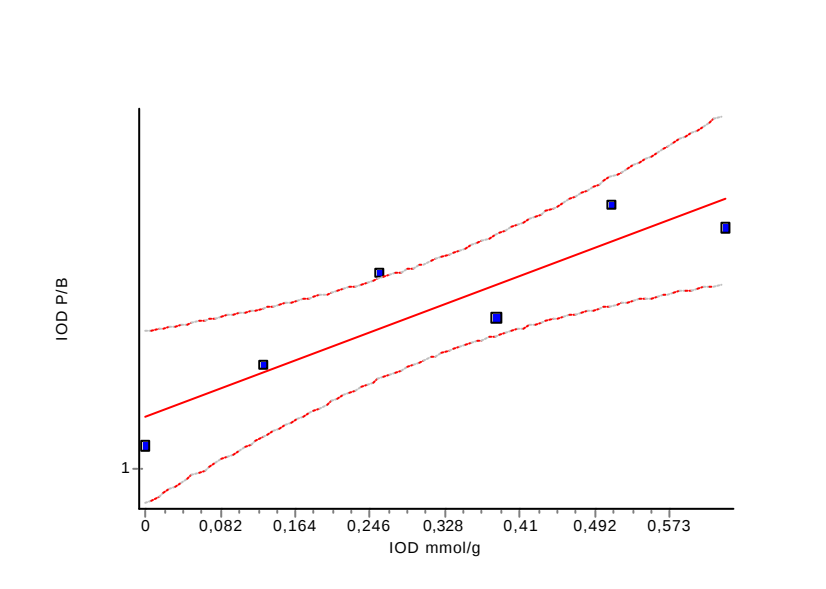


Abb. 7-8: Jod-Standard zur EDXA. **Lineare Regression:** durchgezogene Linie; **95% Konfidenzintervall:** gepunktete Linie. Ordinate: P/B-Quotient des Jod-Standards. Abszisse: Jod-Einwaage zur Standardlösung in mmol/g (0-100%).

EDXA-Ergebnisse des Jod-Standards

Jod-Standard	P/B Jod	Konzentration mol/kg
BETA0I	1,04	-0,04297994
BETA0II	1,129	0,042024833
BETA0III	0,988	-0,09264565
BETA20I	1,368	0,270296084
BETA20II	1,142	0,054441261
BETA40I	1,465	0,362941738
BETA40II	1,507	0,403056351
BETA60I	1,262	0,169054441
BETA60II	1,548	0,442215855
BETA60	1,313	0,217765043
BETA80II	1,43	0,329512894
BETA80III	1,67	0,558739255
BETA80I	1,867	0,746895893
BETA100I	1,599	0,490926457

Gleichung zur Errechnung der Konzentration aus P/B-Werten:

Konz = (PB-Intercept) / slope

EDXA – Gruppeneinteilung

Gruppe I: PVP-Jod		Gruppe II: 1% Ciprofloxacin	
I.1. Mikrotrepanation:	I.2. HH intakt:	II.1. Mikrotrepanation	II.2. HH intakt
464	470	462	472
465	471	463	473
468	613	466	614
469	71	467	615

EDXA-Ergebnisse der Gruppen I für Jod

Kaninchenaugen mit PVP-Jod getropft.

EDXA-Ergebnisse für Jod, HH intakt

Intakte HH Probennummer	HH-Schicht	Jod mol/kg TG	P/B Quotient
470A10	Epi	0,46991404	1,577
470A5	Epi	0,98471824	2,116
471A10	Epi	0,71251194	1,831
471A5	Epi	0,02578797	1,112
613A10	Epi	0,81375358	1,937
613A5	Epi	0,32378223	1,424
71A5	Epi	0,05444126	1,142
470A4	Subepi	0,02578797	1,112
470A9	Subepi	-0,03438395	1,049
471A4	Subepi	0,09551098	1,185
471A9	Subepi	-0,04775549	1,035

Intakte HH Probennummer	HH-Schicht	Jod mol/kg TG	P/B Quotient
613A4	Subepi	0,10888252	1,199
613A9	Subepi	0,0678128	1,156
470A3	Stroma	0,01241643	1,098
470A8	Stroma	0,05730659	1,145
471A3	Stroma	-0,11843362	0,961
471A8	Stroma	-0,10219675	0,978
613A3	Stroma	-0,08787011	0,993
613A8	Stroma	0,01623687	1,102
470A2	Vor-Desc.	0,02769819	1,114
470A7	Vor-Desc.	-0,07258835	1,009
471A2	Vor-Desc.	0,10124164	1,191
471A7	Vor-Desc.	-0,02578797	1,058
613A2	Vor-Desc.	-0,0286533	1,055
613A7	Vor-Desc.	-0,02196753	1,062
470A1	Desc.	-0,0773639	1,004
470A6	Desc.	-0,04680038	1,036
471A1	Desc.	-0,02769819	1,056
471A6	Desc.	-0,04106972	1,042
613A1	Desc.	-0,03342884	1,05
613A6	Desc.	-0,00382044	1,081

EDXA-Ergebnisse für Jod, HH trepaniert

Trepanierte HH Probennummer	HH-Schicht	Jod mol/kg TG	P/B Quotient
464B10	Epi	0,63228271	1,747
464B5	Epi	0,32378223	1,424
464C10	Epi	0,51289398	1,622
464C5	Epi	0,76504298	1,886
465B10	Epi	0,47277937	1,58
465B5	Epi	0,2139446	1,309
465C10	Epi	1,23209169	2,375
465C5	Epi	0,83285578	1,957
468B10	Epi	0,79178606	1,914
468B5	Epi	1,19102197	2,332
469A10	Epi	1,25310411	2,397
469A5	Epi	1,77936963	2,948
469B10	Epi	0,76313276	1,884
469B5	Epi	1,21298949	2,355
469B5	Epi	1,37058262	2,52
464B4	Subepi	-0,03724928	1,046
464B9	Subepi	-0,07640879	1,005
464C4	Subepi	-0,06112703	1,021
464C9	Subepi	-0,00191022	1,083
465B4	Subepi	0,01814709	1,104
465B9	Subepi	0,00191022	1,087
465C4	Subepi	0,03151862	1,118
465C9	Subepi	0,02387775	1,11

Trepanierte HH Probennummer	HH-Schicht	Jod mol/kg TG	P/B Quotient
468B4	Subepi	0,03056351	1,117
468B9	Subepi	-0,0286533	1,055
469A4	Subepi	-0,00859599	1,076
469A9	Subepi	-0,03247373	1,051
469B4	Subepi	-0,03342884	1,05
469B9	Subepi	-0,01241643	1,072
464BBL	Trep.li	1,09646609	2,233
464CBL	Trep.li	-0,00286533	1,082
465BBL	Trep.li	0,52340019	1,633
465CBL	Trep.li	0,23782235	1,334
468BBL	Trep.li	0,0296084	1,116
469ABL	Trep.li	0,62273161	1,737
469BBU	Trep.li	1,53486151	2,692
464BBR	Trep.re	0,48901624	1,597
464CBR	Trep.re	1,3887297	2,539
465BBR	Trep.re	1,13753582	2,276
465CBR	Trep.re	1,00382044	2,136
468BBR	Trep.re	0,40019102	1,504
464BBU	Trep.unten.	-0,03629417	1,047
464CBU	Trep.unten.	0,03724928	1,124
465BBU	Trep.unten.	1,19866285	2,34
465CBU	Trep.unten.	0,05444126	1,142
468BBU	Trep.unten.	-0,0191022	1,065
469ABU	Trep.unten.	0,00095511	1,086
469BBL	Trep.unten.	0,06399236	1,152
464B3	Stroma	0,03342884	1,12
464B8	Stroma	-0,03438395	1,049
464C3	Stroma	0,08213945	1,171
464C8	Stroma	-0,08309456	0,998
465B3	Stroma	-0,09169054	0,989
465B8	Stroma	-0,04489016	1,038
465C3	Stroma	-0,02101242	1,063
465C8	Stroma	-0,04393505	1,039
468B3	Stroma	-0,01719198	1,067
468B8	Stroma	0,01050621	1,096
469A3	Stroma	-0,0296084	1,054
469A8	Stroma	-0,0095511	1,075
469B3	Stroma	-0,05062082	1,032
469B8	Stroma	0,06112703	1,149
464B2	Vor-Desc.	-0,07449857	1,007
464B7	Vor-Desc.	0,01146132	1,097
464C2	Vor-Desc.	0,0296084	1,116
464C7	Vor-Desc.	-0,04489016	1,038
465B2	Vor-Desc.	-0,04680038	1,036
465B7	Vor-Desc.	0,00191022	1,087
465C2	Vor-Desc.	0,03629417	1,123
465C7	Vor-Desc.	-0,02101242	1,063

Trepanierte HH Probennummer	HH-Schicht	Jod mol/kg TG	P/B Quotient
468B2	Vor-Desc.	-0,03533906	1,048
468B7	Vor-Desc.	0,06972302	1,158
469A2	Vor-Desc.	0,0286533	1,115
469A7	Vor-Desc.	-0,11174785	0,968
469B2	Vor-Desc.	0,086915	1,176
469B7	Vor-Desc.	-0,02578797	1,058
464B1	Desc.	0,10315186	1,193
464B6	Desc.	0,00573066	1,091
464C1	Desc.	-0,01623687	1,068
464C6	Desc.	0,03724928	1,124
465B1	Desc.	0,00573066	1,091
465B6	Desc.	-0,04489016	1,038
465C1	Desc.	0,01050621	1,096
465C6	Desc.	0,01146132	1,097
468B1	Desc.	-0,08787011	0,993
468B6	Desc.	-0,00668577	1,078
469A1	Desc.	0,06017192	1,148
469A6	Desc.	0,01050621	1,096
469B1	Desc.	-0,06494747	1,017
469B6	Desc.	0,16714422	1,26

EDXA-Ergebnisse der Gruppe I. (PVP-Jod)

Tabelle: P/B-Werte für Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca. Gruppe I (PVP-Jod)

Dateiname	Lokalisation	Backgr.	P/B Na	P/B Mg	P/B Si	P/B P	P/B S	P/B Cl	P/B K	P/B Ca
464C5	Epithel	180997	3,85	1,111	1,139	3,225	3,395	3,162	1,159	1,423
464C10	Epithel	179415	4,302	1,131	1,044	4,612	4,215	3,849	1,235	1,706
464B5	Epithel	184462	3,301	1,074	0,963	2,65	3,951	3,477	1,32	1,293
464B10	Epithel	183619	3,696	1,088	1,248	3,703	4,355	3,649	1,302	1,411
465B5	Epithel	196106	4,564	1,052	1,046	1,91	2,961	5,639	1,385	1,26
465B10	Epithel	197064	4,484	1,053	1,077	2,658	3,843	5,825	1,386	1,549
465C5	Epithel	147943	4,414	1,158	1,072	2,429	2,883	5,247	1,556	1,785
465C10	Epithel	157203	4,406	1,048	0,945	1,888	2,589	5,595	1,616	1,049
468B5	Epithel	187808	3,728	1,067	1,171	2,235	3,355	4,605	1,9	1,773
468B10	Epithel	151089	3,162	1,000	1,313	3,308	4,078	4,213	1,855	1,331
469A5	Epithel	161651	4,544	1,077	1,025	3,035	3,824	6,87	2,035	1,539
469A10j	Epithel	116282	3,435	1,053	0,99	1,702	3,294	4,334	1,624	1,223
469B5	Epithel	179207	4,059	1,096	1,08	4,343	3,606	4,812	1,571	2,711
469B10	Epithel	169998	3,501	1,048	1,005	3,375	4,065	3,66	1,245	1,27
470A5,	Epithel	160311	4,46	1,139	1,525	2,474	3,404	5,113	1,725	1,438
470A10	Epithel	153805	4,205	1,056	1,004	4,055	4,304	4,263	1,365	1,506
471A5,	Epithel	153041	3,331	1,003	0,987	2,811	3,658	3,634	1,496	1,287
471A10	Epithel	135946	3,509	1,037	1,168	2,627	3,358	3,443	1,423	1,226
613A5	Epithel	139724	3,874	1,013	0,988	3,336	3,659	3,326	1,233	1,358
613A10	Epithel	164053	4,213	1,074	1,021	3,678	4,21	4,677	1,202	1,409
71A5	Epithel	131209	4,245	1,079	1,096	1,771	3,804	5,281	1,327	1,461
71A10	Epithel	132630	3,343	1,068	1,056	2,198	3,56	2,467	1,097	1,267
464CBL	Trepan li	170405	2,982	1,012	1,132	1,343	2,244	2,856	1,175	1,24
464BBL	Trepan li	135071	3,721	1,031	1,06	1,9	3,366	5,705	1,124	1,8
465BBL	Trepan li	196463	3,504	1,059	1,012	2,458	2,87	5,114	1,45	1,486

Dateiname	Lokalisation	Backgr.	P/B Na	P/B Mg	P/B Si	P/B P	P/B S	P/B Cl	P/B K	P/B Ca
465CBL	Trepan li	60344	4,143	1,153	0,931	1,112	2,535	6,363	1,735	1,149
468BBL	Trepan li	156002	3,621	0,991	1,037	1,067	2,673	3,929	1,725	1,14
469ABL	Trepan li	131435	4,182	1,104	1,003	1,731	2,768	6,214	1,844	1,246
469BBL	Trepan li	161454	3,463	1,014	1,037	1,186	2,893	3,946	1,4	1,149
464CBR	Trepan re	184306	4,544	1,083	1,824	1,26	3,023	4,403	1,215	1,434
464BBR	Trepan re	124696	3,661	1,074	1,022	1,467	3,069	5,03	1,211	1,338
465BBR	Trepan re	193150	5,488	1,032	0,939	1,239	3,374	7,076	1,46	1,104
465CBR	Trepan re	127644	3,77	0,996	1,015	1,148	2,985	6,897	2	1,201
468BBR	Trepan re	151399	3,592	1,051	1,089	1,173	2,681	3,938	1,645	1,129
469ABR	Trepan re	95812	4,103	1,022	1,054	1,176	2,947	6,035	1,804	1,118
469BBR	Trepan re	169519	3,298	1,052	1,022	1,049	2,452	2,964	1,356	1,057
464CBU	Trepan u.	177150	4,103	1,006	1,655	1,197	3,075	4,048	1,137	1,147
464BBU	Trepan u.	126677	2,94	0,99	1,115	1,184	2,254	3,165	1,228	1,364
465BBU	Trepan u.	187745	4,153	1,059	1,067	2,129	3,123	5,945	1,458	1,318
465CBU	Trepan u.	57381	3,377	0,876	1,101	1,306	2,779	5,248	1,769	1,047
468BBU	Trepan u.	150347	3,969	1,004	1,097	1,304	3,133	4,044	1,662	1,078
469ABU	Trepan u.	102193	2,729	0,991	0,946	1,127	2,216	3,912	1,516	1,117
469BBU	Trepan u.	173891	2,462	0,98	0,99	1,076	1,991	2,611	1,268	1,118
464C4	Subepithel	173845	2,404	0,997	1,032	1,076	1,848	2,242	1,183	1,147
464C9	Subepithel	174694	3,004	1,037	1,01	1,052	2,835	3,215	1,199	1,247
464B4	Subepithel	178520	3,364	1,06	0,998	1,313	3,73	3,806	1,239	1,241
464B9	Subepithel	182408	3,31	1,047	0,996	1,134	3,481	3,587	1,221	1,091
465B4	Subepithel	198740	2,677	1,008	1,053	1,072	2,002	2,806	1,221	1,016
465B9	Subepithel	199241	2,916	0,947	1,018	1,075	2,399	3,946	1,353	1,106
465C4	Subepithel	157866	4,617	1,054	0,978	1,406	2,82	6,271	1,732	1,223
465C9	Subepithel	151818	3,039	1,013	1,018	1,213	2,239	4,208	1,469	1,219
468B4	Subepithel	156025	3,854	1,039	1,09	1,26	3,364	4,569	1,99	1,353
468B9	Subepithel	146271	3,903	1,038	1,149	1,404	4,126	4,896	2,11	1,219
469A4	Subepithel	146396	4,392	1,007	0,986	1,314	3,47	6,265	2,133	1,211

Dateiname	Lokalisation	Backgr.	P/B Na	P/B Mg	P/B Si	P/B P	P/B S	P/B Cl	P/B K	P/B Ca
469A9	Subepithel	112357	3,668	1,055	1,024	1,272	3,619	4,617	1,494	1,159
469B4	Subepithel	163975	3,087	1,007	1,001	1,194	2,42	3,296	1,373	1,138
469B9	Subepithel	162029	3,341	1,005	0,991	1,233	3,045	3,631	1,318	1,147
470A4	Subepithel	149334	4,204	1,036	0,968	1,261	3,298	5,325	1,572	1,279
470A9	Subepithel	147657	3,065	1,032	1,009	1,091	2,394	3,106	1,18	1,17
471A4	Subepithel	138368	4,142	1,017	1,142	1,457	4,037	4,778	1,485	1,246
471A9	Subepithel	144687	3,691	1,063	1,054	1,4	3,694	4,183	1,484	1,218
613A4	Subepithel	162479	3,94	1,046	0,962	1,257	3,849	4,497	1,348	1,23
613A9	Subepithel	149895	2,387	1,055	1,046	1,2	1,968	2,135	1,226	1,179
71A4,	Subepithel	131124	2,354	1,035	1,004	1,027	1,877	2,24	1,065	1,143
71A9,	Subepithel	128755	3,781	1,061	0,934	1,409	3,677	3,000	1,217	1,355
464C3	Stroma	195887	4,433	1,114	4,534	1,103	3,357	3,971	1,156	1,869
464C8	Stroma	181252	4,173	1,083	1,063	1,132	3,926	4,817	1,266	1,191
464B3	Stroma	184009	3,387	1,024	1,087	1,163	3,188	3,708	1,202	1,172
464B8	Stroma	180855	2,936	1,075	1,034	1,069	2,521	3,258	1,166	1,055
465B3	Stroma	201155	3,669	1,026	0,986	1,068	2,756	4,86	1,301	1,111
465B8	Stroma	203733	4,072	1,08	1,008	1,118	2,941	5,661	1,358	1,165
465C3	Stroma	154355	5,344	1,011	1,031	1,246	3,212	9,288	1,977	1,231
465C8	Stroma	158789	4,723	1,006	0,964	1,038	2,741	6,475	1,672	1,098
468B3	Stroma	155516	3,33	1,033	1,083	1,318	3,011	3,485	1,791	1,185
468B8	Stroma	147879	3,47	1,13	1,201	1,226	3,642	3,642	1,997	1,164
469A3	Stroma	148912	4,458	1,02	1,042	1,313	3,306	5,742	1,676	1,1
469A8	Stroma	118048	3,969	0,976	1,027	1,294	3,488	5,737	1,602	1,127
469B3	Stroma	172076	3,671	1,014	0,957	1,139	2,429	4,145	1,441	1,118
469B8	Stroma	169834	3,614	1,061	0,96	1,227	2,439	4,263	1,328	1,141
470A3	Stroma	143771	4,262	0,993	0,991	1,123	2,563	5,501	1,477	1,129
470A8	Stroma	157064	4,003	0,977	1,01	1,272	3,605	5,568	1,435	1,251
471A3	Stroma	150411	4,259	1,034	0,961	1,16	3,498	5,428	1,405	1,065
471A8	Stroma	143769	4,348	1,029	1,015	1,275	3,611	5,356	1,323	1,187

Dateiname	Lokalisation	Backgr.	P/B Na	P/B Mg	P/B Si	P/B P	P/B S	P/B Cl	P/B K	P/B Ca
613A3	Stroma	157934	2,227	1,01	0,986	0,987	1,911	2,453	1,181	1,001
613A8	Stroma	156564	3,228	1,046	1,008	0,999	2,423	3,519	1,213	1,114
71A3	Stroma	127792	2,94	1,001	1,04	1,278	2,559	3,17	1,294	1,15
71A8	Stroma	128511	2,98	0,988	1,000	1,064	2,458	2,945	1,185	1,099
464C2	Vor-Desc.	173730	4,085	0,988	1,202	1,191	3,338	4,183	1,19	1,161
464C7	Vor-Desc.	176099	2,428	1,045	1,027	1,036	1,934	2,151	1,074	0,952
464B2	Vor-Desc.	186401	4,306	1,009	1,049	1,228	3,736	5,64	1,261	1,027
464B7	Vor-Desc.	184875	4,411	0,995	1,05	1,156	3,313	5,207	1,258	1,09
465B2	Vor-Desc.	204473	5,831	1,022	0,991	1,226	2,917	7,723	1,52	1,092
465B7	Vor-Desc.	194208	7,493	1,005	0,926	1,302	3,848	12,831	1,843	1,264
465C2	Vor-Desc.	153075	8,549	1,065	1,036	1,347	4,253	12,239	2,51	1,306
465C7	Vor-Desc.	154942	5,567	1,016	1,021	1,159	2,761	7,728	1,848	1,148
468B2	Vor-Desc.	160874	4,366	1,034	1,168	1,17	3,08	4,512	2,044	1,34
468B7	Vor-Desc.	146813	4,039	1,104	1,128	1,396	4,006	4,461	2,112	1,251
469A2	Vor-Desc.	146105	3,334	1,029	0,979	1,278	2,243	3,748	1,47	1,198
469A7	Vor-Desc.	121433	3,277	1,063	1,035	1,232	2,633	3,935	1,387	1,071
469B2	Vor-Desc.	162995	3,193	1,045	0,959	1,078	2,464	3,513	1,312	1,217
469B7	Vor-Desc.	172114	4,798	1,04	0,953	1,451	3,264	5,806	1,409	1,139
470A2	Vor-Desc.	143566	5,391	1,115	1,016	1,23	3,194	6,36	1,343	1,221
470A7	Vor-Desc.	143861	4,893	1,054	1,016	1,092	3,897	5,589	1,313	1,055
471A2	Vor-Desc.	144150	3,771	1,064	0,999	1,151	2,564	4,335	1,288	1,239
471A7	Vor-Desc.	150718	4,692	1,044	0,927	1,066	3,139	5,954	1,426	1,171
613A2	Vor-Desc.	159571	5,564	1,052	1,039	1,359	4,271	6,888	1,4	1,249
613A7	Vor-Desc.	132280	5,547	0,994	1,058	1,547	4,246	7,66	1,353	1,136
71A2	Vor-Desc.	135494	5,181	1,034	0,92	1,169	3,455	6,007	1,313	1,182
71A7	Vor-Desc.	145815	4,353	1,096	1,487	0,93	3,016	3,84	1,31	1,609
464C1	Descemet	175731	4,417	1,036	1,109	1,111	3,992	4,724	1,2	1,252
464C6	Descemet	171977	4,401	1,05	1,038	1,448	4,561	6,074	1,329	1,372
464B1	Descemet	113045	4,369	1,023	1,086	1,368	4,723	6,326	1,387	1,347

Dateiname	Lokalisation	Backgr.	P/B Na	P/B Mg	P/B Si	P/B P	P/B S	P/B Cl	P/B K	P/B Ca
464B6	Descemet	175183	5,134	1,007	1,047	1,477	5,14	7,635	1,424	1,313
465B1	Descemet	186779	8,026	1,058	1,016	2,318	4,095	12,648	1,757	1,254
465B6	Descemet	211977	8,041	1,055	1,032	1,997	3,946	14,871	1,888	1,22
465C1	Descemet	178214	8,313	1,081	0,981	2,061	4,4	12,537	2,525	1,449
465C6	Descemet	166020	6,974	1,103	0,968	1,529	4,235	10,504	2,356	1,365
468B1	Descemet	158195	4,649	0,999	1,022	2,251	3,943	5,712	2,446	1,46
468B6	Descemet	150816	3,968	1,093	1,000	1,653	4,174	4,273	2,265	1,405
469A1	Descemet	143954	4,267	0,994	0,954	1,575	3,378	5,485	1,713	1,215
469A6	Descemet	104931	4,698	1,059	0,956	3,000	4,056	6,127	1,69	1,201
469B1	Descemet	167751	4,311	1,029	0,946	1,277	4,312	6,219	1,481	1,148
469B6	Descemet	174295	5,619	1,042	0,927	1,337	4,491	7,901	1,621	1,411
470A1	Descemet	160994	5,175	1,046	0,986	1,477	3,900	7,707	1,462	1,225
470A6	Descemet	163297	3,463	1,022	0,926	1,275	3,408	4,455	1,304	1,151
471A1	Descemet	124773	4,925	1,139	1,03	1,747	3,347	5,544	1,39	1,224
471A6	Descemet	126177	4,418	1,003	1,084	2,169	3,533	5,426	1,28	1,161
613A1	Descemet	166151	4,265	1,109	0,997	1,606	3,036	4,564	1,22	1,206
613A6	Descemet	169608	4,982	1,039	0,988	1,54	4,433	6,679	1,421	1,198
71A1	Descemet	196767	5,612	1,087	1,028	1,45	4,583	7,761	1,376	1,338
71A6	Descemet	116893	4,39	1,012	0,957	1,338	4,504	5,005	1,519	1,274

EDXA-Ergebnisse der Gruppen I (PVP-Jod).

Konzentrationen in **mol/kg** von Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca.

Dateiname	Lokalisation	Konz. Na	Konz Mg	Konz P	Konz S	Konz Cl	Konz K	Konz Ca
464C5	Epithel	0,683058766	-0,00048031	0,178359964	0,115819624	0,043083593	0,014366255	-0,00334773
464C10	Epithel	0,794197197	0,009125841	0,29085895	0,176042891	0,089622002	0,019528597	0,027213823
464B5	Epithel	0,54806983	-0,01825168	0,131721956	0,156653937	0,064422165	0,025302269	-0,01738661
464B10	Epithel	0,645193017	-0,01152738	0,217130343	0,186324912	0,076073703	0,024079609	-0,00464363
465B5	Epithel	0,858618146	-0,02881844	0,071700868	0,083945358	0,210879285	0,02971743	-0,02095032
465B10	Epithel	0,838947627	-0,02833814	0,132370833	0,148722092	0,223479203	0,029785355	0,010259179
465C5	Epithel	0,821735923	0,02209414	0,113796739	0,078216804	0,184324617	0,041332699	0,03574514
465C10	Epithel	0,819768871	-0,03073967	0,069916457	0,056624559	0,207898659	0,045408233	-0,0437365
468B5	Epithel	0,653061224	-0,02161383	0,098061481	0,112881904	0,140834575	0,06469909	0,034449244
468B10	Epithel	0,513892304	-0,05379443	0,185092059	0,165981199	0,114279908	0,06164244	-0,01328294
469A5	Epithel	0,853700516	-0,01681076	0,162949144	0,147326675	0,294269069	0,07386904	0,009179266
469A10	Epithel	0,581017949	-0,02833814	0,054830075	0,10840188	0,122476629	0,045951637	-0,024946
469B5	Epithel	0,734447996	-0,00768492	0,269040474	0,131316099	0,154857065	0,042351583	0,13574514
469B10	Epithel	0,597246127	-0,03073967	0,190526401	0,165026439	0,076818859	0,020207852	-0,01987041
470A5	Epithel	0,833046472	0,0129683	0,11744667	0,116480611	0,175247256	0,052812118	-0,00172786
470A10	Epithel	0,770346693	-0,02689721	0,245680915	0,182579318	0,117666983	0,028358919	0,005615551
471A5	Epithel	0,555446275	-0,05235351	0,144780599	0,135135135	0,07505758	0,037257166	-0,01803456
471A10	Epithel	0,599213179	-0,03602305	0,129856436	0,113102233	0,062118954	0,032298601	-0,02462203
613A5	Epithel	0,688959921	-0,04755043	0,187363128	0,135208578	0,054193199	0,019392746	-0,01036717
613A10	Epithel	0,772313745	-0,01825168	0,215102604	0,175675676	0,145711963	0,017287053	-0,00485961
71A5	Epithel	0,780181952	-0,01585014	0,060426636	0,145857814	0,186627828	0,025777748	0,00075594
71A10	Epithel	0,558396853	-0,02113353	0,095060427	0,12793772	-0,00399675	0,01015487	-0,02019438
464CBL	Trepan li	0,469633637	-0,04803074	0,025711737	0,031286722	0,022354694	0,015453063	-0,02311015
464BBL	Trepan li	0,651340054	-0,0389049	0,070889772	0,113689777	0,215350224	0,01198886	0,037365011
465BBL	Trepan li	0,597983772	-0,02545629	0,116148917	0,077262045	0,175314998	0,034132591	0,003455724
465CBL	Trepan li	0,755102041	0,019692603	0,006975424	0,052658637	0,25992413	0,053491373	-0,03293737

Dateiname	Lokalisation	Konz. Na	Konz Mg	Konz P	Konz S	Konz Cl	Konz K	Konz Ca
468BBL	Trepan li	0,626751906	-0,0581172	0,003325493	0,062793772	0,095041322	0,052812118	-0,03390929
469ABL	Trepan li	0,764691419	-0,00384246	0,057182253	0,069770858	0,249830646	0,060895259	-0,0224622
469BBL	Trepan li	0,587902631	-0,04707012	0,012977533	0,078951234	0,096192928	0,030736313	-0,03293737
464CBR	Trepan re	0,853700516	-0,01392891	0,018979641	0,088498825	0,127150793	0,018170086	-0,00215983
464BBR	Trepan re	0,636587165	-0,01825168	0,035769324	0,091877203	0,169624712	0,017898383	-0,012527
465BBR	Trepan re	1,085812638	-0,03842459	0,01727634	0,114277321	0,308223818	0,034811846	-0,03779698
465CBR	Trepan re	0,663388247	-0,05571566	0,009895369	0,085707991	0,29609809	0,071491645	-0,02732181
468BBR	Trepan re	0,619621343	-0,02929875	0,011923108	0,063381316	0,095650996	0,047378074	-0,03509719
469ABR	Trepan re	0,745266781	-0,04322767	0,012166437	0,082917156	0,237704918	0,058178237	-0,0362851
469BBR	Trepan re	0,547332186	-0,02881844	0,00186552	0,046562867	0,029670776	0,027747589	-0,04287257
464CBU	Trepan u.	0,745266781	-0,05091258	0,013869738	0,092317861	0,103102561	0,012871892	-0,03315335
464BBU	Trepan u.	0,459306614	-0,0585975	0,012815313	0,032021152	0,043286818	0,019053118	-0,00971922
465BBU	Trepan u.	0,757560856	-0,02545629	0,089463866	0,095843126	0,231608183	0,034675995	-0,01468683
465CBU	Trepan u.	0,566756823	-0,11335255	0,022710682	0,070578731	0,184392359	0,055800842	-0,04395248
468BBU	Trepan u.	0,712318662	-0,0518732	0,022548463	0,096577556	0,102831595	0,048532808	-0,04060475
469ABU	Trepan u.	0,407425621	-0,0581172	0,008192067	0,029230317	0,093889717	0,038615677	-0,03639309
469BBU	Trepan u.	0,341775264	-0,06340058	0,004055479	0,01270564	0,005758027	0,02177014	-0,0362851
464C4	Subepithel	0,327514138	-0,05523535	0,004055479	0,00220329	-0,01923859	0,015996468	-0,03315335
464C9	Subepithel	0,475043029	-0,03602305	0,002108849	0,074691539	0,046673892	0,017083277	-0,02235421
464B4	Subepithel	0,563560364	-0,02497598	0,023278449	0,140423032	0,086709118	0,019800299	-0,02300216
464B9	Subepithel	0,550282764	-0,03121998	0,008759835	0,122135723	0,07187373	0,018577639	-0,03920086
465B4	Subepithel	0,394639784	-0,04995197	0,003731041	0,013513514	0,01896762	0,018577639	-0,04730022
465B9	Subepithel	0,453405459	-0,07925072	0,003974369	0,042670388	0,096192928	0,027543812	-0,03758099
465C4	Subepithel	0,871649865	-0,02785783	0,03082164	0,073589894	0,253691912	0,053287597	-0,024946
465C9	Subepithel	0,483648881	-0,04755043	0,015167491	0,030919506	0,1139412	0,035423176	-0,02537797
468B4	Subepithel	0,684042292	-0,03506244	0,018979641	0,113542891	0,138395881	0,07081239	-0,01090713
468B9	Subepithel	0,696090484	-0,03554275	0,030659421	0,169506463	0,160547351	0,078963456	-0,02537797
469A4	Subepithel	0,816326531	-0,05043228	0,023359559	0,12132785	0,253285463	0,080525744	-0,0262419
469A9	Subepithel	0,638308335	-0,02737752	0,019952956	0,132270858	0,141647473	0,037121315	-0,03185745
469B4	Subepithel	0,495451193	-0,05043228	0,013626409	0,044212691	0,052160954	0,028902323	-0,03412527

Dateiname	Lokalisation	Konz. Na	Konz Mg	Konz P	Konz S	Konz Cl	Konz K	Konz Ca
469B9	Subepithel	0,55790509	-0,05139289	0,016789683	0,090114571	0,074854356	0,025166418	-0,03315335
470A4	Subepithel	0,770100811	-0,03650336	0,019060751	0,108695652	0,189608454	0,042419508	-0,01889849
470A9	Subepithel	0,4900418	-0,03842459	0,005272123	0,042303173	0,039290069	0,015792691	-0,03066955
471A4	Subepithel	0,754856159	-0,0456292	0,034958229	0,162970035	0,152553854	0,036509985	-0,0224622
471A9	Subepithel	0,64396361	-0,02353506	0,030334983	0,137779083	0,112247663	0,03644206	-0,02548596
613A4	Subepithel	0,705188099	-0,03170029	0,018736313	0,14916275	0,133518493	0,027204184	-0,02419006
613A9	Subepithel	0,323334153	-0,02737752	0,014113067	0,011016451	-0,02648693	0,018917267	-0,02969762
71A4	Subepithel	0,315220064	-0,03698367	8,11096E-05	0,004333137	-0,01937407	0,007981253	-0,03358531
71A9	Subepithel	0,666092943	-0,02449568	0,031064969	0,136530552	0,03210947	0,018305937	-0,01069114
464C3	Stroma	0,826407672	0,000960615	0,006245438	0,11302879	0,097886465	0,014162478	0,044816415
464C8	Stroma	0,762478485	-0,01392891	0,008597615	0,154817861	0,155195773	0,021634289	-0,02840173
464B3	Stroma	0,569215638	-0,04226705	0,011112012	0,100616921	0,080070451	0,017287053	-0,03045356
464B8	Stroma	0,458323088	-0,01777137	0,003487712	0,051630435	0,049586777	0,014841733	-0,04308855
465B3	Stroma	0,638554217	-0,04130644	0,003406602	0,068889542	0,158108657	0,024011683	-0,03704104
465B8	Stroma	0,737644455	-0,01536984	0,007462081	0,082476498	0,212369598	0,02788344	-0,0312095
465C3	Stroma	1,050405704	-0,04851105	0,017844107	0,102379553	0,458068012	0,069929357	-0,02408207
465C8	Stroma	0,897713302	-0,05091258	0,000973315	0,067787897	0,267511177	0,049212064	-0,03844492
468B3	Stroma	0,555200393	-0,03794428	0,023683997	0,087617509	0,064964097	0,057295204	-0,02904968
468B8	Stroma	0,589623801	0,008645533	0,016221916	0,133960047	0,075599512	0,071287868	-0,03131749
469A3	Stroma	0,832554709	-0,04418828	0,023278449	0,109283196	0,217856659	0,049483766	-0,03822894
469A8	Stroma	0,712318662	-0,06532181	0,021737367	0,122649824	0,217517951	0,044457275	-0,03531317
469B3	Stroma	0,63904598	-0,04707012	0,009165382	0,044873678	0,109673486	0,033521261	-0,0362851
469B8	Stroma	0,625030735	-0,02449568	0,016303025	0,045608108	0,117666983	0,025845673	-0,0338013
470A3	Stroma	0,784361938	-0,05715658	0,007867629	0,054715041	0,201530958	0,035966581	-0,03509719
470A8	Stroma	0,720678633	-0,0648415	0,019952956	0,131242656	0,206069638	0,033113707	-0,02192225
471A3	Stroma	0,783624293	-0,03746398	0,010868684	0,123384254	0,196585828	0,031075941	-0,04200864
471A8	Stroma	0,805507745	-0,03986551	0,020196285	0,131683314	0,191708441	0,025506045	-0,02883369
613A3	Stroma	0,283993115	-0,04899135	-0,00316327	0,0068302	-0,00494513	0,015860617	-0,04892009
613A8	Stroma	0,530120482	-0,03170029	-0,00218996	0,04443302	0,067267308	0,018034234	-0,03671706
71A3	Stroma	0,459306614	-0,05331412	0,020439614	0,054421269	0,043625525	0,023536204	-0,03282937

Dateiname	Lokalisation	Konz. Na	Konz Mg	Konz P	Konz S	Konz Cl	Konz K	Konz Ca
71A8	Stroma	0,469141874	-0,05955812	0,003082164	0,047003525	0,028383688	0,016132319	-0,03833693
464C2	Vor-Desc.	0,740840915	-0,05955812	0,013383081	0,111633373	0,112247663	0,016471947	-0,03164147
464C7	Vor-Desc.	0,333415294	-0,0321806	0,000811096	0,008519389	-0,02540306	0,008592583	-0,05421166
464B2	Vor-Desc.	0,795180723	-0,04947166	0,016384135	0,14086369	0,210947026	0,021294661	-0,04611231
464B7	Vor-Desc.	0,820998279	-0,05619597	0,010544245	0,109797297	0,181614957	0,021090884	-0,03930886
465B2	Vor-Desc.	1,170149988	-0,04322767	0,016221916	0,080713866	0,352052567	0,038887379	-0,03909287
465B7	Vor-Desc.	1,578805016	-0,05139289	0,022386244	0,149089307	0,698076141	0,060827333	-0,02051836
465C2	Vor-Desc.	1,838455864	-0,02257445	0,026036175	0,178833725	0,657973174	0,106133677	-0,01598272
465C7	Vor-Desc.	1,105237276	-0,04610951	0,010787574	0,069256757	0,352391275	0,061166961	-0,03304536
468B2	Vor-Desc.	0,809933612	-0,03746398	0,011679779	0,092685076	0,134534616	0,07448037	-0,01231102
468B7	Vor-Desc.	0,729530366	-0,00384246	0,030010544	0,160693302	0,131079799	0,079099307	-0,02192225
469A2	Vor-Desc.	0,556183919	-0,03986551	0,020439614	0,031213278	0,082780111	0,035491102	-0,02764579
469A7	Vor-Desc.	0,542168675	-0,02353506	0,016708573	0,059856052	0,095447771	0,029853281	-0,04136069
469B2	Vor-Desc.	0,52151463	-0,0321806	0,004217698	0,047444183	0,066860859	0,024758864	-0,02559395
469B7	Vor-Desc.	0,916154414	-0,03458213	0,034471571	0,10619859	0,222192115	0,031347643	-0,03401728
470A2	Vor-Desc.	1,061962134	0,001440922	0,016546354	0,101057579	0,259720905	0,026864556	-0,02516199
470A7	Vor-Desc.	0,939513155	-0,02785783	0,005353232	0,152688014	0,20749221	0,02482679	-0,04308855
471A2	Vor-Desc.	0,663634128	-0,02305476	0,010138697	0,054788484	0,122544371	0,023128651	-0,02321814
471A7	Vor-Desc.	0,890090976	-0,0326609	0,003244383	0,097018214	0,232217857	0,032502377	-0,03056156
613A2	Vor-Desc.	1,104499631	-0,02881844	0,02700949	0,180155699	0,295488416	0,030736313	-0,02213823
613A7	Vor-Desc.	1,100319646	-0,05667627	0,042258091	0,178319624	0,347784853	0,027543812	-0,03434125
71A2	Vor-Desc.	1,010327022	-0,03746398	0,01159867	0,120226204	0,235808156	0,02482679	-0,02937365
71A7	Vor-Desc.	0,806737153	-0,00768492	-0,00778652	0,087984724	0,089012329	0,024623013	0,016738661
464C1	Descemet	0,822473568	-0,03650336	0,006894314	0,1596651	0,148895814	0,017151202	-0,02181425
464C6	Descemet	0,818539464	-0,02977906	0,034228242	0,201454172	0,240346836	0,025913599	-0,00885529
464B1	Descemet	0,810671256	-0,04274736	0,027739476	0,213351939	0,257417694	0,029853281	-0,01155508
464B6	Descemet	0,998770593	-0,05043228	0,03658042	0,243977673	0,346091316	0,032366526	-0,01522678
465B1	Descemet	1,709859848	-0,0259366	0,104793576	0,16722973	0,685679447	0,054985736	-0,02159827
465B6	Descemet	1,71354807	-0,02737752	0,078757401	0,156286722	0,836268798	0,063883983	-0,02526998
465C1	Descemet	1,780427834	-0,01488953	0,083948414	0,189629847	0,678160141	0,107152561	-0,00053996

Dateiname	Lokalisation	Konz. Na	Konz Mg	Konz P	Konz S	Konz Cl	Konz K	Konz Ca
465C6	Descemet	1,451192525	-0,00432277	0,040798118	0,177511751	0,540441675	0,095673142	-0,00961123
468B1	Descemet	0,879518072	-0,05427474	0,099359234	0,156066392	0,215824414	0,101786442	0,000647948
468B6	Descemet	0,712072781	-0,00912584	0,050855706	0,173031727	0,118344398	0,089491917	-0,00529158
469A1	Descemet	0,785591345	-0,05667627	0,044529159	0,114571093	0,200447094	0,051997011	-0,02580994
469A6	Descemet	0,891566265	-0,02545629	0,160110309	0,164365452	0,243937136	0,050434724	-0,02732181
469B1	Descemet	0,79641013	-0,03986551	0,020358504	0,183166863	0,250169354	0,036238283	-0,03304536
469B6	Descemet	1,118023113	-0,03362152	0,025225079	0,196313161	0,364110554	0,04574786	-0,00464363
470A1	Descemet	1,008851733	-0,03170029	0,03658042	0,152908343	0,350968703	0,034947697	-0,02473002
470A6	Descemet	0,587902631	-0,04322767	0,020196285	0,116774383	0,13067335	0,02421546	-0,03272138
471A1	Descemet	0,947381362	0,0129683	0,058480006	0,11229436	0,204443842	0,030057057	-0,02483801
471A6	Descemet	0,822719449	-0,05235351	0,092708249	0,125954759	0,196450345	0,022585247	-0,03164147
613A1	Descemet	0,785099582	-0,00144092	0,047043556	0,089453584	0,138057174	0,018509713	-0,02678186
613A6	Descemet	0,961396607	-0,03506244	0,041690324	0,192053467	0,281330443	0,03216275	-0,02764579
71A1	Descemet	1,116301942	-0,01200768	0,034390462	0,203069918	0,354626744	0,0291061	-0,012527
71A6	Descemet	0,815834768	-0,04803074	0,025306189	0,19726792	0,167931175	0,038819454	-0,01943844

EDXA-Ergebnisse der Gruppen II (Ciprofloxacin)

P/B-Werte von Na, Mg, Si, P, S, Cl, Ca, K (Ciprofloxacin)

Dateiname	Lokalisat.	Backgr.	P/B Na	P/B Mg	P/B Si	P/B P	P/B S	P/B Cl	P/B Ca	P/B K
614OTC	Epithel	67258	3,858	1,152	0,983	4,037	3,68	4,329	1,277	1,668
614OTC10	Epithel	70029	3,429	1,049	1,459	3,393	3,751	4,231	1,217	1,508
614OTC15	Epithel	65277	3,633	1,018	0,981	4,235	4,126	5,024	1,483	1,644
614OTC20	Epithel	66996	3,858	1,131	0,92	4,096	4,395	3,927	1,222	1,76
4665	Epithel	145623	5,132	1,162	1,097	4,676	5,17	5,628	1,358	1,652
46610	Epithel	141456	3,684	1,039	1,101	3,57	3,099	3,353	1,223	1,485
466MTC5	Epithel	59938	3,635	1,159	1,112	4,291	4,112	3,676	1,245	1,542
466MTC10	Epithel	61707	3,986	1,198	0,974	3,628	4,001	4,062	1,273	1,515
466MTC15	Epithel	62922	4,083	1,124	0,864	3,397	3,482	4,157	1,332	1,625
466MTC20	Epithel	66427	4,922	1,215	1,04	3,688	3,914	5,213	1,581	1,792
466BL	Trepan li	94241	3,83	1,022	0,903	1,257	2,982	5,311	1,181	1,856
466BR	Trepan re	176369	4,462	1,076	1,084	1,334	4,46	6,057	1,246	1,86
466BU	Trepan u	146029	3,93	1,00	1,049	1,246	3,006	4,708	1,194	1,696
614OTC4	Subepithel	64507	4,278	1,04	1,053	1,424	4,05	5,367	1,151	1,571
614OTC9	Subepithel	65031	3,747	1,068	1,041	1,508	3,87	4,782	1,107	1,753
614OTC14	Subepithel	68051	4,149	1,147	0,909	1,187	3,604	5,677	1,165	1,825
614OTC19	Subepithel	67178	3,366	1,025	0,989	1,246	3,207	4,35	1,203	1,628
4664	Subepithel	203745	3,388	1,07	1,023	1,22	2,55	3,943	1,213	1,46
4664	Subepithel	203745	3,388	1,07	1,023	1,22	2,55	3,943	1,213	1,46
466MTC4	Subepithel	58824	3,375	1,077	0,988	1,527	3,14	3,368	1,152	1,459
466MTC9	Subepithel	60067	2,721	1,012	1,031	1,264	2,786	3,123	1,117	1,363
466MTC14	Subepithel	60759	2,804	1,054	1,132	1,308	2,468	2,59	1,181	1,439
466MTC19	Subepithel	60433	3,579	1,096	0,97	1,33	3,265	4,49	1,31	1,765
614OTC3	Stroma	64919	4,513	1,033	0,949	1,406	3,217	6,287	1,108	1,645
614OTC8	Stroma	67733	4,568	1,126	0,957	1,231	3,279	6,018	1,213	1,438
614OTC18	Stroma	71780	5,3	1,065	1,001	1,272	3,35	6,519	1,249	1,469

Dateiname	Lokalisat.	Backgr.	P/B Na	P/B Mg	P/B Si	P/B P	P/B S	P/B Cl	P/B Ca	P/B K
614OTC13	Stroma	71053	5,173	1,052	0,976	1,155	3,354	6,542	1,434	1,839
4663	Stroma	113005	3,416	0,987	1,041	1,164	2,352	3,951	1,126	1,31
4668	Stroma	140843	4,557	1,008	1,04	1,189	2,932	5,327	1,138	1,342
466MTC3	Stroma	58475	3,098	0,987	1,202	1,096	2,827	4,13	1,014	1,299
466MTC8	Stroma	61334	3,187	0,992	1,073	1,157	2,469	3,935	1,133	1,254
466MTC13	Stroma	61042	3,378	1,075	1,066	1,211	2,888	4,471	1,168	1,477
466MTC18	Stroma	59149	3,041	1,065	1,021	1,037	2,881	3,782	1,216	1,557
614OTC2	Vor-Desc.	69347	6,165	1,022	0,954	1,327	4,019	7,627	1,231	1,657
614OTC7	Vor-Desc.	70432	6,359	1,105	1,065	1,25	4,026	7,509	1,247	1,846
614OTC12	Vor-Desc.	74518	6,56	1,118	1,007	1,459	4,046	8,016	1,573	1,814
614OTC17	Vor-Desc.	69769	5,484	1,029	0,936	1,263	3,476	7,564	1,326	1,686
4662	Vor-Desc.	105669	3,775	1,033	1,081	1,172	3,194	5,81	1,131	1,373
4667	Vor-Desc.	185819	3,154	0,993	1,059	1,117	2,04	2,928	1,091	1,174
466MTC2	Vor-Desc.	60747	3,91	1,031	1,083	1,112	2,473	5,167	1,253	1,433
466MTC7	Vor-Desc.	60965	3,398	1,014	1,129	1,061	2,105	5,35	1,108	1,392
466MTC12	Vor-Desc.	62458	3,747	1,005	0,896	1,221	2,62	4,984	1,184	1,437
466MTC17	Vor-Desc.	61504	4,365	1,038	1,021	1,055	2,944	5,471	1,232	1,667
614OTC1	Descemet	61274	6,045	1,041	1,024	1,395	4,7	9,16	1,392	2,178
614OTC6	Descemet	70725	6,471	1,117	0,96	3,401	4,527	8,361	1,446	2,258
614OTC11	Descemet	71418	6,672	1,118	0,969	1,616	4,275	7,875	1,806	2,147
614OTC16	Descemet	72376	6,655	1,158	1,003	2,582	5,022	8	1,555	1,945
4661	Descemet	115198	6,933	0,99	1,023	1,325	4,42	10,093	1,471	2,019
4666	Descemet	187181	5,331	1,038	0,991	1,377	4,075	6,917	1,198	1,383
466MTC1	Descemet	55894	7,831	1,06	1,068	1,279	4,762	10,623	1,363	1,798
466MTC6	Descemet	73554	9,376	1,045	1,005	1,585	4,796	15,029	1,322	2,377
466MTC11	Descemet	68625	3,342	1,066	0,971	1,017	2,529	4,437	1,191	1,371
466MTC16	Descemet	63821	6,14	1,039	1,052	1,281	4,713	7,993	1,366	1,823

EDXA-Ergebnisse der Gruppen II. (Ciprofloxacin)

Konzentrationen in mol/kg von Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca

Dateiname	Lokalisation	Konz. Na	Konz. Mg	Konz. P	Konz. S	Konz. Cl	Konz. K	Konz. Ca
614OTC	Epithel	0,685025818	0,019212296	0,244220942	0,136750881	0,122137922	0,048940361	-0,01911447
614OTC10	Epithel	0,57954266	-0,03025937	0,191986374	0,141965335	0,115499255	0,038072273	-0,02559395
614OTC15	Epithel	0,629702483	-0,0451489	0,260280639	0,169506463	0,169218263	0,047310148	0,003131749
614OTC20	Epithel	0,685025818	0,009125841	0,249006408	0,189262632	0,094905839	0,055189512	-0,025054
4665	Epithel	0,99827883	0,02401537	0,296049964	0,246180964	0,210134128	0,047853553	-0,01036717
46610	Epithel	0,642242439	-0,03506244	0,206342769	0,094080494	0,056022219	0,036509985	-0,024946
466MTC5	Epithel	0,630194246	0,022574448	0,264822776	0,168478261	0,077902723	0,040381742	-0,02257019
466MTC10	Epithel	0,757806	0,003467	0,284794	0,2977	0,445425	0,041737	-0,014609
466MTC15	Epithel	0,740349152	0,005763689	0,192310812	0,122209166	0,110486384	0,046019563	-0,01317495
466MTC20	Epithel	0,946643718	0,049471662	0,215913699	0,153936545	0,182021406	0,05736313	0,013714903
466BL	Trepan li	0,678141136	-0,04322767	0,018736313	0,085487662	0,188660073	0,061710365	-0,02948164
466BR	Trepan re	0,833538235	-0,01729107	0,02498175	0,194036428	0,239195231	0,061982068	-0,0224622
466BU	Trepan u	0,7027293	-0,053794	0,0178441	0,0872503	0,1478119	0,0508423	-0,028078
614OTC4	Subepithel	0,788296041	-0,03458213	0,032281612	0,163924794	0,192453597	0,042351583	-0,03272138
614OTC9	Subepithel	0,657732973	-0,02113353	0,039094817	0,150705053	0,15282482	0,054714033	-0,037473
614OTC14	Subepithel	0,75657733	0,016810759	0,013058642	0,131169213	0,213453462	0,059604673	-0,0312095
614OTC19	Subepithel	0,564052127	-0,04178674	0,017844107	0,102012338	0,123560493	0,046223339	-0,02710583
4664	Subepithel	0,56946152	-0,02017291	0,015735258	0,053760282	0,095989703	0,034811846	-0,02602592
4664	Subepithel	0,56946152	-0,02017291	0,015735258	0,053760282	0,095989703	0,034811846	-0,02602592
466MTC4	Subepithel	0,56626506	-0,01681076	0,040635899	0,097091657	0,057038342	0,034743921	-0,03261339
466MTC9	Subepithel	0,405458569	-0,04803074	0,01930408	0,071092832	0,040441675	0,028223068	-0,03639309
466MTC14	Subepithel	0,425866732	-0,02785783	0,022872901	0,047737955	0,004335456	0,03338541	-0,02948164
466MTC19	Subepithel	0,616424883	-0,00768492	0,024657312	0,106272033	0,133044303	0,05552914	-0,01555076
614OTC3	Stroma	0,84607819	-0,03794428	0,03082164	0,102746769	0,254775776	0,047378074	-0,03736501
614OTC8	Stroma	0,859601672	0,006724304	0,016627464	0,107300235	0,236553313	0,033317484	-0,02602592
614OTC18	Stroma	1,039586919	-0,02257445	0,019952956	0,112514689	0,270491803	0,035423176	-0,02213823

Dateiname	Lokalisation	Konz. Na	Konz. Mg	Konz. P	Konz. S	Konz. Cl	Konz. K	Konz. Ca
614OTC13	Stroma	1,00835997	-0,02881844	0,010463136	0,112808461	0,272049858	0,060555631	-0,00215983
4663	Stroma	0,576346201	-0,06003842	0,011193122	0,039218566	0,096531635	0,024623013	-0,03542117
4668	Stroma	0,856896976	-0,04995197	0,013220861	0,081815511	0,189743937	0,026796631	-0,03412527
466MTC3	Stroma	0,498155889	-0,06003842	0,005677671	0,074103995	0,108657364	0,023875832	-0,0475162
466MTC8	Stroma	0,520039341	-0,05763689	0,010625355	0,047811398	0,095447771	0,020819182	-0,03466523
466MTC13	Stroma	0,567002705	-0,01777137	0,015005272	0,078584019	0,131757214	0,035966581	-0,03088553
466MTC18	Stroma	0,484140644	-0,02257445	0,000892205	0,078069918	0,085083322	0,041400625	-0,02570194
614OTC2	Vor-Desc.	1,252274404	-0,04322767	0,024413983	0,161648061	0,345549384	0,04819318	-0,02408207
614OTC7	Vor-Desc.	1,299975412	-0,00336215	0,018168546	0,162162162	0,337555887	0,06103111	-0,02235421
614OTC12	Vor-Desc.	1,34939759	0,002881844	0,035120448	0,163631022	0,371900826	0,058857492	0,012850972
614OTC17	Vor-Desc.	1,084829112	-0,03986551	0,01922297	0,121768508	0,341281669	0,050163021	-0,01382289
4662	Vor-Desc.	0,664617654	-0,03794428	0,011841999	0,101057579	0,222463081	0,028902323	-0,03488121
4667	Vor-Desc.	0,511925252	-0,05715658	0,007380972	0,016304348	0,027232082	0,015385138	-0,03920086
466MTC2	Vor-Desc.	0,697811655	-0,0389049	0,006975424	0,04810517	0,178905297	0,032977856	-0,02170626
466MTC7	Vor-Desc.	0,571920334	-0,04707012	0,002838835	0,021078143	0,191301992	0,030192909	-0,03736501
466MTC12	Vor-Desc.	0,657732973	-0,05139289	0,015816368	0,058901293	0,166508603	0,033249558	-0,02915767
466MTC17	Vor-Desc.	0,809687731	-0,03554275	0,002352178	0,082696827	0,199498713	0,048872436	-0,02397408
614OTC1	Descemet	1,222768626	-0,03410183	0,029929435	0,21166275	0,449397101	0,083582394	-0,00669546
614OTC6	Descemet	1,327514138	0,002401537	0,19263525	0,198957109	0,395271643	0,089016438	-0,00086393
614OTC11	Descemet	1,376936317	0,002881844	0,047854652	0,180449471	0,362349275	0,081476702	0,038012959
614OTC16	Descemet	1,372756331	0,02209414	0,126206505	0,235311398	0,370816962	0,06775574	0,010907127
4661	Descemet	1,441111384	-0,0585975	0,024251764	0,191098707	0,512599919	0,072782231	0,001835853
4666	Descemet	1,047209245	-0,03554275	0,028469462	0,16576087	0,29745292	0,029581579	-0,02764579
466MTC1	Descemet	1,661912958	-0,02497598	0,020520723	0,216216216	0,548502913	0,057770683	-0,00982721
466MTC6	Descemet	2,041799852	-0,0321806	0,045340255	0,218713278	0,846971955	0,097099579	-0,01425486
466MTC11	Descemet	0,558150971	-0,02209414	-0,00072999	0,052217979	0,129454004	0,028766472	-0,02840173
466MTC16	Descemet	1,246127367	-0,03506244	0,020682943	0,212617509	0,370342772	0,059468822	-0,00950324

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt den Betreuern dieser Arbeit, Frau Prof. Midelfart und Herrn PD Dr. Schrage. Beide haben mit Ihrer unermüdlichen Energie dieses Projekt zwischen den Augenkliniken in Trondheim und Aachen gefördert und mich mit Ihrer Begeisterung für Ihre Arbeit motiviert und angesteckt. Dabei bekam ich die Gelegenheit von einer so ambitionierten Wissenschaftlerin und Hochschullehrerin im besten Sinne, die Frau Midelfart ist, zu lernen und mit Ihr zu arbeiten, eine Erfahrung, die mir großen Spaß gemacht hat und die ich keinesfalls missen möchte. Herr PD Dr. Schrage hat in Aachen mit seinem umfangreichen methodischen und fachlichen Wissen, gepaart mit Ideenreichtum und Zielbewußtsein die Arbeit betreut und das Bewußtsein für die Freude an der Wissenschaft über eine Dissertation hinaus vermittelt. Von ihm war immer eine treffliche und offene Einschätzung einer Fragestellung zu bekommen, und ich habe ihn als engagierten Lehrer und ehrlichen Ratgeber sehr schätzen gelernt. Ich danke Professor Reim für wichtige Anregungen und Kritiken. Sein weitreichendes Engagement hat sich in den Gesprächen gezeigt, indem er analysierte, was gearbeitet wird und mit Anmerkungen immer zu Verbesserungen beigetragen hat.

Im Zusammenhang mit der Umsetzung der Versuche danke ich herzlich den Mitarbeitern des MR-Centers der NTNU in Trondheim, die mich in die Grundlagen und Geheimnisse der NMR-Spektroskopie eingeführt haben und den Mitarbeitern des Gemeinschaftsinstituts für Elektronenmikroskopie (GFE) der RWTH Aachen, bei denen ich viele Tage mit EDX-Analysen verbracht habe. Es war immer eine gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wäre aber gar nicht erst möglich gewesen ohne die Hilfe der immer hilfsbereiten und netten Mitarbeiter im Institut für Versuchstierkunde der RWTH Aachen, die uns zu jeder Tageszeit mit viel Engagement und ihrem unersetzlichen Sachverstand zur Seite standen. Nicht zuletzt denke ich mit Freude an die Zusammenarbeit im Labor der Augenklinik der RWTH Aachen, wo Frau Anke Emmunds im Labor alle Tricks kannte, jederzeit ein offenes Ohr für suchende HiWis und hetzende Doktoranden hatte und wesentlich zum sehr netten Klima bei der Arbeit beigetragen hat. Frau Dr. med. Sirpa Kompa hat wesentlich zum Gelingen beigetragen, indem Sie ihr Wissen auf dem Gebiet der Tierversuche, Probenaufbereitung, histologischer Färbung, statistischen Auswertung und vielen anderen Dingen immer geduldig und umfangreich weitergegeben hat. Dabei hat die Zusammenarbeit immer besonderen Spaß gemacht, ich danke Ihr für Hilfe bei der Durchführung, Korrektur der geschriebenen Arbeit und Freundschaft am Rande des manchmal turbulenten Labordaseins.

Ich danke für die unermüdliche Unterstützung und Geduld meiner lieben Eltern und meiner lieben Schwester und freue mich über manchmal kritische aber immer liebevolle Gespräche, für die wir alle immer noch Zeit finden. Unseren Eltern verdanken wir eine Erziehung zur Neugierde, zur Aktivität und Entdeckung, die sich auf die unterschiedlichste Weise entfalten kann und wozu sie uns immer ermuntert und uns Raum gegeben haben. Meinem Freund Markus Westekemper danke ich dafür, daß er mir weit über den Kampf mit Excel, Power Point und Festplattencrashes hinaus, wo er oft ein Retter in scheinbar verzweifelten Situationen war, ein unersetzlicher Kumpan ist. Die vielen Gespräche über Ideen und Umsetzungen möchte ich nie missen.

Mein Dank gilt all denen, die als Freunde oder Kollegen durch viele kleine und große Gesten und Hilfen zum Gelingen beigetragen haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Henrike Wüstemeyer
Geburtsdatum: 05.11.1974
Geburtsort: Düsseldorf
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981 – 1985 Otto-Pankok-Grundschule Drevenack
1985 – 1994 Andreas-Vesalius-Gymnasium Wesel
07/1991 – 10/1991 Auslandsaufenthalt mit Schulbesuch, Natick, Mass. USA
1994 Abitur

Berufsausbildung

1994 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen
08/1996 Physikum
08/1997 1. Staatsexamen
09/1997 – 06/1998 Studien- und Forschungsaufenthalt an der Medizinischen Fakultät der NTNU Trondheim, Norwegen, im Rahmen eines Erasmus Austauschprogramms
03/2000 2. Staatsexamen
04/2000 – 02/2001 Praktisches Jahr
Innere Medizin: Royal Devon & Exeter Hospital, Großbritannien
Wahlfach Augenheilkunde: Augenklinik der RWTH Aachen
Chirurgie: Chirurgische Klinik der RWTH Aachen
05/2001 3. Staatsexamen, Ärztliche Prüfung

Studienbegleitende Tätigkeiten

Famulaturen

02/1997 – 03/1997 Innere Medizin, Ev. Krankenhaus Dinslaken
08/1998 – 09/1998 Pädiatrie, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Kinderklinik
02/1999 – 03/1999 Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Pfluger, Dr. Weiser, Dr. Petermann-Meyer, Aachen
07/1999 – 08/1999 Anästhesiologie und Intensivmedizin, Marien-Hospital Wesel
08/1999 Augenheilkunde, Universitätsaugenklinik der RWTH Aachen

Studentische Tätigkeiten

1994 – 1999 studentische Aushilfe auf der Intensivpflegestation des Ev. Krankenhauses Dinslaken
1999 – 2000 studentische Hilfskraft im Labor der Augenklinik der RWTH Aachen
1999 USMLE Step 1
2000 USMLE Step 2

Berufliche Tätigkeit:

Seit 07/2001 Ärztin im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universität Leipzig

Fremdsprachenkenntnisse:

Englisch, Norwegisch, Französisch, Latein